



(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) 
1-0020158

(51)⁷ **C07K 1/14, 1/34, 14/415, C12N 5/04,** (13) **B**
15/00, 15/82

(21)	1-2012-01109	(22)	21.09.2010
(86)	PCT/CA2010/001489 21.09.2010	(87)	WO2011/035423 31.03.2011
(30)	61/244,786 22.09.2009 US		
(45)	25.12.2018 369	(43)	25.09.2012 294
(73)	MEDICAGO INC. (CA) 1020, Route de l'Eglise, Suite 600, Québec, Québec G1V 3V9, Canada		
(72)	VEZINA, Louis-Philippe (CA), COUTURE, Manon (CA), PAQUET, Dany (CA), DARGIS, Michele (CA), D'AOUST, Marc-Andre (CA)		
(74)	Công ty Luật TNHH AMBYS Hà Nội (AMBYS HANOI)		

(54) **PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PROTEIN CÓ NGUỒN GỐC THỰC VẬT**

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất các protein hoặc các protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật. Phương pháp này có thể bao gồm bước lấy thực vật, hoặc vật chất thực vật chứa các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc được định vị trong không bào, sản xuất phân đoạn tế bào nguyên sinh/tế bào trần và phân đoạn vô bào từ thực vật hoặc vật chất thực vật, và thu hồi phân đoạn vô bào. Phân đoạn vô bào chứa các protein hoặc các protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật. Ngoài ra, các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có thể thu được từ thực vật hoặc vật chất thực vật chứa các protein hoặc các protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật, bằng cách phân cắt vật chất thực vật sử dụng chế phẩm enzym phân hủy thành tế bào để tạo ra phân đoạn đã phân cắt. Phân đoạn đã phân cắt được lọc để tạo ra phân đoạn đã lọc, và các protein hoặc các protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật được thu hồi từ phân đoạn đã lọc.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất protein có nguồn gốc thực vật. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp nhằm thu được protein, bao gồm các siêu cấu trúc protein từ thực vật và các mô thực vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các chiến lược biểu hiện tái tổ hợp hiện nay trong các tế bào chủ như *E. coli*, môi trường cấy tế bào sâu bọ, và môi trường cấy tế bào động vật có vú biểu hiện và tiết các protein ở mức rất cao trong môi trường nuôi cấy tế bào. Sử dụng các hệ thống này, đạt được các mức biểu hiện cao, sự gấp cuộn protein thích hợp và sự biến đổi sau dịch mã của protein. Hơn nữa, sự tinh chế của protein được biểu hiện được đơn giản hóa do các protein trong tế bào có thể được phân tách dễ dàng từ các thành phần khác (ADN, túi, màng, tế bào sắc tố, và v.v.). Đối với các hệ thống biểu hiện thực vật hoặc men, thành tế bào ngăn cản sự tiết của các protein được biểu hiện vào trong môi trường nuôi cấy.

Các phương thức tiếp cận khác nhau được sử dụng rộng rãi trong khoa học để tạo ra các chất chiết tế bào. Các phương thức tiếp cận cơ học để phá vỡ thành tế bào và giải phóng các chất được chứa trong thành tế bào thường không có tính chọn lọc đối với loại protein nhất định hoặc các thành phần của tế bào. Trực tiếp biểu hiện protein quan tâm vào trong môi trường nuôi cấy tế bào cho phép các tạp chất trong tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm hoặc bằng cách lọc, cho phép làm giàu đơn giản và nhanh chóng protein quan tâm. Có thể mong muốn tách protein hoặc siêu cấu trúc protein quan tâm, bao gồm các hình hoa hồng từ các protein, hạt nano, các phức protein lớn, các kháng thể hoặc các hạt tương tự virus (VLP), và tương tự, từ một số, hoặc tất cả protein, ADN, màng, phân đoạn, túi, tế bào sắc tố, cacbonhydrat, v.v. có mặt trong cây trồng hoặc vật chất cây trồng trước khi siêu cấu trúc protein quan tâm được sử dụng trong dạng bào chế vắc xin.

Các globulin miễn dịch (Immunoglobulin - IgG) là các protein gồm nhiều chuỗi protein khác nhau có ái lực đặc trưng đối với các bản sao kháng nguyên đặc hiệu có bản chất khác nhau. Ngày nay, sự phân lập thường lệ của các dòng tế bào tạo ra IgG, và sự tiếp cận các công nghệ đối với quá trình tiến hóa hướng đến IgG và kỹ thuật phân tử đã ảnh

hưởng sâu đến quá trình tiến hóa của chúng làm các tác nhân trị liệu sinh học và trong thị trường khoa học đời sống chung. IgG đơn dòng dùng cho trị liệu (các kháng thể đơn dòng, mABs) chiếm lĩnh thị trường hiện tại của loại thuốc chống viêm và chống ung thư mới và hàng trăm ứng cử viên mới hiện đang được nghiên cứu và phát triển lâm sàng cho các ứng dụng cải thiện hoặc ứng dụng mới. Nhu cầu thị trường hàng năm đối với các phạm vi kháng thể đơn dòng từ một vài gram (chẩn đoán), một vài kg (kháng độc tố) lên tới một hoặc vài trăm kg (phòng ngự sinh học, chống ung thư, chống nhiễm trùng, chống viêm). Phương pháp sản xuất các glycoprotein biến tính từ thực vật được mô tả trong WO 2008/151440 (được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo).

Phương pháp chiết tách protein từ không gian bên trong tế bào của thực vật, bao gồm quy trình chân không và ly tâm để tạo ra dịch chiết kể chứa protein quan tâm được mô tả trong công bố PCT số WO 00/09725 (bởi Turpen et al.). Phương thức tiếp cận này thích hợp đối với các protein nhỏ (có trọng lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng 50 kDa) mà đi qua mạng vi sợi dưới chân không và ly tâm, nhưng không thích hợp đối với các protein, các protein siêu cấu trúc lớn hơn, các hình hoa hồng từ các protein, các hạt có kích cỡ nano, các phức protein lớn, như các kháng thể hoặc VLP.

McCormick et al 1999 (Proc Natl Acad Sci USA 96:703-708) bộc lộ sử dụng peptit tín hiệu amylaza từ gạo được dung hợp với epitop Fv chuỗi đơn (scFv) để nhắm tới protein được biểu hiện tới gần ngoài tế bào, sau đó lọc chân không mô lá và thân để thu hồi các polypeptit scFv. Moehnke et al, 2008. (Biotechnol Lett 30:1259-1264) mô tả công dụng của phương pháp thẩm chân không của McCormick để thu được một dị ứng nguyên thực vật tái tổ hợp từ thuốc lá bằng cách sử dụng sự chiết tách không bào. Công bố PCT WO 2003/025124 (Zhang et al) bộc lộ biểu hiện của các scFv globulin miễn dịch trong thực vật, nhắm đến không gian không bào sử dụng các trình tự tín hiệu ở chuột.

Các hạt tương tự virus (VLP) có thể được sử dụng để bào chế vắc xin cúm. Các siêu cấu trúc như VLP bắt chước cấu tạo của vỏ bao virus, nhưng thiếu hệ gen, và do đó không thể sao chép hoặc tạo ra các biện pháp nhiễm thứ cấp. VLP đưa ra một phương án thay thế được cải thiện cho các kháng nguyên tái tổ hợp (hòa tan) đã được phân lập để kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh. VLP được kết hợp nhờ biểu hiện của các protein virus đặc hiệu và phô sự kết hợp bề mặt bên ngoài tương tự như của virus cùng protein cùng nguồn gốc của chúng, không giống hạt virus thực, không kết hợp vật liệu di truyền. Trình diện của

các kháng nguyên trong cấu trúc hạt và đa trị tương tự với trình diện của các kháng nguyên của virus tự nhiên đạt được sự kích thích tăng cường của đáp ứng miễn dịch với các thành phần dịch và tế bào đã cân bằng. Sự cải thiện đó qua sự kích thích bởi kháng nguyên đã được phân lập được tin là đặc biệt đúng đối với các virut được bao như VLP được bao có các kháng nguyên bề mặt trong trạng thái liên kết với màng tự nhiên của chúng (Grgacic và Anderson, năm 2006, *Methods* 40, 60-65). Hơn nữa, VLP cúm, với sự tổ chức hạt nano của chúng, đã cho thấy là các ứng cử viên vắc xin tốt hơn so với hemagglutinin HA tái tổ hợp (có nghĩa là, HA monome, hoặc HA được tổ chức thành các hình hoa hồng; sự kết hợp của 3 đến 8 trime của HA), và chúng có thể hoạt hóa cả đáp ứng miễn dịch qua thể dịch và qua tế bào. (Bright, R.A., et. al., 2007, *Vaccine* 25, 3871-3878).

VLP cúm đã thu được trong các tế bào động vật có vú được nuôi cấy từ đồng biểu hiện của tất cả 10 protein cúm (Mena et al., 1996, *J. Virol.* 70, 5016-5024). Nhiều protein của virut là không cần thiết cho sự sản xuất của VLP, và VLP bệnh cúm trong các chương trình phát triển vắc xin đã được sản xuất từ đồng biểu hiện của 2 protein vỏ ngoài kháng nguyên chính (HA và NA) với M1 hoặc chỉ từ đồng biểu hiện của HA và M1 (Kang et al., 2009, *Virus Res.* 143, 140-146). Chen et al. (2007, *J. Virol.* 81, 7111-7123) đã cho thấy rằng một mình HA có khả năng điều khiển sự tạo thành VLP và sự nảy chồi cây và đồng biểu hiện M1 có thể được bỏ qua trong hệ thống của chúng. Tuy nhiên, do HA đã được phát hiện ra là liên kết với các glycoprotein được sialyl hóa trên bề mặt của các tế bào động vật có vú tạo ra VLP, sialidaza của virut được đồng thể hiện để cho phép giải phóng VLP từ các tế bào sản xuất sau khi cây nảy chồi.

Công bố PCT số WO 2006/119516 (bởi Williamson and Rybicki) bộc lộ biểu hiện của H5 HA được tối ưu hóa bằng đơn vị mã của người có chiều dài đầy đủ và được cắt cụt của bệnh cúm A/Vietnam/1194/2004 ở thực vật. Cấu trúc được cắt cụt thiếu miền giữ chặt màng tế bào. Đã thu được sự tích lũy protein HA cao nhất bằng các cấu trúc nhắm mục tiêu đến ER. Các cấu trúc thiếu miền nhắm đích đến màng tế bào không tạo ra HA có thể phát hiện được. Sự sản xuất của VLP đã không được báo cáo.

Sự sản xuất của VLP HA cúm mà chứa vỏ ngoài lipid đã được mô tả trước đó bởi các tác giả trong WO 2009/009876 và WO 2009/076778 (bởi D'Aoust et al.; cả hai tài liệu này được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo). Đối với các virut được bao, lớp lipid

hoặc màng được giữ lại bởi virus là có lợi. Chế phẩm của lipid có thể thay đổi với hệ thống (ví dụ, virus được bao được sản xuất từ thực vật sẽ bao gồm các lipid hoặc các phytosterol thực vật trong vỏ ngoài), và có thể góp phần cải thiện đáp ứng miễn dịch.

Sự kết hợp của VLP được bao trong thuốc lá chuyển gen biểu hiện kháng nguyên bề mặt của HBV (HBsAg) đã được mô tả bởi Mason et al. (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11745-11749). Các VLP HBV được sản xuất từ thực vật đã được cho thấy là tạo ra các đáp ứng miễn dịch tế bào B và tế bào T tiềm năng (Huang et al., 2005, Vaccine 23, 1851-1858) nhưng sự miễn dịch bằng cách uống thông qua các nghiên cứu cho ăn chỉ tạo ra đáp ứng miễn dịch khiêm tốn (Smith et al., 2003, Vaccine 21, 4011-4021). Greco (2007, Vaccine 25, 8228-8240) đã cho thấy rằng các epitope virus thiếu hụt sự miễn dịch ở người (HIV) trong sự dung hợp với HBsAG đã tích lũy thành VLP khi được biểu hiện trong cây thuốc lá chuyển gen và *Arabidopsis*, tạo ra vắc xin VLP thể lưỡng trị.

Biểu hiện của protein vỏ virus (NVCP) trong các cây thuốc lá và cây khoai tây chuyển gen đã dẫn đến sự kết hợp của VLP không được bao (Mason et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5335-5340). VLP NVCP đã được sản xuất trong các lá *N. benthamiana* được thâm nhiễm trong nông nghiệp (Huang et al. 2009, Biotechnol. Bioeng. 103, 706-714) và sự tạo ra sự miễn dịch của chúng khi cấp qua miệng đã được chứng minh trong chuột (Santi et al., 2008, Vaccine 26, 1846-1854). Sự cấp 2 hoặc 3 liều khoai tây thô chứa 215 đến 751 μ g NVCP trong dạng VLP cho các tình nguyện viên trưởng thành khỏe mạnh đã dẫn đến sự phát triển của đáp ứng miễn dịch và 95% tình nguyện viên được miễn dịch (Tacket et al. 2000, J. Infect. Dis. 182, 302-305). Các VLP không được bao cũng đã thu được từ biểu hiện của kháng nguyên lõi HBV (HBcAg; Huang et al., 2009, Biotechnol. Bioeng. 103, 706-714), và các protein vỏ chính của virus gây u nhú người (HPV) (Varsani et al., 2003, Arch. Virol. 148, 1771-1786).

Protein, hoặc hệ thống sản xuất protein siêu cấu trúc đơn giản hơn, ví dụ, dựa trên biểu hiện của chỉ có một hoặc một số protein là mong muốn. Sự sản xuất của các protein, hoặc các siêu cấu trúc protein, ví dụ nhưng không giới hạn đối với các hình hoa hồng từ các protein, các hạt có kích cỡ nano, các phức protein lớn như các kháng thể hoặc VLP, trong hệ thống thực vật là có lợi, trong đó thực vật có thể được sinh trưởng trong nhà kính hoặc cánh đồng, và không yêu cầu các phương pháp nuôi cấy mô vô trùng và theo dõi.

Phương pháp sản xuất protein, hoặc các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc mà về cơ bản không có, hoặc dễ dàng được tách từ các protein thực vật, còn giữ lại cấu trúc và đặc tính của protein được mong muốn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất protein có nguồn gốc thực vật. Đặc biệt hơn, sáng chế đề xuất phương pháp nhằm thu được protein, bao gồm các siêu cấu trúc protein từ thực vật và các mô thực vật.

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất protein có nguồn gốc thực vật được cải tiến.

Sáng chế đề xuất phương pháp (A) là thu protein có nguồn gốc thực vật, hoặc protein, hoặc các protein siêu cấu trúc, bao gồm lấy thực vật hoặc vật chất thực vật chứa các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc, được định vị trong không bào, sản xuất tế bào nguyên sinh và phân đoạn vô bào, phân đoạn vô bào chứa các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật; và thu hồi phân đoạn vô bào. Phương pháp có thể bao gồm thêm bước tinh chế các protein có nguồn gốc thực vật, hoặc các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc, từ phân đoạn vô bào. Các protein có nguồn gốc thực vật, các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có thể là các protein khảm, hoặc các protein siêu cấu trúc khảm có nguồn gốc thực vật. Các protein có nguồn gốc thực vật, hoặc các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật có thể là từ các loại thực vật khác nhau. Các protein có nguồn gốc thực vật, hoặc các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có thể bao gồm các hình hoa hồng từ các protein, phức protein, proteasom, metabolon, phức phiên mã, phức tái tổ hợp, phức quang tổng hợp, phức vận chuyển qua màng, phức hệ lỗ nhân, hạt protein có kích cỡ nano, glycoprotein, kháng thể, kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể đơn dòng chuỗi đơn, hạt tương tự virus, protein vỏ ngoài của virus, protein cấu trúc của virus, protein vỏ của virus, protein bọc virus, protein khảm, phức protein khảm, hạt protein khảm có kích cỡ nano, glycoprotein khảm, kháng thể khảm, kháng thể đơn dòng khảm, kháng thể đơn dòng chuỗi đơn khảm, hemagglutinin khảm, protein vỏ ngoài của virus, protein cấu trúc của virus, protein vỏ của virus, protein bọc virus. Kháng thể đơn dòng có nguồn gốc thực vật có thể bao gồm kháng thể đơn dòng

khảm người-chuột, ví dụ, nhưng không giới hạn đối với C2B8. VLP có nguồn gốc thực vật có thể chứa hemagglutinin gây bệnh cúm.

Các phân đoạn vô bào và tế bào nguyên sinh có thể được sản xuất bằng cách xử lý thực vật hoặc vật chất từ thực vật bằng chế phẩm enzym. Chế phẩm enzym có thể chứa một hoặc nhiều pectinaza, một hoặc nhiều xelulaza, hoặc một hoặc nhiều pectinaza và một hoặc nhiều xelulaza. Hơn nữa, nếu muốn, chế phẩm enzym không chứa lipaza hoặc proteaza, hoặc chế phẩm không chứa lipaza hoặc proteaza bổ sung.

Thực vật hoặc vật chất thực vật có thể thu được bằng cách trồng, thu hoạch hoặc trồng và thu hoạch thực vật. Vật chất thực vật có thể chứa một hoặc nhiều tế bào thực vật, lá, thân, rễ hoặc các tế bào thực vật được nuôi cấy trong một số hoặc toàn bộ thực vật.

Sáng chế đề xuất phương pháp thu các protein có nguồn gốc thực vật, các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc, như được mô tả ở trên (Phương pháp A), trong đó axit nucleic mã hóa các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc, được đưa vào thực vật theo phương thức tạm thời. Theo cách khác, axit nucleic được tích hợp ổn định vào trong hệ gen thực vật.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất protein, hoặc protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật như đã mô tả ở trên (phương pháp A) bao gồm thêm bước tinh chế các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật từ phân đoạn vô bào. Bước tinh chế bao gồm lọc phân đoạn vô bào sử dụng sự lọc sâu để tạo ra chất chiết sạch, sau đó sắc ký chất chiết sạch bằng cách sử dụng nhựa trao đổi cation, sắc ký ái lực, sắc ký loại trừ kích cỡ, hoặc kết hợp các cách này.

Không muốn bị bó buộc bởi lý thuyết, các protein thu được từ không bào đồng đều hơn, là các dạng chất trung gian của các protein được biến đổi sau dịch mã, hoặc các protein bao gồm các loại xử lý khác diễn ra trong các ngăn trong tế bào khác nhau, ví dụ, trong ty lập thể, lục lạp, và các cơ quan tế bào khác không được chiết tách. Mức độ đồng đều cao hơn của protein tái tổ hợp thường dẫn đến chất lượng chế phẩm chứa protein cao hơn, và có thể dẫn đến sản phẩm có các tính chất có lợi gồm tiềm năng hơn, thời gian bán hủy lâu hơn, hoặc khả năng gây miễn dịch tốt hơn. Ví dụ, các protein máu chứa sự glycosyl hóa matoza cao được bài tiết trong sự tuần hoàn máu nhanh hơn các protein chứa sự glycosyl hóa phức. Sản phẩm protein được glycosyl hóa trong phân đoạn vô bào thể

hiện sự glycosyl hóa dạng phức tạp hơn. Do đó, protein có nguồn gốc không bào thu được sử dụng các phương pháp được mô tả trong sáng chế, bao gồm phân cắt thành tế bào, ví dụ, thể hiện thời gian bán hủy ưu thế hơn trong tuần hoàn.

Các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật có thể bao gồm các hình hoa hồng từ các protein, các phức protein, các hạt protein có kích cỡ nano, các kháng thể, các kháng thể đơn dòng, VLP. VLP có thể bao gồm một hoặc nhiều polypeptit HA cúm. Protein siêu cấu trúc có thể là protein siêu cấu trúc khảm, ví dụ, kháng thể đơn dòng có thể là kháng thể đơn dòng khảm, hoặc polypeptit HA cúm, có thể là polypeptit HA khảm. Nếu protein siêu cấu trúc là VLP thì VLP có nguồn gốc thực vật có thể bao gồm thêm hoạt tính đông kết hồng cầu. Thực vật hoặc vật chất thực vật có thể thu được bằng cách trồng, thu hoạch hoặc trồng và thu hoạch thực vật. Vật chất thực vật có thể chứa một hoặc nhiều tế bào thực vật, lá, thân, rễ hoặc các tế bào thực vật được nuôi cấy trong một số hoặc toàn bộ thực vật.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp (B) thu protein hoặc protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật, bao gồm lấy thực vật hoặc vật chất thực vật chứa protein, hoặc protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật, phân cắt vật chất thực vật bằng chế phẩm enzym phân hủy thành tế bào để tạo ra phân đoạn đã phân cắt, và lọc phân đoạn đã phân cắt để tạo ra phân đoạn đã lọc và thu hồi protein, hoặc protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật, từ phân đoạn đã lọc.

Chế phẩm enzym có thể chứa một hoặc nhiều pectinaza, một hoặc nhiều xelulaza, hoặc một hoặc nhiều pectinaza và một hoặc nhiều xelulaza. Hơn nữa, nếu muốn, chế phẩm enzym không chứa lipaza hoặc proteaza, hoặc chế phẩm không chứa lipaza hoặc proteaza bổ sung. Protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật có thể là protein siêu cấu trúc khảm có nguồn gốc thực vật. Các protein có nguồn gốc thực vật, hoặc các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có thể bao gồm các hình hoa hồng từ các protein, phức protein, proteasom, metabolon, phức phiên mã, phức tái tổ hợp, phức quang tổng hợp, phức vận chuyển qua màng, phức hệ lỗ nhân, hạt protein có kích cỡ nano, glycoprotein, kháng thể, kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể đơn dòng chuỗi đơn, hạt tương tự virus, protein vỏ ngoài của virus, protein cấu trúc của virus, protein vỏ của virus, protein bọc virus, protein khảm, phức protein khảm, hạt protein khảm có kích cỡ nano, glycoprotein khảm, kháng thể khảm, kháng thể đơn dòng khảm, kháng thể đơn dòng chuỗi đơn khảm,

hemagglutinin khảm, protein vỏ ngoài của virus, protein cấu trúc của virus, protein vỏ của virus, protein bọc virus. Kháng thể đơn dòng có nguồn gốc thực vật có thể bao gồm kháng thể đơn dòng khảm người-chuột, ví dụ, nhưng không giới hạn đối với C2B8. VLP có nguồn gốc thực vật có thể chứa hemagglutinin gây bệnh cúm.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất protein, hoặc protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật, như được mô tả ở trên (Phương pháp B), trong đó axit nucleic mã hóa các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc, được đưa vào thực vật theo phương thức tạm thời. Theo cách khác, axit nucleic được tích hợp ổn định vào trong hệ gen thực vật.

Sáng chế đề xuất phương pháp bào chế VLP có nguồn gốc thực vật như đã mô tả ở trên (phương pháp B) bao gồm thêm bước tách các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc, trong phân đoạn đã lọc từ mảnh vụn tế bào và các vật liệu không tan. Bước tách có thể được thực hiện bằng cách ly tâm, bằng cách lọc sâu, hoặc bằng cách kỵ tâm và lọc sâu có khuấy để tạo ra phân đoạn sạch. Các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật có thể được tinh chế thêm bằng cách sắc ký, ví dụ, chiết tách trong có thể được tinh chế sử dụng nhựa trao đổi cation, nhựa ái lực, sắc ký loại trừ kích cỡ, hoặc kết hợp các cách này.

Các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật có thể bao gồm các hình hoa hồng từ các protein, các phức protein, các hạt protein có kích cỡ nano, các kháng thể, các kháng thể đơn dòng, VLP. VLP có thể bao gồm một hoặc nhiều polypeptit HA cúm. Protein siêu cấu trúc có thể là protein siêu cấu trúc khảm, ví dụ, kháng thể đơn dòng có thể là kháng thể đơn dòng khảm, hoặc polypeptit HA cúm, có thể là polypeptit HA khảm. Nếu protein siêu cấu trúc là VLP thì VLP có nguồn gốc thực vật có thể bao gồm thêm hoạt tính đông kết hồng cầu.

Không muốn bị bó buộc bởi lý thuyết, VLP được tạo ra từ thực vật chứa các lipid có nguồn gốc thực vật, có thể gây ra đáp ứng miễn dịch mạnh hơn VLP được tạo ra trong các hệ thống sản xuất khác và đáp ứng miễn dịch gây ra bởi VLP được bào chế từ thực vật này mạnh hơn so với đáp ứng miễn dịch gây ra bởi các vắc xin virus sống hoặc đã được làm suy yếu hoàn toàn.

Chế phẩm chứa chất chiết protein thu được từ tế bào chủ là hệ phức và thường chứa các thành phần trong tế bào và ngoài tế bào cùng với protein hoặc siêu cấu trúc quan tâm

mà cần được phân lập. Sự bào chế phân đoạn vô bào được theo sau bởi bước phân lập các protein và các thành phần trong tế bào là có lợi do protein hoặc vi cấu trúc quan tâm có thể được làm giàu và làm tăng hiệu quả trong quy trình sản xuất. Có quy trình đơn giản hơn, bao gồm ít hơn các bước cần thiết, có thể làm tăng năng suất đáng kể, và giảm chi phí. Ngoài ra, đã phát hiện ra rằng quy trình phân cắt thành tế bào sử dụng các enzym phân hủy thành tế bào làm tăng năng suất protein siêu cấu trúc thậm chí nếu các tế bào nguyên sinh không còn nguyên vẹn trong quy trình chiết tách. Không muốn bị bó buộc bởi lý thuyết, bước phân cắt thành tế bào có thể làm mất các thành phần polyme trong thành tế bào và trợ giúp trong việc giải phóng các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc, các chất khác liên quan trong thành tế bào. Phương thức này có thể còn làm giảm thiểu sự nhiễm bẩn của các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc, trong các thành phần trong tế bào.

Các phương pháp phân cắt thành tế bào đã biết, và các hỗn hợp pha chế enzym, phân cắt thành tế bào có thể thay đổi. Sáng chế không bị giới hạn bởi phương pháp phân cắt thành tế bào được sử dụng.

Các phương pháp được mô tả trong sáng chế dẫn đến ít sự gián đoạn hơn, và sự nhiễm bẩn của chất chiết protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật khi so với các phương pháp sản xuất protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật bao gồm sự đồng thể hóa, trộn hoặc nghiền. Các phương pháp được mô tả trong sáng chế đề xuất phân đoạn vô bào của mô thực vật và đó có thể duy trì sự toàn vẹn của các tế bào nguyên sinh và các thành phần của chúng. Phương pháp như được mô tả trong sáng chế là hữu hiệu trong việc tinh chế các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc, thậm chí nếu các tế bào nguyên sinh, hoặc phần của các tế bào nguyên sinh, làm mất tính nguyên vẹn và không còn nguyên vẹn.

Các phương pháp này tạo ra năng suất protein hoặc protein siêu cấu trúc cao hơn so với các phương pháp chiết tách protein siêu cấu trúc bao gồm các kỹ thuật phá vỡ mô tiêu chuẩn, ví dụ, đồng thể hóa, trộn hoặc nghiền. Năng suất cao hơn một phần có thể do sự giảm của các lực cắt mà phá vỡ sự nguyên vẹn trong cấu trúc của các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc, và trong trường hợp của VLP, là vỏ ngoài lipid. Sự thu protein, hoặc protein siêu cấu trúc, từ phân đoạn vô bào có thể có lợi, do các phân đoạn vô bào được giảm đáng kể, hoặc không có các protein tế bào chất. Do đó, sự tách protein siêu cấu trúc từ các protein và vật chất khác, gồm các monome, các dime, các trime hoặc các phân đoạn của protein siêu cấu trúc, trong phân đoạn vô bào được thực hiện dễ dàng. Tuy nhiên, có

thể còn thu được năng suất protein, hoặc protein siêu cấu trúc cao hơn bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong sáng chế, thậm chí nếu chế phẩm không bào, hoặc một phần của chế phẩm không bào không còn nguyên vẹn.

Các glycoprotein, bao gồm các glycoprotein siêu cấu trúc, ví dụ, các kháng thể đơn dòng, mà được tiết vào không bào chứa N-glycan với phần trăm lớn hơn mà đã hoàn thành sự trưởng thành của chúng và bao gồm các gốc N-acetylglucosamin hoặc galactosa tận cùng (các N-glycan phức), so với các phương pháp chiết tách mà không phân cắt thành tế bào, ví dụ, thực vật được chiết tách bằng máy trộn. Các glycoprotein siêu cấu trúc, ví dụ, các kháng thể đơn dòng, bao gồm các N-glycan phức đã được phát hiện là thể hiện tính chất có lợi gồm thời gian bán hủy trong dòng máu tăng so với các kháng thể đơn dòng chứa các gốc mannoza ở đầu chuỗi (các N glycan chưa trưởng thành).

Sử dụng sự phân cắt thành tế bào bằng enzym có thể giải phóng bể chứa kháng thể không bào chứa các N-glycan đã hoàn toàn trưởng thành. Phương pháp chiết tách có thể cho phép thu hồi quần thể đã được làm giàu, hoặc quần thể đồng đều gồm các kháng thể được glycosyl hóa mang các N-glycan phức, tách các dạng chưa trưởng thành của các kháng thể được glycosyl hóa trong phân đoạn tế bào nguyên sinh. Nếu bể chứa kháng thể mang các N-glycan chưa trưởng thành được mong muốn, phân đoạn tế bào nguyên sinh có thể được giữ lại và các kháng thể được tinh chế từ phân đoạn tế bào nguyên sinh.

VLP trong sáng chế còn được đặc trưng là thể hiện hoạt tính đông kết hồng cầu cao hơn VLP thu được sử dụng các kỹ thuật phá vỡ mô tiêu chuẩn. Hoạt tính đông kết hồng cầu được cải thiện này có thể do năng suất lớn hơn của VLP nguyên vẹn (ít monome hoặc trime HA hơn trong dung dịch), năng suất lớn hơn của VLP với các màng bọc lipid nguyên vẹn, hoặc kết hợp của chúng.

Các vắc xin được tạo ra sử dụng VLP cung cấp ưu điểm so với các vắc xin được bào chế từ các virus sống nguyên, mà chúng không gây nhiễm. Do đó, ngăn chặn sinh học không phải là vấn đề và không cần thiết cho sự sản xuất. VLP tạo thành từ cây tạo ra ưu điểm khác bằng cách cho phép hệ thống biểu hiện được sinh trưởng trong nhà kính hoặc trên cánh đồng, do đó hơn đáng kể và thích hợp với quy mô lớn.

Ngoài ra, thực vật không chứa các enzym có liên quan đến sự tổng hợp và thêm các gốc axit sialic vào protein. Các VLP có thể được sản xuất khi không có mặt neuraminidaza

(NA), và không cần thiết phải biểu hiện đồng thời NA, hoặc để xử lý các tế bào sản xuất hoặc chiết tách với sialidaza (neuraminidaza), bảo đảm sự sản xuất VLP trong thực vật. Bản chất kỹ thuật của sáng chế không nhất thiết mô tả tất cả các đặc điểm của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Đặc trưng này và các đặc trưng khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn từ sự mô tả sau đây trong đó có tham khảo các hình vẽ kèm theo trong bản mô tả:

Fig. 1 trình bày sự biểu diễn bằng sơ đồ của cấu trúc biểu hiện dựa trên CPMVHT (cấu trúc 685) cho biểu hiện của hemagglutinin H5 A/Indonesia/5/05.

Fig. 2 trình bày A) trình tự axit nucleic (SEQ ID NO. 1) của một phần của cấu trúc để biểu hiện H5/Indo (cấu trúc số 685) từ PacI (ngược dòng của chất tăng xúc tác 35S) đến AscI (trực tiếp xuôi dòng của đầu NOS). Trình tự ghi mã của H5 từ A/Indonesia/5/2005 được gạch dưới. Fig. 2B trình bày trình tự axit nucleic (SEQ ID NO. 2) của hemagglutinin H5 A/Indonesia/5/05 được mã hóa bởi cấu trúc số 685.

Fig. 3 trình bày sự mô tả đặc điểm của các cấu trúc chứa hemagglutinin (HA) bằng sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC). Sau khi ly tâm chất chiết thực vật đã phân cắt, giọt được huyền phù hóa lại và được tách phân đoạn bằng SEC. Fig. 3A trình bày hàm lượng tổng cộng của protein tan trên một phân đoạn (các tam giác đậm, % của mức lớn nhất, trục Y bên trái; được xác định sử dụng phương pháp Bradford). Hoạt tính đông kết hồng cầu của các phân đoạn được thu gom (các thanh đậm, trục Y bên phải) cũng được trình bày. Fig. 3B trình bày sự phân tích SDS-PAGE của các phân đoạn được tách rửa bằng SEC. Các phân đoạn đã được kết tủa bằng axeton và được huyền phù hóa lại trong 1/40 thể tích của Gel được nhuộm bằng dung dịch Coomassie R-250 0,1%. VLP đã tinh chế được chạy làm mẫu đối chứng. Dải tương ứng với monome HA0 được chỉ ra bởi mũi tên. MW - các tiêu chuẩn trọng lượng phân tử (kDa); C - VLP đã tinh chế (mẫu đối chứng); các làn đường 7 đến 10 và 14 đến 16 tương ứng với số phân đoạn được giải hấp từ phân tích SEC, được trình bày trong Fig. 3A.

Fig. 4 trình bày sự so sánh của các biên dạng protein thu được sau khi phân cắt bằng enzym và bằng sự đồng thể hóa bằng phương pháp cơ học sử dụng máy khuấy đồng hóa Comitrol™. Các mẫu được xử lý trong chất đệm mang mẫu biến tính và các protein được tách bằng phân tích SDS-PAGE các phân đoạn giải hấp. Gel được nhuộm bằng dung dịch

Coomassie R-250 0,1%. MW - các tiêu chuẩn trọng lượng phân tử (kDa); làn đường 1 – 25 µl hỗn hợp enzym; làn đường 2 – 25 µl sự phân cắt bằng enzym của các mô thực vật và làn đường 3 – 5 µl chất chiết thu được bằng máy khuấy đồng thể Comitrol.

Fig. 5 trình bày trình tự axit nucleic (SEQ ID NO: 9) của cấu trúc biểu hiện HA bao gồm đoạn khởi động alfalfa plastoxyanin và 5' UTR, trình tự ghi mã hemagglutinin của H5 từ A/Indonesia/5/2005 (cấu trúc # 660), alfalfa plastocyanin 3' UTR và các trình tự kết thúc.

Fig. 6 trình bày sự thu giữ của HA-VLP trên nhựa trao đổi cation trực tiếp tạo thành sự tách của HA-VLP trong phân đoạn vô bào. Các mẫu được xử lý trong chất đệm nạp mẫu không khử, biến tính và các protein được tách bằng SDS-PAGE. Gel được nhuộm bằng dung dịch Coomassie R-250 0,1%. Làn 1: Phân đoạn vô bào sau khi ly tâm, làn 2-3: Phân đoạn vô bào sau khi vi lọc tiếp theo; làn 4: Sự nạp lên cột trao đổi cation; làn 5: Chảy qua phân đoạn trao đổi cation. Làn 6; sự giải hấp từ trao đổi cation; được cô đặc 10 lần; làn 7: Các tiêu chuẩn trọng lượng phân tử (kDa).

Fig. 7 trình bày biên dạng từ sự phân tích theo dõi hạt nano (NTA) của H5/Indo VLP (Fig. 7A) và H1/Cal VLP (Fig. 7B) sau khi làm sạch mà không thêm NaCl vào chất đệm phân cắt và H1/Cal VLP (Fig. 7C) có thêm NaCl vào chất đệm phân cắt. Các thử nghiệm NTA đã được thực hiện với NanoSight LM20 (NanoSight, Amesbury, UK). Dụng cụ được trang bị với máy phát tia laze xanh (405 nm), khoang chứa mẫu và vòng tròn bằng polyme chứa flo Viton. Các hình ảnh đã được ghi tại nhiệt độ trong phòng và được phân tích sử dụng phần mềm NTA 2.0. Các mẫu đã được ghi trong 60 giây. Lá chắn sáng và độ khuếch đại được chọn bằng tay để mà thu được sự phân giải hạt tối ưu.

Fig. 8 trình bày Western blot của chất chiết của H3/Brisbane VLP được tạo ra bằng sự phân cắt bằng enzym sử dụng các chất đệm khác nhau. Làn 1) tiêu chuẩn HA tái tổ hợp nguyên chất (5 µg, từ Immune Technology Corp. IT-003-0042p) Làn 2 đến 5 chứa 7 µl chất chiết enzym được ly tâm được thực hiện trong các chất đệm sau: Làn 2) Mannitol 600mM + xitrat 125mM + 75mM NaPO₄ + 25mM EDTA + bisulfua 0,04% pH=6,2, Làn 3) Mannitol 600mM + xitrat 125mM + NaPO₄ 75mM + EDTA 50mM + bisulfua 0,04% pH=6,2, Làn 4) Mannitol 200mM + xitrat 125mM + NaPO₄ 75mM + EDTA 25mM + bisulfua 0,03% pH=6,2, Làn 5) Mannitol 200mM + xitrat 125mM + NaPO₄ 75mM +

EDTA 50mM + bisulfua 0,03% pH=6,2. Mũi tên biểu diễn tín hiệu phát hiện miễn dịch của HA0.

Fig. 9 trình bày trình tự của đoạn ADN được tổng hợp cho sự kết hợp của cấu trúc #590 (đoạn LC; (SEQ ID NO.15).

Fig. 10 trình bày trình tự của đoạn ADN được tổng hợp cho sự kết hợp của cấu trúc #592 (đoạn HC; (SEQ ID NO.16).

Fig. 11A và Fig. 11B lần lượt trình bày sự biểu diễn bằng sơ đồ của các cấu trúc #595 (Fig. 11A) và #R472 (Fig. 11B).

Fig. 12 so sánh SDS-PAGE của các kháng thể được tinh chế từ các chất chiết được tạo ra bằng sự phá vỡ cơ học (sự chiết tách bằng máy trộn) và sự phân cắt bằng enzym của các thành tế bào. Đối với mỗi phương pháp chiết tách, hai mẻ được xử lý và được tinh chế độc lập với nhau.

Fig. 13A trình bày sự so sánh của phần của N-glycan oligomannosit trên C2B8 được tinh chế bằng sự phá vỡ cơ học (sự chiết tách bằng máy trộn) và sự phân cắt bằng enzym của các thành tế bào. Fig. 13B trình bày sự so sánh của phần N-glycan oligomannosit trên C2B8 được tinh chế bằng sự phá vỡ cơ học (sự chiết tách bằng máy trộn) và sự phân cắt bằng enzym của các thành tế bào.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất protein có nguồn gốc thực vật. Đặc biệt hơn, sáng chế đề xuất phương pháp nhằm thu được protein, hoặc protein, hoặc protein, hoặc protein siêu cấu trúc từ thực vật và mô thực vật.

Sự mô tả sau đây là một phương án ưu tiên.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất protein, hoặc protein siêu cấu trúc quan tâm. Protein quan tâm có thể có mặt trong không bào hoặc ngăn ngoài tế bào, tương ứng với phần tế bào không bao gồm ngăn tế bào nguyên sinh/tế bào trần. Phương pháp bao gồm loại bỏ, phân cắt hoặc cả phân cắt và loại bỏ thành tế bào thực vật có bản chất là xenluloza bao quanh tế bào thực vật. Bằng cách phân cắt thành tế bào, các thành phần polyme của thành tế bào được giãn ra, và protein hoặc các protein, hoặc các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc quan tâm có thể được giải phóng nhanh hơn. Bằng cách sử dụng phương

pháp này, protein hoặc các protein, hoặc các protein, hoặc các protein cấu trúc quan tâm được làm giàu do ngăn tế bào nguyên sinh/tế bào trần mà chứa các protein tế bào chủ chủ yếu và các thành phần được tách từ không bào. Như được lưu ý sau, phương pháp như được đề xuất trong sáng chế vẫn còn có hiệu quả trong việc thu protein hoặc siêu cấu trúc protein quan tâm, nếu trong suốt quy trình, tính nguyên vẹn của ngăn tế bào nguyên sinh/tế bào trần bị mất, nếu ngăn tế bào nguyên sinh/tế bào trần không nguyên vẹn, và nếu phần protein tế bào chủ và các thành phần từ ngăn tế bào nguyên sinh/tế bào trần có trong phân đoạn vô bào. Sử dụng các phương pháp được mô tả sau, nếu tính nguyên vẹn của ngăn tế bào nguyên sinh/tế bào trần bị mất, protein hoặc siêu cấu trúc protein có thể vẫn được tách khỏi các cơ quan tế bào nguyên vẹn, bao gồm ty lập thể, lục lạp và các cơ quan tế bào khác, và vẫn có thể thu được kết quả có lợi.

Theo "protein" hoặc "protein quan tâm" (các thuật ngữ này được sử dụng có thể thay cho nhau), có nghĩa là protein, hoặc nhóm con protein được mã hóa bởi trình tự nucleotit, hoặc miên ghi mã, được biểu hiện trong thực vật hoặc phần của thực vật. Các protein có thể có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1 đến 100 kDa hoặc trọng lượng phân tử bất kỳ nằm trong khoảng này, ví dụ, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 kDa, hoặc bất kỳ trọng lượng phân tử nằm giữa các số này. Protein có thể là monome, dime, trime, hoặc polyme.

Siêu cấu trúc protein, ngoài ra còn được gọi là protein siêu cấu trúc, siêu cấu trúc protein, hoặc protein siêu cấu trúc, là cấu trúc protein gồm có hai hoặc nhiều polypeptit. Các polypeptit có thể giống nhau, hoặc khác nhau, nếu khác nhau, chúng có thể có mặt ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1:1 đến 10:1 hoặc lớn hơn. Các protein siêu cấu trúc, có thể bao gồm, nhưng không giới hạn đối với, các hình hoa hồng tạo thành từ các protein, phức hợp protein, các hạt nano protein, glycoprotein, các kháng thể, kháng thể polyclonal, kháng thể đơn dòng, các kháng thể đơn dòng chuỗi duy nhất, hoặc virus như các hạt, proteasom, metabolon, cụm sao chếp, tái tổ hợp phức hợp, quang phức hợp, khu phức hợp vận chuyển màng, lỗ chân lông hạt nhân phức hợp, protein khảm, khảm phức hợp protein, các hạt nano protein khảm, glycoprotein khảm, khảm kháng thể, kháng thể đơn dòng khảm, khảm duy nhất đơn dòng kháng thể chuỗi, hoặc hemagglutinin khảm (HA). Nếu siêu cấu trúc protein là VLP, VLP có thể được chọn từ nhóm gồm protein vỏ ngoài của virus, protein

cấu trúc của virus, protein vỏ của virus, và protein bọc virus. VLP có nguồn gốc thực vật có thể (HA) cúm.

Thông thường siêu cấu trúc protein (siêu cấu trúc protein), khi kết hợp, là lớn, ví dụ, có trọng lượng phân tử lớn hơn 75kDa, ví dụ, nằm trong khoảng từ 75 đến 1500 kDa hoặc bất kỳ trọng lượng phân tử nằm trong khoảng này. Ví dụ, các siêu cấu trúc protein có thể có trọng lượng phân tử từ khoảng 75, 80, 85, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500 kDa, hoặc bất kỳ lượng giữa các giá trị đã nêu, các nhóm con kết hợp với nhau tạo ra siêu cấu trúc protein có thể có trọng lượng phân tử nhỏ hơn, ví dụ, mỗi nhóm con có trọng lượng phân tử từ khoảng 1 kDa đến khoảng 500 kDa, hoặc bất kỳ trọng lượng phân tử nằm trong khoảng này. Siêu cấu trúc protein có thể bao gồm protein thể hiện cấu trúc bậc hai, với một hoặc nhiều hydro amino axit được liên kết, ví dụ, với các gốc trong đường xoắn ốc, một cấu trúc bậc ba, có một cấu hình 3 chiều, hoặc một cấu trúc bậc bốn có sự sắp xếp của nhiều protein được gấp cuộn hoặc các phân tử protein được xoắn mà tạo thành phức gồm nhiều đơn vị con.

Phức nhiều protein (hoặc phức protein) có thể bao gồm nhóm gồm hai hoặc nhiều chuỗi polypeptit được liên kết. Nếu chuỗi polypeptit khác nhau chứa các miền protein khác nhau thì phức nhiều protein tạo ra có thể có nhiều chức năng xúc tác. Phức protein cũng có thể là một multienzym polypeptit, bao gồm nhiều miền xúc tác trong chuỗi polypeptit đơn. Phức protein thường trong dạng cấu trúc bậc bốn. Ví dụ về các phức protein mà thường có thể không còn nguyên vẹn sử dụng các phương thức phân lập protein tiêu chuẩn, nhưng có thể thu được sử dụng các phương pháp được mô tả trong sáng chế bao gồm các proteasom (để phân hủy các peptit và các protein), các metabolon (để sản xuất năng lượng oxy hóa), các ribosom (để tổng hợp protein; ví dụ, như được mô tả trong Pereira-Leal, J.B.; et. al., 2006, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.,361(1467):507–517), các phức phiên mã, các phức quang tổng hợp, các phức vận chuyển qua màng, các phức hệ lỗ nhân. Phương pháp này có thể được sử dụng để thu được các phức protein mà được đặc trưng bởi có các tương tác miền protein-miền protein ổn định hoặc yếu hơn.

Ví dụ về protein, hoặc siêu cấu trúc protein bao gồm, ví dụ, nhưng không giới hạn đối với, enzym công nghiệp, ví dụ, xelulaza, xylanaza, proteaza, peroxidaza, subtilisin, phân phụ protein, chất dinh dưỡng, sản phẩm bổ sung giá trị, hoặc phân đoạn của chúng để dùng trong thức ăn gia súc, thực phẩm, hoặc sử dụng cả trong thức ăn gia súc và thực phẩm, protein có hoạt tính dược phẩm, ví dụ, nhưng không giới hạn đối với các yếu tố sinh trưởng, các chất điều hòa sinh trưởng, các kháng thể, các kháng nguyên, và các phân đoạn của chúng, hoặc các dẫn xuất của chúng có ích cho sự miễn dịch hoặc chủng ngừa và tương tự. Các protein bổ sung có thể bao gồm, nhưng không giới hạn đối với, các interleukin, ví dụ, một hoặc nhiều IL-1 đến IL-24, IL-26 và IL-27, các cytokin, Erythropoietin (EPO), insulin, G-CSF, GM-CSF, hPG-CSF, M-CSF hoặc sự kết hợp chúng, các interferon, ví dụ, interferon-alpha, interferon-beta, interferon-gama, các yếu tố đông máu, ví dụ, yếu tố VIII, yếu tố IX, hoặc tPA hGH, các thụ thể, chất chủ vận thụ thể, kháng thể, neuropolypeptit, insulin, vắc xin, các yếu tố sinh trưởng, ví dụ, nhưng không giới hạn đối với, yếu tố sinh trưởng biểu bì, yếu tố sinh trưởng keratinocyt, yếu tố sinh trưởng biến nạp, chất điều hòa sinh trưởng, kháng nguyên, kháng nguyên tự động, các phân đoạn của chúng, hoặc sự kết hợp chúng.

Ví dụ không giới hạn về siêu cấu trúc protein là kháng thể. Kháng thể là các glycoprotein có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 100 đến 1000 kDa, hoặc bất kỳ giá trị nằm trong khoảng này. Kháng thể bao gồm bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, được kết nối bởi các liên kết disulphua. Ví dụ, nhưng không bị xem là giới hạn, mỗi chuỗi nhẹ có thể có trọng lượng phân tử xấp xỉ 25 kDa, ví dụ, nằm trong khoảng từ 20 kDa đến 30 kDa hoặc số bất kỳ giữa khoảng này, hoặc hơn nữa, ví dụ, nằm trong khoảng từ 20 đến 300 kDa hoặc số bất kỳ giữa khoảng này, và gồm có hai miền, một miền biến đổi (V_L) và một miền cố định (C_L). Mỗi chuỗi nặng có thể có trọng lượng phân tử xấp xỉ 50 kDa, ví dụ, nằm trong khoảng từ 30 đến 75 kD, hoặc số bất kỳ giữa khoảng này, hoặc hơn nữa, ví dụ, nằm trong khoảng từ 30 đến 500 kDa, hoặc số bất kỳ trong khoảng này, và gồm có miền cố định và miền biến đổi. Các chuỗi nặng và nhẹ chứa số đoạn đồng đều gồm có các nhóm tương tự nhưng không giống nhau của các trình tự amino axit. Các đơn vị đồng đều gồm có khoảng 110 amino axit và được gọi là các miền globulin miễn dịch. Chuỗi nặng chứa một miền biến đổi (V_H) và ba hoặc bốn miền cố định (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , và C_{H4} , phụ thuộc vào loại kháng thể hoặc loại kiểu hình). Vùng giữa các miền C_{H1}

và C_{H2} được gọi là vùng bản lề và cho phép sự linh động giữa hai cánh tay Fab của phân tử kháng thể hình chữ Y, cho phép chúng mở và đóng để chứa liên kết với hai yếu tố quyết định kháng nguyên cách nhau bởi một khoảng cách cố định.

Ví dụ không giới hạn khác về siêu cấu trúc protein là VLP. VLP có thể bao gồm dạng tiền chất HA0, hoặc các miền HA1 hoặc HA2 được giữ lại với nhau bằng cách tạo thành các cầu nối disulphua. VLP có thể có cỡ trung bình nằm trong khoảng từ 20 nm đến 1 µm, hoặc giá trị bất kỳ nằm trong khoảng này, ví dụ, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 120, 130, 140, 150 160, 170, 180, 190, hoặc 200 nm, hoặc giá trị bất kỳ nằm trong khoảng này, ví dụ, 100 nm, và có thể bao gồm màng lipid.

Các protein, hoặc protein siêu cấu trúc, hơn nữa có thể bao gồm một hoặc nhiều chất béo, phospholipit, axit nucleic, màng hoặc tương tự. Hai hoặc nhiều polypeptit có thể được kết nối bởi một liên kết cộng hóa trị, cầu nối disulphua, tương tác điện, thu hút kỵ nước, lực van der Waals, liên kết hydro hoặc tương tự. Ví dụ về siêu cấu trúc protein là kháng thể đơn dòng, kháng thể đơn dòng khảm, kháng thể đơn dòng chuỗi đơn, hoặc hạt tương tự virus (VLP) mà có thể được bao, hoặc không được bao, ví dụ, protein vỏ ngoài của virus, protein cấu trúc của virus, protein vỏ của virus, hoặc protein vỏ virus.

Protein, hoặc protein siêu cấu trúc, có thể được sản xuất trong các tế bào chủ thích hợp bao gồm các tế bào chủ thực vật, và nếu muốn, được tinh chế thêm. Trong khi kháng thể đơn dòng khảm, VLP cúm, và VLP khảm bệnh cúm được ví dụ trong sáng chế, các phương pháp được mô tả trong sáng chế có thể được sử dụng cho bất kỳ protein có nguồn gốc thực vật trong chất dịch bào tương hoặc protein siêu cấu trúc, hoặc bất kỳ protein có nguồn gốc thực vật hoặc protein siêu cấu trúc mà định vị trong, hoặc được tiết vào không bào.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp thu các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật. Phương pháp bao gồm lấy thực vật hoặc vật chất thực vật chứa các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật, được định vị trong không bào; sản xuất phân đoạn tế bào nguyên sinh/tế bào trần, và phân đoạn vô bào từ vật chất thực vật, phân đoạn vô bào chứa các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật, và thu hồi phân đoạn vô bào. Nếu muốn, các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật có thể được tinh chế từ phân đoạn vô bào.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất protein hoặc protein siêu cấu trúc, trong đó protein hoặc protein siêu cấu trúc bao gồm vỏ ngoài lipit có nguồn gốc thực vật, ví dụ, VLP bao gồm vỏ ngoài lipit có nguồn gốc thực vật. Phương pháp bao gồm lấy thực vật, hoặc vật chất thực vật bao gồm protein siêu cấu trúc quan tâm, ví dụ, VLP, xử lý thực vật hoặc vật chất thực vật với chế phẩm enzym để tạo ra một hoặc nhiều phức protein không bào và phân đoạn tế bào nguyên sinh/tế bào trần, và tách một hoặc nhiều phức protein không bào từ phân đoạn vô bào. Một hoặc nhiều phức protein không bào chứa protein siêu cấu trúc hoặc VLP bao gồm vỏ ngoài lipit có nguồn gốc thực vật.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất protein hoặc protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật, bao gồm lấy thực vật hoặc vật chất thực vật chứa protein, hoặc protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật, phân cắt vật chất thực vật sử dụng chế phẩm enzym phân hủy thành tế bào để tạo ra phân đoạn đã phân cắt, và lọc phân đoạn đã phân cắt để tạo ra phân đoạn đã lọc và thu hồi protein, hoặc protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật, từ phân đoạn đã lọc. Trong phương pháp này, tính nguyên vẹn của các tế bào nguyên sinh có thể không cần thiết.

Tế bào nguyên sinh là tế bào thực vật mà có thành tế bào bị triệt tiêu hoàn toàn hoặc một phần. Tế bào có áo ngoài bị tiêu có thể có thành tế bào bị triệt tiêu một phần. Tế bào nguyên sinh, tế bào trần, hoặc cả tế bào nguyên sinh và tế bào trần (tế bào nguyên sinh/tế bào trần) có thể được sử dụng như được mô tả trong sáng chế, và các thuật ngữ được sử dụng trong sáng chế có thể thay thế cho nhau. Thành tế bào có thể bị phá vỡ và được loại bỏ cơ học (ví dụ, thông qua sự đồng thể hóa, trộn), thành tế bào có thể bị phân cắt hoàn toàn hoặc một phần bằng enzym, hoặc thành tế bào có thể được loại bỏ sử dụng kết hợp các phương pháp cơ học và enzym, ví dụ, sự đồng thể hóa, sau đó xử lý với enzym để phân cắt thành tế bào. Các tế bào nguyên sinh có thể còn thu được từ các tế bào thực vật được nuôi cấy, ví dụ, các tế bào thực vật được nuôi cấy lỏng, hoặc các tế bào thực vật được nuôi cấy rắn.

Tài liệu tham khảo chuẩn phân tích đưa ra các nguyên tắc chung về nuôi cấy mô thực vật, nuôi cấy tế bào thực vật, và sản xuất của tế bào nguyên sinh, tế bào trần và các tế bào tương tự bao gồm: Introduction to Plant Tissue Culture, bởi MK Razdan 2nd Ed. (Nhà xuất bản khoa học, 2003; đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo), hoặc xem ví dụ, URL sau: molecular-plant-biotechnology.info/plant-tissue-culture/protoplast-isolation.htm.

Phương pháp và kỹ thuật liên quan đến sự sản xuất tế bào nguyên sinh (hoặc tế bào trần) và sự thao tác được xem lại trong, ví dụ, Davey MR et al., 2005 (Biotechnology Advances 23:131-171; được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo). Tài liệu tham khảo chuẩn phân tích đưa ra các phương pháp nói chung và các nguyên tắc của sinh hóa protein, sinh học phân tử và tương tự bao gồm, ví dụ, Ausubel et al, Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York (1998 and Supplements to 2001; được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo); Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989 (được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo); Kaufman et al, Eds., Handbook Of Molecular And Cellular Methods In Biology And Medicine, CRC Press, Boca Raton, 1995 (được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo); McPherson, Ed., Directed Mutagenesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1991 (được đưa vào đơn làm tài liệu tham khảo).

Các enzym được sử dụng để phân cắt hoặc phân hủy thành tế bào thực vật để giải phóng tế bào nguyên sinh hoặc tế bào trần được người có chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật biết và có thể bao gồm xelulaza (EC 3.2.1.4), pectinaza (EC 3.2.1.15), xylanaza (EC 3.2.1.8), chitinaza (EC 3.2.1.14), hemixelulaza, hoặc kết hợp các chất này. Các ví dụ không giới hạn về enzym bao gồm hỗn hợp enzym nhiều thành phần bao gồm xelulaza, hemixelulaza, và pectinaza, ví dụ, MACEROZYMETM (chứa xấp xỉ: Xelulaza: 0,1U/mg, Hemixelulaza: 0,25U/mg, và Pectinaza: 0,5U/mg). Các ví dụ khác về enzym, hỗn hợp enzym thương mại và các nhà cung cấp được nêu ra trong bảng 1 (xem: Introduction to Plant Tissue Culture, by MK Razdan 2nd Ed., Science Publishers, 2003).

Các tên khác, và các loại xelulaza bao gồm endo-1,4- β -D-glucanaza; β -1,4-glucanaza; β -1,4-endoglucan hydrolaza; xelulaza A; xelulosin AP; endoglucanaza D; xelulaza kiềm; xelulaza A 3; xeludextrinaza; 9.5 xelulaza; avicelaza; panxelaza SS và 1,4-(1,3;1,4)- β -D-glucan 4-glucanohydrolaza. Các tên, và các loại pectinaza khác (polygalacturonaza) bao gồm pectin depolymeraza; pectinaza; endopolygalacturonaza; pectolaza; pectin hydrolaza; pectin polygalacturonaza; endo-polygalacturonaza; poly- α -1,4-galacturonit glycanohydrolaza; endogalacturonaza; endo-D-galacturonaza và poly(1,4- α -D-galacturonit) glycanohydrolaza. Các tên, và các loại xylanaza khác bao gồm hemixelulaza, endo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -xylan 4-xylanohydrolaza; endo-1,4-xylanaza; xylanaza; β -1,4-xylanaza; endo-1,4-xylanaza; endo- β -1,4-xylanaza; endo-1,4- β -D-xylanaza; 1,4- β -

xylan xylanohydrolaza; β -xylanaza; β -1,4-xylan xylanohydrolaza; endo-1,4- β -xylanaza; β -D-xylanaza. Các tên, và các loại chitinaza khác bao gồm chitodextrinaza; 1,4- β -poly-*N*-axetylglucosaminidaza; poly- β -glucosaminidaza; β -1,4-poly-*N*-axetyl glucosaminidaza; poly[1,4-(*N*-axetyl- β -D-glucosaminid)] glycanohydrolaza.

Bảng 1: Các ví dụ không giới hạn về các enzym có sẵn trên thị trường để phân lập tế bào nguyên sinh

Nguồn	Enzym	Nhà cung cấp
Xelulaza		
Xelulaza ONOZUKA R-10	<i>Trichoderma viride</i>	Kinki Yakult Mfg. Co. Ltd. 8-12, Shingikancho Nishinomiya, Japan
Xelulaza ONOZUKA RS	<i>T. viride</i>	Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan
Xelulaza YC	<i>T. viride</i>	Seishin Pharma Co. Ltd. 9-500-1, Nagareyama Nagareyama-shi, Chiba-kan, Japan
Xelulaza CEL	<i>T. viride</i>	Cooper Biomedical Inc. Malvern, PA, USA
Xelulysin	<i>T. viride</i>	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Driselaza	<i>Irpex locteus</i>	Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan
Melcelaza P-1	<i>T. viride</i>	Meiji Seiki Kaisha Ltd. No.8, 2-Chome Kyobashi, Chou-Ku, Japan
Multifect CX GC	<i>T. viride</i>	Genencor
Multifect CX B	<i>T. viride</i>	Genencor
Hemixelulaza		
Hellcaza	<i>Helix pomatia</i>	Industrie Biologique Francaise, Gennevilliers, France
Hemixelulaza	<i>Aspergillus niger</i>	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Hemixelulaza H-2125	<i>Rhizopus</i> sp.	Sigma, Munchen
Rhozyme HP 150	<i>Aspergillus niger</i>	Genencor Inc., South San Francisco, CA, USA
Pectinaza		
MACERASE	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Calbiochem, San Diego, CA, USA
MACEROZYME R-10	<i>R. arrhizus</i>	Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan
Pectinaza đa nhiệm FE	<i>A. niger</i>	Genencor
PATE	<i>Bacillus polymyza</i>	Farbwerke-Hoechst AG, Frankfurt, FRG
Pectinol	<i>Aspergillus</i> sp.	Rohm and Haas Co. Independence Hall West, Philadelphia, PA 19105, USA

Pectolyaza Y-23	<i>Aspergillus japonicus</i>	Seishin Pharma Co. Ltd., Japan
Zymolyaza	<i>Arthrobacter luteus</i>	Sigma Chemical Co., USA

Việc chọn một enzym cụ thể hoặc sự kết hợp của các enzym, và nồng độ và điều kiện phản ứng có thể phụ thuộc vào loại mô thực vật được sử dụng từ tế bào nguyên sinh và thu được phân đoạn vô bào chứa VLP. Hỗn hợp của xelulaza, hemixelulaza và pectinaza, ví dụ, pectinaza MACEROZYME™ hoặc Multifect, có thể được sử dụng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01% đến 2,5% (thể tích/thể tích), ví dụ, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, hoặc 2,5% (thể tích/thể tích), hoặc nồng độ bất kỳ giữa các giá trị nồng độ này. MACEROZYME™ hoặc Multifect có thể được sử dụng một mình, hoặc kết hợp với các enzym, ví dụ, xelulaza, pectinaza, hemixelulaza, hoặc hỗn hợp của các enzym này. Xelulaza có thể được sử dụng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1% đến 5%, ví dụ, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,25, 3,5, 3,75, 4,0, 4,25, 4,5, 4,75, 5,0% (trọng lượng/thể tích) hoặc nồng độ bất kỳ giữa các nồng độ này.

Dung dịch enzym (theo cách khác được gọi là chế phẩm phân hủy thành tế bào, dung dịch phân cắt) sẽ thường chứa chất đệm hoặc hệ thống đệm, chất thẩm thấu, và một hoặc nhiều muối, các cation hóa trị hai hoặc các chất phụ gia khác. Chất đệm hoặc hệ thống đệm được chọn để duy trì pH nằm trong khoảng thích hợp cho hoạt tính enzym và sự ổn định của (các) protein, hoặc VLP, để tinh chế, ví dụ, trong khoảng pH là từ 5,0 đến 8,0, hoặc giá trị bất kỳ trong khoảng này. pH được chọn được sử dụng có thể thay đổi phụ thuộc vào VLP được thu hồi, ví dụ, pH có thể là 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8,0, hoặc bất kỳ pH nằm giữa các giá trị này. Ví dụ về chất đệm hoặc hệ thống đệm bao gồm, nhưng không giới hạn đối với, MES, phosphat, xitrat và các chất tương tự. Một hoặc nhiều chất đệm hoặc hệ thống đệm có thể được kết hợp trong dung dịch enzym (dung dịch phân cắt); một hoặc nhiều chất đệm có thể có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0 mM đến 200 mM, hay bất kỳ nồng độ nằm trong khoảng này, ví dụ, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 hoặc 190 mM hoặc bất kỳ nồng độ nằm giữa các giá trị này. Phụ thuộc vào tính ổn định, thành phần chất thẩm thấu có thể được thêm vào nếu muốn. Osmoticum và nồng độ của nó được chọn để làm tăng cường độ thẩm thấu của dung dịch enzym. Ví dụ về chất thẩm thấu bao

gồm mannitol, sorbitol hoặc các rượu được lên men từ đường khác, polyetylen glycol (PEG) có chiều dài mạch polyme thay đổi, và các chất tương tự. Khoảng nồng độ của chất thẩm thấu có thể thay đổi phụ thuộc vào loại thực vật, loại chất thẩm thấu được sử dụng, và loại mô thực vật được chọn (loài hoặc cơ quan có nguồn gốc, ví dụ, lá hoặc thân)-thông thường khoảng là từ 0M đến 0,8 M, ví dụ, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, or 0,75 M, hoặc giá trị bất kỳ giữa các giá trị này, ví dụ, 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 nM mannitol, hoặc giá trị bất kỳ giữa các giá trị này. Nồng độ của chất thẩm thấu còn có thể được biểu diễn theo phần trăm (trọng lượng/thể tích). Đối với một số loại thực vật hoặc mô, có thể có lợi nếu sử dụng chế phẩm ưu trương nhẹ, mà có thể dễ dàng thực hiện sự tách của màng huyết tương tế bào thực vật khỏi thành tế bào. Osmoticum còn có thể được bỏ qua trong quá trình phân cắt.

Thông số khác để thiết lập cho sự phân cắt thực vật là nhiệt độ. Nhiệt độ có thể được điều chỉnh nếu muốn trong quá trình phân cắt. Khoảng nhiệt độ hữu ích là nằm trong khoảng từ 4°C đến 40 °C hoặc nhiệt độ bất kỳ nằm trong khoảng này, ví dụ, nằm trong khoảng từ 4°C đến 15°C, hoặc nhiệt độ bất kỳ nằm trong khoảng này, ví dụ, nằm trong khoảng từ 4°C đến 22°C, hoặc nhiệt độ bất kỳ nằm trong khoảng này. Phụ thuộc vào nhiệt độ được chọn, các thông số thử nghiệm sự phân cắt khác có thể được điều chỉnh để duy trì các điều kiện chiết tách tối ưu.

Cation, muối hoặc cả hai được thêm vào để cải thiện độ ổn định của huyết tương trong màng tế bào, ví dụ, các cation hóa trị hai như Ca^{2+} , hoặc Mg^{2+} , ở nồng độ từ 0,5 đến 50mM, hoặc nồng độ bất kỳ nằm trong khoảng này, muối, ví dụ, CaCl_2 , NaCl , CuSO_4 , KNO_3 , và các muối tương tự, nằm trong khoảng từ 0 đến 750 mM, hoặc nồng độ bất kỳ nằm trong khoảng này, ví dụ, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 hoặc 750 mM. Các chất phụ gia khác cũng có thể được thêm vào bao gồm chất tạo cang, ví dụ, nhưng không giới hạn đối với, EDTA, EGTA, có nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 200 mM, hoặc nồng độ bất kỳ nằm trong khoảng này, ví dụ, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 mM, hoặc nồng độ bất kỳ nằm trong khoảng này, chất khử để ngăn cản sự oxy hóa như, nhưng không giới hạn đối với, natri bisulfua hoặc axit ascorbic, ở nồng độ từ 0,005 đến 0,4% hoặc nồng độ bất kỳ nằm trong khoảng này, ví dụ, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4%, hoặc nồng độ bất kỳ nằm

trong khoảng này, các chất ức chế enzyme đặc hiệu (xem dưới), và nếu muốn, chất ức chế sự già lá, ví dụ, xycloheximit, kinetin, hoặc một hoặc nhiều polyamin.

Dung dịch phân cắt cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều mannitol có nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 600 mM, NaCl có nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 500 mM, EDTA có nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 50 mM, xenluloza có nồng độ nằm trong khoảng từ 1% đến 2% thể tích/thể tích, pectinaza có nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 1% thể tích/thể tích, natri metabisulfua có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,03 đến 0,04%, xitrat có nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 125 mM hoặc NaPO_4 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 75 mM.

Vật chất thực vật có thể được xử lý để tăng cường sự thâm nhập của enzyme hoặc chế phẩm enzyme vào thành tế bào. Ví dụ, biểu bì của lá có thể được loại bỏ hoặc 'được bóc' trước khi xử lý với chế phẩm enzyme. Vật chất thực vật có thể được cắt thành các mẫu nhỏ (bằng tay, hoặc bằng thiết bị bấm hoặc thiết bị cắt như máy thái Urschel); vật chất thực vật đã cắt có thể được thấm thấu hơn với chế phẩm enzyme dưới chân không một phần (Nishimura and Beevers 1978, Plant Physiol 62:40-43; Newell et al., 1998, J. Exp Botany 49:817-827). Sự nhiễu loạn cơ học của vật chất thực vật có thể còn được áp dụng với các mô thực vật (Giridhar et al., 1989. Tế bào nguyên sinh 151:151-157) trước hoặc trong quá trình xử lý với chế phẩm enzyme. Hơn nữa, các tế bào được nuôi cấy, các canh trường nuôi cấy lỏng hoặc rắn, có thể được sử dụng để bào chế tế bào nguyên sinh hoặc tế bào trần.

Có thể mong muốn sử dụng chế phẩm enzyme mà thiếu, hoặc là có các lipaza hoặc các proteaza đã được khử hoạt tính. Trong một số phương án, một hoặc nhiều chất ức chế proteaza, hoặc lipaza có thể được chứa trong chế phẩm enzyme. Ví dụ về các chất ức chế lipaza bao gồm RHC80267 (SigmaAldrich); ví dụ về các chất ức chế proteaza bao gồm E-64, Na_2EDTA , Pepstatin, aprotinin, PMSF, Pefabloc, Leupeptin, bestatin và các chất tương tự.

Phương pháp trộn hoặc khuấy vật chất thực vật thích hợp trong chế phẩm enzyme có thể được sử dụng. Ví dụ, thực vật có thể được nhẹ nhàng xoay hoặc lắc trong khay hoặc chảo hoặc thông qua máy lắc quay, được nhào trong trống quay hoặc dao động. Biện pháp phòng ngừa cần được thực hiện để giảm thiểu sự hư hại đối với các tế bào nguyên sinh

(và/hoặc tế bào trần) cho đến khi chúng được loại bỏ tạo thành canh phân cắt. Bình phân cắt sẽ được chọn phù hợp.

Ví dụ không giới hạn về chế phẩm enzym chứa 1,5% xelulaza (Onozuka R-10) và 0,375% MACEROZYME™ trong mannitol 500 mM, CaCl₂ 10M và MES 5 mM (pH=5,6) có thể được sử dụng cho sự sản xuất tế bào nguyên sinh (hoặc tế bào trần) từ một số mô *Nicotiana*. Như được mô tả trong bản mô tả, nồng độ của mannitol cũng có thể được thay đổi trong khoảng từ 0 đến 500 mM, hoặc giá trị bất kỳ nằm trong khoảng này. Người có chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã cung cấp thông tin được bộc lộ trong sáng chế, sẽ cho phép xác định chế phẩm enzym thích hợp cho tuổi và chủng của *Nicotiana sp*, hoặc cho các loài khác được sử dụng cho sự sản xuất của VLP.

Khi phá vỡ thành tế bào, hoặc phân cắt một phần thành tế bào, phân đoạn tế bào nguyên sinh (chứa tế bào nguyên sinh và/hoặc tế bào trần), và "phân đoạn vô bào" thu được. Ngoài ra, "phân đoạn đã phân cắt" có thể thu được. Như đã đề cập dưới đây, tính toàn vẹn của phân đoạn tế bào nguyên sinh có thể không cần thiết để tạo ra năng suất protein cao như mô tả trong sáng chế, do đó, phân đoạn vô bào hoặc phân đoạn phân cắt có thể được sử dụng để tách các protein, ví dụ, nhưng không giới hạn đối với, VLP, protein vỏ ngoài của virus, protein cấu trúc của virus, protein vỏ của virus, protein bọc virus.

Theo thuật ngữ "phân đoạn vô bào" có nghĩa là phân đoạn mà thu được sau quá trình phân cắt bằng enzym, hoặc quá trình phân cắt một phần bằng enzym, sử dụng các enzym phân hủy thành tế bào của vật chất thực vật trong sự có mặt của chất thẩm thấu và/hoặc các thành phần khác mà có thể được sử dụng để trợ giúp trong việc duy trì tính nguyên vẹn của tế bào nguyên sinh. Phân đoạn vô bào có thể chứa một hoặc nhiều thành phần xuất hiện từ các tế bào nguyên sinh bị phá vỡ (hoặc tế bào trần). Ví dụ, phân đoạn vô bào có thể chứa các thành phần từ phân đoạn tế bào nguyên sinh với lượng nằm trong khoảng từ 0 đến 50% (thể tích/thể tích) hoặc lượng bất kỳ nằm trong khoảng này, hoặc 0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, hoặc 50% (thể tích/thể tích) hoặc bất kỳ lượng nằm trong khoảng này.

Theo thuật ngữ "phân đoạn đã phân cắt" có nghĩa là phân đoạn còn lại sau quá trình phân cắt bằng enzym, hoặc quá trình phân cắt một phần bằng enzym, sử dụng các enzym

phân hủy thành tế bào của vật chất thực vật, tuy nhiên, tính nguyên vẹn của tế bào nguyên sinh không cần thiết, và phân đoạn đã phân cắt có thể chứa các tế bào nguyên sinh nguyên vẹn, bị phá vỡ hoặc cả tế bào nguyên sinh nguyên vẹn và tế bào nguyên sinh bị phá vỡ. Chế phẩm chứa các enzym phân hủy thành tế bào được sử dụng để sản xuất phân đoạn có thể chứa chất thẩm thấu, hoặc chất thẩm thấu có thể có mặt ở lượng ít hơn so với lượng có trong các quy trình chuẩn được sử dụng để thu tế bào nguyên sinh, hoặc chất thẩm thấu có thể không có trong chế phẩm. Phân đoạn đã phân cắt chứa phân đoạn vô bào và phân đoạn tế bào nguyên sinh/tế bào trần, tuy nhiên, phân đoạn tế bào nguyên sinh/tế bào trần có thể hoặc không còn nguyên vẹn. Phân đoạn đã phân cắt chứa các thành phần trong tế bào và các thành phần ngoài tế bào. Các thành phần trong tế bào có thể được tìm thấy trong dạng tế bào nguyên sinh/tế bào trần nếu chất thẩm thấu được sử dụng để duy trì sự nguyên vẹn của tế bào nguyên sinh/tế bào trần. Nếu không sử dụng chất thẩm thấu trong dung dịch phân cắt thì tế bào nguyên sinh/tế bào trần có thể bị phá vỡ và các thành phần trong tế bào và các thành phần ngoài tế bào có thể được kết hợp trong phân đoạn đã phân cắt. Như đã mô tả trong sáng chế, các protein quan tâm, hoặc các siêu cấu trúc protein quan tâm có thể được tách từ các thành phần trong phân đoạn đã phân cắt sử dụng bất kỳ kỹ thuật thích hợp. Không muốn bị bó buộc bởi lý thuyết, bước phân cắt thành tế bào có thể làm mất các thành phần polyme trong thành tế bào và trợ giúp trong việc giải phóng các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc, các chất khác được thu giữ trong thành tế bào. Phương thức này còn có thể giảm thiểu hóa sự nhiễm bẩn của protein, hoặc protein siêu cấu trúc bởi các thành phần trong tế bào. Protein hoặc protein protein siêu cấu trúc quan tâm có thể được tách từ các mảnh vỡ tế bào sau quá trình phân cắt bằng enzym sử dụng ly tâm tốc độ thấp, tiếp theo là lọc, lọc sâu, sa lắng, kết tủa, ví dụ, nhưng không giới hạn đối với, kết tủa amoni sulfat, hoặc kết hợp các cách này để thu được phân đoạn đã phân cắt chứa các protein hoặc các protein siêu cấu trúc quan tâm.

Nếu chất thẩm thấu được sử dụng, phân đoạn tế bào nguyên sinh/tế bào trần, hoặc phân đoạn chứa các tế bào nguyên sinh có thể được tách từ phân đoạn vô bào sử dụng bất kỳ kỹ thuật thích hợp, ví dụ, nhưng không giới hạn đối với, ly tâm, lọc, lọc sâu, sa lắng, kết tủa, hoặc kết hợp các cách này để thu được phân đoạn đã tách chứa các protein hoặc các protein siêu cấu trúc quan tâm và/hoặc chứa các tế bào nguyên sinh/tế bào trần mà chứa các protein hoặc các protein siêu cấu trúc quan tâm.

Phân đoạn đã tách có thể là, ví dụ, chất nổi trên bề mặt (nếu được ly tâm, được sa lắng, hoặc được kết tủa), hoặc nước lọc (nếu được lọc), và được làm giàu protein, hoặc protein siêu cấu trúc. Phân đoạn đã tách có thể được xử lý thêm để phân lập, tinh chế, cô đặc các protein, hoặc protein siêu cấu trúc hoặc kết hợp các bước này bằng cách, ví dụ, các bước ly tâm bổ sung, kết tủa, các bước sắc ký (ví dụ, sắc ký loại trừ kích cỡ, trao đổi ion, ái lực), lọc dòng chảy tiếp tuyến, hoặc kết hợp các cách này. Sự có mặt của các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc đã tinh chế, có thể được xác nhận bằng, ví dụ, phân tích Western tự nhiên hoặc SDS-PAGE sử dụng kháng thể phát hiện thích hợp, điện di mao dẫn hoặc bất kỳ phương pháp khác như được người có chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng biết rõ.

Không bào là một phần tế bào thực vật bên ngoài màng sinh chất, và bao gồm thành tế bào và các khoảng bên trong tế bào của thực vật. Trong ưu tiên rằng tính nguyên vẹn của các tế bào nguyên sinh (và/hoặc các tế bào trần) có thể được duy trì trong quá trình phân cắt và xử lý khác, không cần thiết là các tế bào nguyên sinh vẫn còn nguyên vẹn đối với sự làm giàu các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc.

Trong quá trình tổng hợp, các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc có thể được tiết bên ngoài màng sinh chất. Nếu protein siêu cấu trúc là VLP, chúng có kích cỡ trung bình nằm trong khoảng từ 20 nm đến 1 μ m, hoặc giá trị bất kỳ nằm trong khoảng này. Nếu protein siêu cấu trúc là kháng thể, chúng có kích cỡ trung bình nằm trong khoảng từ 100 kDa đến 1000 kDa, hoặc giá trị bất kỳ nằm trong khoảng này. Do kích thước của chúng, khi được tổng hợp, các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc, có thể vẫn còn được thu giữ giữa màng sinh chất và thành tế bào và có thể khó được phân lập hoặc được tinh chế thêm sử dụng các phương pháp cơ học tiêu chuẩn được sử dụng để thu được protein thực vật. Nhằm để đạt được năng suất lớn nhất, sự nhiễm bẩn tối đa của phân đoạn protein siêu cấu trúc bởi các protein của tế bào, duy trì tính nguyên vẹn của các protein, hoặc các protein siêu cấu trúc, và, nếu cần, vỏ ngoài hoặc màng lipid liên quan, phương pháp phá vỡ thành tế bào để giải phóng protein, hoặc protein siêu cấu trúc, mà giảm thiểu sự hư hại cơ học đối với tế bào nguyên sinh và/hoặc tế bào trần có thể có ích, như các phương pháp enzym được mô tả trong sáng chế. Tuy nhiên, không yêu cầu tính nguyên vẹn của tất cả các tế bào nguyên sinh được giữ lại trong suốt quy trình.

Protein siêu cấu trúc, ví dụ, VLP được sản xuất trong thực vật có thể được tạo phức với các lipid có nguồn gốc thực vật. Các lipid có nguồn gốc từ cây có thể có dạng lớp kép lipid, và có thể bao gồm thêm vỏ bao quanh VLP. Các lipid có nguồn gốc từ thực vật có thể bao gồm các thành phần lipid trong màng tế bào của cây trong đó VLP được sản xuất, bao gồm, nhưng không giới hạn với phosphatidylcholin (PC), phosphatidyletanolamin (PE), glycosphingolipit, sterol thực vật hoặc hỗn hợp của chúng. Lipid có nguồn gốc từ cây có thể lần lượt được đề cập đến dưới dạng 'lipid của cây'. Ví dụ về phytosterol được người có chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng biết và bao gồm, ví dụ, stigmasterol, sitosterol, 24-metylcholesterol và cholesterol (Mongrand et al., 2004, J. Biol Chem 279:36277-86).

Biểu hiện polypeptit có thể được nhắm đích tới bất kỳ khoảng trong tế bào hoặc ngoài tế bào, cơ quan tế bào hoặc mô của thực vật như đã mô tả. Nhằm để định vị polypeptit được biểu hiện tới vị trí cụ thể, axit nucleic mã hóa polypeptit có thể được liên kết với trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu hoặc trình tự dẫn đầu. Peptit tín hiệu theo cách khác có thể được gọi là peptit chuyển tiếp, trình tự tín hiệu, hoặc trình tự dẫn đầu. Peptit tín hiệu hoặc trình tự peptit để phát hiện sự định vị của polypeptit được biểu hiện đến không bào bao gồm, nhưng không giới hạn đối với, trình tự tín hiệu hoặc trình tự dẫn đầu tự nhiên (đối với protein), hoặc trình tự tín hiệu khác loại, ví dụ, nhưng không giới hạn đối với vwois, peptit tín hiệu amylaza (McCormick 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:703-708), peptit tín hiệu isomeraza disulfua protein (PDI) có trình tự amino axit: MAKNV AIFGLLF SLLLVPSQIF AEE; SEQ ID NO. 10, protein liên quan đến sự phát sinh bệnh ở thực vật (PRP; Szyperski et al. PNAS 95:2262-2262), ví dụ, protein liên quan đến sự phát sinh bệnh ở cây thuốc lá 2 (PRP), peptit tín hiệu kháng thể đơn dòng ở người (SP, hoặc trình tự dẫn đầu), hoặc bất kỳ peptit tín hiệu mà tự nhiên đối với protein).

Trong một số ví dụ, polypeptit được biểu hiện có thể tích lũy trong không gian trong tế bào hoặc ngoài tế bào đặc hiệu (như không bào), cơ quan tế bào hoặc mô, ví dụ, khi polypeptit được biểu hiện và được tiết trong sự vắng mặt của peptit tín hiệu hoặc peptit chuyển tiếp.

Thuật ngữ "hạt tương tự virus" (VLP), hoặc "các hạt tương tự virus" hoặc "VLP" đề cập đến cấu trúc mà tự kết hợp và bao gồm các protein trên bề mặt của virus, ví dụ, protein HA bệnh cúm, hoặc protein HA bệnh cúm khảm. VLP và VLP khảm thường tương tự về

mặt hình thái và kháng nguyên với các hạt virus được sản xuất trong sự nhiễm trùng, nhưng thiếu thông tin di truyền đủ để sao chép và do đó không gây nhiễm.

Theo thuật ngữ “protein khảm” hoặc “polypeptit khảm”, có nghĩa là protein hoặc polypeptit mà bao gồm các trình tự amino axit từ hai hoặc nhiều nguồn, ví dụ, nhưng không giới hạn đối với, hai hoặc nhiều loại hoặc phân loại, mà được dung hợp với polypeptit đơn. Protein khảm hoặc polypeptit có thể bao gồm peptit tín hiệu mà giống (ví dụ, tự nhiên), hoặc khác loại với, phần còn lại của polypeptit hoặc protein. Protein khảm hoặc polypeptit khảm được sản xuất như một phiên mã từ trình tự nucleotit khảm, và vẫn còn nguyên vẹn, hoặc nếu cần thiết, protein khảm hoặc polypeptit khảm có thể được phân cắt sau khi tổng hợp. Protein khảm nguyên vẹn, hoặc các phần được phân cắt của protein khảm có thể kết hợp để tạo thành protein gồm nhiều chuỗi protein. Protein khảm hoặc polypeptit khảm có thể còn bao gồm protein hoặc polypeptit bao gồm các nhóm con mà được kết hợp thông qua các cầu nối disulphit (có nghĩa là, protein gồm nhiều chuỗi protein). Ví dụ, polypepti khảm bao gồm các trình tự amino axit từ hai hoặc nhiều nguồn có thể được xử lý thành các nhóm con, và các nhóm con được kết hợp thông qua các cầu nối disulphit để tạo ra protein khảm hoặc polypeptit khảm. Ví dụ không giới hạn của protein khảm là kháng thể đơn dòng khảm, ví dụ, C2B8, hoặc VLP khảm, ví dụ, nhưng không giới hạn đối với, các protein và VLP tạo ra các cấu trúc được đánh số 690, 691, 696, 734, 737, 745 hoặc 747 (bảng 2) như được mô tả trong đơn bảo hộ tạm thời US số US 61/220,161 và PCT/CA2010/000983 (được đưa vào đơn làm tài liệu tham khảo).

Protein hoặc protein siêu cấu trúc có thể là glycoprotein và phương pháp như được mô tả trong sáng chế bao gồm sự chiết tách bởi sự phân cắt thành tế bào có thể được áp dụng với các cây đồng biểu hiện glycoprotein và một hoặc nhiều enzym để biến đổi biên dạng của sự glycosyl hóa ở vị trí N như được mô tả trong WO 20008/151440 (Modifying glycoprotein production in plants; được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo) để làm thuận lợi cho sự thu hồi các glycoprotein mang các N-glycan trưởng thành được biến tính. Ví dụ, các N-glycan trưởng thành có thể được miễn là các gốc xyloza và fucoza, hoặc thể hiện N-glycan được fucosyl hóa, xylosyl hóa được giảm, hoặc cả hai, được fucosyl hóa và xylosyl hóa. Ngoài ra, protein quan tâm bao gồm các mô hình glycosyl hóa được biến đổi có thể thu được, trong đó protein thiếu sự fucosyl hóa, xylosyl hóa, hoặc cả hai, và bao gồm galatosyl hóa tăng.

Biên dạng của sự glycosyl hóa ở vị trí N được biến đổi có thể thu được bằng cách đồng biểu hiện trong thực vật, phần của thực vật, hoặc tế bào thực vật, trình tự nucleotit mã hóa trình tự nucleotit thứ nhất mã hóa protein lai (GNT1-GalT), bao gồm miền CTS (tức là, đuôi tế bào chất, miền chuyển màng, miền gốc) của N-axetylglucosaminyl transferaza (GNT1) được dung hợp với miền xúc tác của beta-1,4-galactosyltransferaza (GalT), trình tự nucleotit thứ nhất được liên kết linh động với vùng điều chỉnh thứ nhất mà hoạt động trong thực vật, và trình tự nucleotit thứ hai để mã hóa protein cấu trúc bậc hai quan tâm, trình tự nucleotit thứ hai được liên kết linh động với vùng điều chỉnh thứ hai mà hoạt động trong thực vật, và đồng biểu hiện các trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai để tổng hợp protein siêu cấu trúc quan tâm bao gồm các glycan có biên dạng glycosyl hóa ở vị trí N được biến đổi, như được mô tả trong WO 20008/151440.

Protein siêu cấu trúc có thể là hemagglutinin gây bệnh cúm (HA), và mỗi trong hai hoặc nhiều trình tự amino axit mà tạo ra polypeptit có thể thu được từ các HA khác nhau để tạo ra HA khảm, hoặc HA khảm gây bệnh cúm. HA khảm có thể cũng bao gồm trình tự amino axit bao gồm peptit tín hiệu khác loại (tiền protein HA khảm) mà được phân cắt sau khi tổng hợp. Ví dụ về các protein HA mà có thể được sử dụng trong sáng chế được mô tả trong sáng chế có thể được tìm thấy trong WO 2009/009876; WO 2009/076778; WO 2010/003225 (được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo). Axit nucleic mã hóa polypeptit khảm có thể được mô tả là "axit nucleic khảm", hoặc "trình tự nucleotit khảm". Hạt tương tự virus gồm có HA có thể được mô tả là "VLP khảm". VLP khảm được mô tả thêm trong đơn PCT No. PCT/CA2010/000983 được đăng ký ngày 25 tháng 6, 2010, và đơn bảo hộ tạm thời của Mỹ No. 61/220,161 (được đăng ký ngày 24, tháng 6, 2009; được đưa vào đơn làm tài liệu tham khảo). VLP có thể thu được từ biểu hiện của HA tự nhiên hoặc khảm.

HA của VLP được bào chế theo phương pháp được đề xuất bởi sáng chế, gồm các trình tự đã biết và các trình tự HA biến thể mà có thể được phát triển hoặc được đồng nhất. Hơn thế nữa, VLP được sản xuất như được mô tả trong sáng chế không bao gồm neuraminidaza (NA) hoặc các thành phần khác, ví dụ, M1 (protein M), M2, NS và tương tự. Tuy nhiên, NA và M1 có thể được biểu hiện đồng thời với HA nên VLP bao gồm HA và NA được mong muốn.

Nói chung, thuật ngữ “lipit” đề cập đến các phân tử có thể hòa tan chất béo (ưa chất béo), các phân tử xuất hiện tự nhiên. VLP khả năng được sản xuất trong thực vật theo một vài khía cạnh của sáng chế có thể được tạo phức chất với các lipit có nguồn gốc từ thực vật. Các lipit có nguồn gốc từ cây có thể có dạng lớp kép lipit, và có thể bao gồm thêm vỏ bao quanh VLP. Các lipit có nguồn gốc từ thực vật có thể bao gồm các thành phần lipit trong màng sinh chất của thực vật trong đó VLP được sản xuất, bao gồm hospholipit, tri-, di- và monoglyxerit, cũng như các sterol tan trong chất béo và các chất chuyển hóa bao gồm các sterol. Các thí dụ gồm phosphatidylcholin (PC), phosphatidyletanolamin (PE), phosphatidylinositol, phosphatidylserin, glycosphingolipit, phytosterol hoặc sự kết hợp của chúng. Lipit có nguồn gốc từ cây có thể lần lượt được đề cập đến dưới dạng ‘lipit của cây’. Ví dụ về phytosterol gồm campesterol, stigmasterol, ergosterol, brassicasterol, delta-7-stigmasterol, delta-7-avenasterol, daunosterol, sitosterol, 2,4 -metylcholesterol, cholesterol hoặc beta-sitosterol (Mongrand et al., Năm 2004, J. Biol Chem 279:36277-86). Một người có chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rõ, chế phẩm lipit trong màng sinh chất của tế bào có thể thay đổi theo các điều kiện phát triển hoặc nuôi cấy của tế bào hoặc sinh vật, hoặc loài để thu tế bào.

Các màng tế bào thường bao gồm các lớp kép lipit, cũng như các protein có các chức năng khác nhau. Các nồng độ được hạn chế của các lipit cụ thể có thể được nhận thấy trong lớp kép lipit, đề cập đến dưới dạng ‘các mảng lipit’. Các vi miền mảng lipit này có thể được làm giàu trong sphingolipit và sterol. Không muốn bị bó buộc bởi lý thuyết, các mảng lipit có thể có vai trò quan trọng trong sự nhập bào và xuất bào, sự đi vào hoặc đi ra của các virus hoặc các tác nhân lây nhiễm khác, sự truyền tính trạng tín hiệu gian bào, sự tương tác với các thành phần cấu trúc khác trong tế bào hoặc sinh vật, như các chất nền nội bào và ngoại bào.

VLP bao gồm các vỏ ngoài lipit đã được mô tả trước đó trong WO 2009/009876; WO 2009/076778, và WO 2010/003225 (được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo). Đối với virus cúm, thuật ngữ “hemagglutinin” hoặc “HA” như được sử dụng trong bản mô tả đề cập đến glycoprotein cấu trúc của các tiểu phần virus cúm. HA của sáng chế có thể thu được từ loại phụ bất kỳ. Ví dụ, HA có thể là phân loại H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, hoặc H16, hoặc các loại bệnh cúm B hoặc C. HA tái tổ hợp trong sáng chế còn có thể bao gồm trình tự amino axit trên cơ sở trình tự

của bất kỳ hemagglutinin. Cấu trúc của hemagglutinin bệnh cúm được nghiên cứu kỹ và cho thấy mức độ cao của sự bảo tồn cấu trúc bậc hai, bậc ba và bậc bốn. Sự bảo toàn cấu trúc này được quan sát thấy thậm chí thông qua trình tự amino axit có thể thay đổi (xem, ví dụ, Skehel and Wiley, 2000 *Ann Rev Biochem* 69:531-69; Vaccaro et al 2005; được đưa vào đơn làm tài liệu tham khảo). Các trình tự nucleotit mã hóa HA được biết đến, và xuất hiện, ví dụ, từ BioDefense and Public Health Database(bây giờ là Influenza Research Database; Squires et al., 2008 *Nucleic Acids Research* 36:D497-D503) ví dụ, tại URL: biohealthbase.org/GSearch/home.do?decorator=Influenza) hoặc các cơ sở dữ liệu được duy trì bởi National Center for Biotechnology Information (NCBI; ví dụ, tại URL: ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&cmd=search&term=influenza), cả hai tài liệu này được đưa vào đơn làm tài liệu tham khảo.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp bào chế, phân lập, hoặc cả hai bào chế và phân lập VLP, bao gồm cả VLP cúm của virus lây nhiễm sang người, động vật chủ, ví dụ các loài linh trưởng, ngựa, lợn, chim, cừu, gia cầm gà nước, chim di cư, chim cú, vịt, ngan, ngỗng, gia cầm, thịt gà, lạc đà, chó, chó, mèo, mèo, hổ, báo, cây hương, chồn, chồn bạc ửng, chồn sương, vật nuôi trong nhà, gia súc, chuột nhắt, chuột cống, hải cẩu, cá voi và các con vật tương tự. Một số virus cúm có thể lây nhiễm sang một hoặc nhiều động vật chủ. Biến thể amino axit được dung nạp trong các hemagglutinin của các virus cúm. Biến thể này cung cấp các tính trạng mới mà liên tục được nhận biết. Tính lây nhiễm giữa các tính trạng mới có thể thay đổi. Tuy nhiên, sự tạo thành của các trimer hemagglutinin mà sau đó tạo thành CLPs được duy trì. Sáng chế cũng bao gồm phương pháp bào chế bất kỳ VLP có nguồn gốc từ thực vật, bất kể phân loại hoặc trình tự HA, hoặc HA khảm bao gồm VLP, hoặc các loài gốc.

Sự gấp cuộn chính xác của protein siêu cấu trúc có thể quan trọng đối với sự ổn định của protein, sự tạo thành các multimer, sự tạo thành và chức năng của protein. Sự gấp cuộn của protein có thể bị ảnh hưởng bởi một hoặc nhiều yếu tố, bao gồm, nhưng không giới hạn đối với, trình tự của protein, độ chen chúc trong tế bào, tính có sẵn của các đồng yếu tố mà có thể liên kết hoặc liên kết tạm thời với protein đã gấp nếp, đã gấp nếp một phần hoặc chưa gấp nếp, sự có mặt của một hoặc nhiều protein chaperon, hoặc tương tự.

Các protein sốc nhiệt (Hsp) hoặc các protein áp lực ví dụ là, protein chaperon, có thể góp phần vào các quá trình khác nhau trong tế bào, bao gồm tổng hợp protein, vận chuyển

trong tế bào, ngăn ngừa sự gấp cuộn sai của protein, ngăn ngừa sự kết tụ protein, sự kết hợp và sự tách rời của các phức protein, sự gấp cuộn protein, và sự phân rã protein. Ví dụ về các protein chaperon đã nêu bao gồm, nhưng không giới hạn đối với, Hsp60, Hsp65, Hsp 70, Hsp90, Hsp100, Hsp20-30, Hsp10, Hsp100-200, Hsp100, Hsp90, Lon, TF55, FKBP, cyclophilins, ClpP, GrpE, ubiquitin, calnexin, và protein disulfua isomeraza (see, ví dụ, Macario, A.J.L., Cold Spring Harbor Laboratory Res. 25:59-70. 1995; Parsell, D.A. & Lindquist, S. Ann. Rev. Genet. 27:437-496 (1993); U.S. Patent No. 5,232,833). proteinChaperon, ví dụ, nhưng không giới hạn đối với Hsp40 và Hsp70 có thể được sử dụng để đảm bảo sự gấp cuộn của HA khảm (đơn PCT No. PCT/CA2010/000983 được đăng ký ngày 25, tháng sáu năm 2010, và đơn bảo hộ tạm thời của Mỹ No. 61/220,161, được đăng ký ngày 24 tháng 6, 2009; WO 2009/009876 và WO 2009/076778, tất cả các tài liệu này được đưa vào đơn làm tài liệu tham khảo). Protein disulfua isomeraza (PDI; số truy cập. Z11499) cũng có thể được sử dụng.

Khi được thu hồi, protein, hoặc protein siêu cấu trúc, có thể được đánh giá về cấu trúc, kích cỡ, hiệu nghiệm hoặc hoạt tính bằng, ví dụ, nhưng không giới hạn đối với, kính hiển vi điện tử, tán xạ ánh sáng, sắc ký loại trừ kích cỡ, HPLC, phân tích Western blot, điện di, ELISA, xét nghiệm dựa trên hoạt tính, ví dụ, xét nghiệm đông kết hồng cầu, hoặc bất kỳ xét nghiệm khác phù hợp. Các phương pháp này và các phương pháp khác để đánh giá kích cỡ, nồng độ, hoạt tính và thành phần của VLP được biết trong kỹ thuật.

Đối với sắc ký loại trừ kích cỡ, chế phẩm chứa protein, hoặc protein siêu cấu trúc có thể thu được bằng các phương pháp được mô tả ở trên, và chất không tan được loại bỏ bằng cách ly tâm. Sự kết tủa với PEG hoặc amoni sulfat có thể cũng có lợi. Protein được thu hồi có thể được định lượng sử dụng các phương pháp thông thường (ví dụ, xét nghiệm Bradford Assay, BCA), và chất chiết đi qua cột loại trừ kích cỡ, ví dụ, sử dụng SEPHACRYL™, SEPHADEX™, hoặc môi trường tương tự, sắc ký sử dụng cột trao đổi ion, hoặc sắc ký sử dụng cột ái lực, và các phân đoạn hoạt tính được thu gom. Các phức protein còn có thể thu được sử dụng sự tách từ tính dựa trên ái lực, ví dụ, Dynabeads™ (Invitrogen), và giải hấp phức protein từ Dynabeads™. Sự kết hợp của sắc ký và các phương thức tách cũng có thể được sử dụng. Sau khi sắc ký, hoặc tách, các phân đoạn có thể được phân tích thêm bằng cách điện di protein, thẩm miễn dịch, ELISA, các xét

nghiệm dựa trên hoạt tính như mong muốn, để xác nhận sự có mặt của protein siêu cấu trúc.

Nếu protein siêu cấu trúc là VLP, thì xét nghiệm đông kết hồng cầu có thể được sử dụng để đánh giá hoạt tính hemagglutinin của các phân đoạn chứa VLP, sử dụng các phương pháp được biết đến nhiều trong kỹ thuật. Không muốn bị bó buộc bởi lý thuyết, khả năng của HA để liên kết với RBC từ các động vật khác nhau được điều khiển bởi ái lực của HA đối với axit sialic $\alpha 2,3$ hoặc $\alpha 2,6$ và sự có mặt của các axit sialic này trên bề mặt của RBC. HA ngựa và gia cầm từ virus cúm dính hồng cầu từ tất cả các loài, bao gồm gà tây, gà, vịt, lợn Nhật, người, cừu, ngựa, bò, trong khi đó các HA người sẽ liên kết với các hồng cầu của gà tây, gà, vịt, lợn Nhật, người và cừu (Ito T. et al, 1997, *Virology*, 227:493-499; Medeiros R et al, 2001. *Virology* 289:74-85).

Phân tích sự ức chế sự ngưng kết hồng cầu (HI, hoặc HAI) cũng có thể được sử dụng để phát hiện tính hiệu quả của các kháng thể được tạo ra bởi vắc xin, hoặc chế phẩm vắc xin chứa HA khám hoặc VLP khám có thể ức chế sự dính của hồng huyết cầu (RBC) bằng HA tái tổ hợp. Độ chuẩn kháng thể ức chế sự ngưng kết hồng cầu trong mẫu huyết thanh có thể được đánh giá bằng cách vi chuẩn độ HAI (Aymard et al 1973). Các hồng cầu từ bất kỳ loài có thể được sử dụng, ví dụ, ngựa, gà tây, gà hoặc các con vật tương tự. Xét nghiệm này cho thông tin gián tiếp về sự kết hợp của trimer HA trên bề mặt của VLP, xác nhận sự biểu hiện thích hợp của các vị trí kháng nguyên trên HA.

Các độ chuẩn HAI phản ứng chéo cũng có thể được sử dụng để phát hiện tính hiệu quả của đáp ứng miễn dịch với các chủng virus khác liên quan đến phân loại vắc xin. Ví dụ, huyết thanh từ đối tượng được miễn dịch với chế phẩm vắc xin chứa hemagglutinin khám bao gồm HDC thuộc dạng bệnh cúm thứ nhất hoặc phân loại có thể được sử dụng trong xét nghiệm HAI với chủng thứ hai của virus nguyên vẹn hoặc các tiểu phần virus, và độ chuẩn HAI được xác định.

Các HA VLP tái tổ hợp theo sáng chế có thể được sử dụng chung với các vắc xin cúm hiện nay, để bổ sung vào các vắc xin, làm cho chúng có hiệu quả hơn, và để làm giảm các liều dùng cấp cần thiết. Như đã biết bởi người có chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật này, vắc xin có thể được đề cập đối với một hoặc nhiều hơn một virus cúm. Các ví dụ về các vắc xin thích hợp gồm, nhưng không giới hạn với các vắc xin có sẵn trong thương mại

từ Sanofi-Pasteur, ID Biomedical, Merial, Sinovac, Chiron, Roche, MedImmune, GlaxoSmithKline, Novartis, Sanofi-Aventis, Serono, Shire Pharmaceuticals và các hãng tương tự. Nếu cần, VLP theo sáng chế có thể được trộn lẫn với tá dược thích hợp như đã biết bởi bất kỳ người có chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Hơn nữa, VLP được tạo ra theo sáng chế có thể được đồng biểu hiện với các thành phần protein khác hoặc được cấu thành lại với VLP hoặc các thành phần protein cúm khác, ví dụ, neuraminidaza (NA), M1, và M2. Nó cũng có thể được đồng biểu hiện hoặc được hoàn nguyên với VLP khác được cấu thành từ các protein vắc xin như các kháng nguyên bệnh sốt rét, kháng nguyên HIV, kháng nguyên virus gây hợp bào hô hấp (RSV), và tương tự.

Phương pháp biến nạp, và tái sinh của cây chuyển gen, tế bào cây chuyển gen, vật chất thực vật chuyển gen hoặc hạt giống chuyển gen chứa các protein, hoặc protein siêu cấu trúc, được thiết lập trong kỹ thuật và được biết đối với người có chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Phương pháp thu cây biến nạp và được tái sinh không giới hạn sáng chế.

Bằng cách “biến nạp” có nghĩa là sự truyền giữa các loài khác nhau ổn định về thông tin di truyền (trình tự nucleotit) được biểu thị bằng kiểu gen, kiểu hình hoặc cả hai. Sự truyền giữa các loài khác nhau về thông tin di truyền từ sản phẩm thiết kế thể khả năng đến vật chủ có thể di truyền (ví dụ, được tích hợp trong hệ gen của vật chủ) và truyền thông tin di truyền được xem là ổn định, hoặc sự truyền có thể là nhất thời và sự truyền thông tin di truyền không thể di truyền được.

Thuật ngữ "vật chất thực vật", có nghĩa là bất kỳ vật liệu có nguồn gốc từ thực vật. Vật chất thực vật thể bao gồm toàn bộ thực vật, mô, tế bào, hoặc phần bất kỳ của nó. Hơn nữa, vật chất thực vật có thể bao gồm các thành phần nội bào, các thành phần ngoại bào của cây, dịch chiết lỏng hoặc rắn của thực vật, hoặc hỗn hợp của chúng. Hơn nữa, vật chất thực vật có thể bao gồm thực vật, tế bào thực vật, mô, dịch chiết lỏng, hoặc hỗn hợp của chúng, từ lá cây, thân, hoa, quả, rễ hoặc hỗn hợp của chúng. Vật chất thực vật có thể bao gồm thực vật hoặc một phần của nó không tùy thuộc vào các bước xử lý bất kỳ. Một phần của thực vật có thể chứa vật chất thực vật. Thực vật hoặc vật chất thực vật có thể được thu hoạch hoặc thu được bằng phương pháp bất kỳ, ví dụ, toàn bộ cây có thể được sử dụng, hoặc lá hoặc các mô khác đặc biệt được loại bỏ để sử dụng trong phương pháp đã mô tả.

Các cây chuyển gen biểu hiện và tiết VLP có thể cũng được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu cho sự chế biến như được mô tả trong bản mô tả.

Các cấu trúc theo sáng chế có thể được đưa vào các tế bào thực vật bằng cách sử dụng Ti plasmid, Ri plasmid, các vector virus của thực vật, biến nạp ADN trực tiếp, vi tiêm, điện di, thâm nhiễm, và các cách tương tự. Để xem lại các kỹ thuật đã nêu, xem ví dụ Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, New York VIII, pp. 421-463 (1988); Geierman and Corey, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed. (1988); and Miki and Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*. In *Plant Metabolism*, 2d Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell (eds), Addison-Wesley, Langmans Ltd. London, pp. 561-579 (1997). Các phương pháp khác gồm sự hấp thụ ADN trực tiếp, sử dụng liposom, phương pháp mở lỗ bằng điện, ví dụ sử dụng thể nguyên sinh, vi tiêm, biến nạp gen trực tiếp bằng vi đạn hoặc sợi tinh thể, và thâm nhiễm chân không. xem, ví dụ, Bilang, et al. (*Gene* 100: 247-250 (1991), Scheid et al. (*Mol. Gen. Genet.* 228: 104-112, 1991), Guerche et al. (*Plant Science* 52: 111-116, 1987), Neuhauser et al. (*Theor. Appl. Genet.* 75: 30-36, 1987), Klein et al., *Nature* 327: 70-73 (1987); Howell et al. (*Science* 208: 1265, 1980), Horsch et al. (*Science* 227: 1229-1231, 1985), DeBlock et al., *Plant Physiology* 91: 694-701, 1989), *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988), *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989), Liu and Lomonosoff (*J. Virol. Meth.* 105:343-348, 2002), U.S. Pat. Nos. 4,945,050; 5,036,006; 5,100,792; 6,403,865; 5,625,136, (tất cả các tài liệu này được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo).

Các phương pháp biểu hiện tạm thời có thể được sử dụng để biểu hiện các cấu trúc theo sáng chế (tham khảo Liu và Lomonosoff, 2002, *Journal of Virological Methods*, 105:343-348; được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo). Ngoài ra, phương pháp biểu hiện tạm thời dựa vào chân không, như được mô tả trong các công bố đơn PCT số WO 00/063400, WO 00/037663 (được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo). Các phương pháp này có thể gồm, ví dụ, nhưng không giới hạn đến, phương pháp chủng bệnh bằng vi khuẩn nông nghiệp hoặc thâm nhiễm nông nghiệp, tuy nhiên, các phương pháp tạm thời khác cũng có thể được sử dụng như được chỉ ra ở trên. Nhờ chủng ngừa trong nông nghiệp hoặc thâm nhiễm trong nông nghiệp, hỗn hợp của *Agrobacterium* bao gồm axit nucleic mong muốn đi vào khoảng trống gian bào của mô, ví dụ lá, phần trên không của

thực vật (gồm thân, lá và hoa), phần khác của thực vật (thân, rễ, hoa), hoặc toàn bộ thực vật. Sau khi lai chéo biểu bì, gây nhiễm *Agrobacterium* và truyền các bản sao t-ADN vào các tế bào. t-ADN được phiên mã thuộc thể bổ sung và mARN được dịch mã, dẫn đến việc sản xuất protein được quan tâm trong các tế bào được tiêm nhiễm, tuy nhiên, sự chuyển t-ADN bên trong nhân chỉ là tạm thời.

Các trình tự được mô tả trong bản mô tả được tóm tắt sau.

SEQ ID NO:	Mô tả	Fig.
1	Trình tự axit nucleic (cấu trúc 685)	2A
2	Trình tự amino axit được mã hóa bằng SEQ ID NO: 1	2B
3	pBinPlus.2613c: AGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAG	
4	Mut-ATG115.r: GTGCCGAAGCACGATCTGACAACGT TGAAGATCGCTCACGCAAGAAAGACAAGAGA	
5	Mut-ATG161.c: GTTGTCTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAA CGTTTTCTTTCACTGAAGCGA	
6	LC-C5-1.110r: TCTCCTGGAGTCACAGACAGGGTGG	
7	ApaI-H5 (A-Indo).1c: TGTCGGGCCCCATGGAGAAAATAGTGC TTCTTCTTGCAAT	
8	H5 (A-Indo)-StuI.1707r: AAATAGGCCTTTAAATGCAAATTC TGCATTGTAAACGA	
9	Trình tự axit nucleic (cấu trúc 660)	5
10	Peptit tín hiệu PDI: MAKNVAFGLLFSLLLLVPSQIFAE	
11	Plasto-443c	
12	supP19-plasto.r	
13	supP19-1c	
14	SupP19-SacI.r	
15	đoạn LC của C2B8	9
16	đoạn HC của C2B8	10

Sáng chế sẽ được minh họa thêm bằng các ví dụ sau. Tuy nhiên, cần hiểu rằng các ví dụ này chỉ cho mục đích minh họa, và sẽ không được sử dụng để giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách thức bất kỳ.

Sự kết hợp của các cấu trúc biểu hiện

Các cấu trúc có thể được sử dụng để sản xuất VLP được mô tả trong đơn bảo hộ tạm thời của Mỹ U.S. No. US 61/220,161 và PCT/CA2010/000983 (được đưa vào đơn làm tài liệu tham khảo), WO 2009/009876, WO 2009/076778 và WO2010/003225 (tất cả các tài liệu này được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo). Các cấu trúc có thể bao gồm các cấu trúc được nêu trong bảng 2. Sự kết hợp của các cấu trúc này được mô tả trong WO 2009/009876, WO 2009/076778, WO2010/003225 và US 61/220,161. Tuy nhiên, các cấu trúc khác bao gồm các HA đã biết, bao gồm, nhưng không giới hạn đối với, các cấu trúc được đưa ra trong bảng 2, và được kết hợp với các yếu tố điều hòa và các đoạn khởi động tương tự nhau hoặc khác nhau, có thể còn được sử dụng để sản xuất VLP như được mô tả trong bản mô tả.

Bảng 2: Ví dụ không giới hạn về cấu trúc có thể được sử dụng cho sự sản xuất hemagglutinin.

Số cụm gen	HA tương ứng	Viết tắt HA
540	SpPDI-H1 từ chủng A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	H1/NC
560	SpPDI-H1 A/California/4/2009 trong cấu trúc biểu hiện 2X35S/CPMV- <i>HT</i>	H1/Cal WT
580	SpPDI-H1 A/New Caledonia/20/99 trong cấu trúc biểu hiện 2x35S/CPMV- <i>HT</i>	H1/NC
660	H5 từ chủng A/Indonesia/5/2005 (H5N1)	H1/Indo
663	H5 A/Indonesia/5/2005	H1/Indo
685	H5 A/Indonesia/5/2005 trong biểu hiện cụm gen CPMV- <i>HT</i>	H1/Indo
686	SpPDI-H5 A/Indonesia/5/2005 trong biểu hiện cụm gen CPMV- <i>HT</i>	H1/Indo
690	Miền liên kết thụ thể (RB) H1 A/Brisbane/59/07 trong xương sống H5 A/Indonesia/5/05	H1/Bris
691	Các miền esteraza và liên kết thụ thể H1 A/Brisbane/59/07 (E1-RB-E2) trong xương sống H5 A/Indonesia/5/05	H1/Bris
696	Miền liên kết thụ thể (RB) H5 A/Indonesia/5/05 trong xương sống H1 A/New Caledonia/20/99	H1/Indo
732	H1 A/Brisbane/59/2007 trong cấu trúc biểu hiện CPMV- <i>HT</i>	H1/Bris
733	SpPDI-H1 A/Brisbane/59/2007 trong cấu trúc biểu hiện CPMV- <i>HT</i>	H1/Bris
734	Miền liên kết thụ thể (RB) H1 A/Brisbane/59/07 trong xương sống H5 A/Indonesia/5/05 trong cấu trúc biểu hiện CPMV- <i>HT</i>	H1/Bris
735	H3 A/Brisbane/10/2007 trong cấu trúc biểu hiện CPMV- <i>HT</i>	H3/Bris
736	SpPDI-H3 A/Brisbane/10/2007 trong cấu trúc biểu hiện CPMV- <i>HT</i>	H3/Bris

737	Sự kết hợp của SpPDI-H3 A/Brisbane/10/2007 (ectodomain) + H5 A/Indonesia/5/2005 (TmD + Đuôi Cyto) khảm trong cấu trúc biểu hiện CPMV- <i>HT</i>	H3/Bris-H5/Indo chimera
738	HA B/Florida/4/2006 trong cấu trúc biểu hiện CPMV- <i>HT</i>	B/Flo
739	SpPDI-HA B/Florida/4/2006 trong cấu trúc biểu hiện CPMV- <i>HT</i>	B/Flo
745	SpPDI-HA B/Florida/4/2006 (ectodomain) + H5 A/Indonesia/5/2005 (TmD + Đuôi Cyto) trong cấu trúc biểu hiện CPMV- <i>HT</i>	B/Flo
747	SpPDI-HA B/Florida/4/2006+ H5 A/Indonesia/5/2005 (TmD + đuôi Cyto) trong cấu trúc biểu hiện 2X35S-CPMV- <i>HT</i>	B/Flo
774	HA of A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	H1/Bris
775	HA của A/Solomon Islands 3/2006 (H1N1)	H1/Solomon
776	HA của A/Brisbane 10/2007 (H3N2)	H3/Bris
777	HA of A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	H3/Wisc
778	HA của B/Malaysia/2506/2004	B/Malaysia
779	HA của B/Florida/4/2006	B/Flo
780	HA của A/Singapore/1/57 (H2N2)	H2/Sing
781	HA của A/Anhui/1/2005 (H5N1)	H5/Anhui
782	HA của A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)	H5/Vietnam
783	HA của A/Teal/HongKong/W312/97 (H6N1)	H6/HongKong
784	HA của A/Equine/Prague/56 (H7N7)	H7/Prague
785	HA của A/HongKong/1073/99 (H9N2)	H9/HongKong
787	H1 A/Brisbane/59/2007	H1/Bris
790	H3 A/Brisbane/10/2007	H3/Bris
798	HA B/Florida/4/2006	B/Flo

Cấu trúc biểu hiện CPMV-*HT* được bao gồm trong đoạn khởi động 35S để điều khiển sự biểu hiện của mARN bao gồm trình tự ghi mã quan tâm nằm bên hông, ở 5' bởi các nucleotit 1–512 từ virus Cowpea thể khảm (CPMV) ARN2 với ATG đột biến tại các vị trí 115 và 161 và ở 3', bởi các nucleotit 3330–3481 từ CPMV ARN2 (tương ứng với 3' UTR) được theo sau bởi đầu NOS. Plasmid pBD-C5-1LC, (Sainsbury et al. 2008; Plant Biotechnology Journal 6: 82-92 và công bố PCT WO 2007/135480), đã được sử dụng cho sự kết hợp của cấu trúc biểu hiện hemagglutinin trên cơ sở CPMV-*HT*. Sự gây đột biến của ATGs tại vị trí 115 và 161 của CPMV ARN2 đã được thực hiện sử dụng phương pháp buộc dựa trên PCR được trình bày trong Darveau et al. (Phương pháp trong Neuroscience 26: 77-85 (1995)). Hai PCR riêng biệt được thực hiện sử dụng pBD-C5-1LC làm mẫu khuôn. Các đoạn môi cho phản ứng khuếch đại thứ nhất là pBinPlus.2613c (SEQ ID NO:

3) và Mut-ATG115.r (SEQ ID NO: 4). Các đoạn mồi cho phản ứng khuếch đại thứ hai là Mut-ATG161.c (SEQ ID NO: 5) và LC-C5-1.110r (SEQ ID NO: 6). Hai đoạn sau đó được trộn với nhau và được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng khuếch đại thứ hai sử dụng pBinPlus.2613c (SEQ ID NO: 3) và LC-C5-1.110r (SEQ ID NO: 6) làm các đoạn mồi. Phân đoạn tạo ra đã được phân cắt bởi *PacI* và *ApaI* và được nhân đôi thành pBD-C5-1LC được phân cắt bởi cùng enzym. Cấu trúc biểu hiện được tạo ra được đặt tên là 828.

Tập hợp của H5 A/Indonesia/5/2005 trong cấu trúc biểu hiện CPMV-HT (cấu trúc số 685)

Tập hợp của cụm gen này được mô tả trong WO 2009/009876, WO 2009/076778 và WO2010/003325, được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo.

Tóm lại, trình tự ghi mã của H5 từ A/Indonesia/5/2005 được nhân đôi thành CPMV-HT như sau: các vị trí giới hạn *ApaI* (ngược dòng trực tiếp của ATG khởi đầu) và *StuI* (xuôi dòng trực tiếp của đơn vị mã dừng) được thêm vào trình tự ghi mã hemagglutinin bằng cách thực hiện phản ứng khuếch đại PCR với các đoạn mồi *ApaI*-H5 (A-Indo).1c (SEQ ID NO: 7) và H5 (A-Indo)-*StuI*.1707r (SEQ ID NO: 8) sử dụng cấu trúc số 660 (D'Aoust et al., Plant Biotechnology Journal 6:930-940 (2008)) làm khuôn mẫu. Cấu trúc 660 bao gồm đoạn khởi động alfalfa plastoxyanin và 5' UTR, trình tự ghi mã hemagglutinin H5 từ A/Indonesia/5/2005 (Cấu trúc # 660), alfalfa plastoxyanin 3' UTR và các trình tự kết thúc (SEQ ID NO: 9; Fig. 5). Phân đoạn tạo ra đã được phân cắt bởi các enzym hạn chế *ApaI* và *StuI* và được nhân đôi thành cấu trúc số 828 được phân cắt trước đó bởi cùng enzym. Cấu trúc tạo ra được đặt tên là cấu trúc số 685 (Fig. 1, 2).

Các chất chặn sự bất hoạt gen

Bất hoạt gen sau phiên mã (PTGS) có thể liên quan đến sự giới hạn biểu hiện các gen chuyển trong cây, và biểu hiện đồng thời gen ức chế sự bất hoạt từ virus khoai tây Y (HcPro) có thể được sử dụng để chống lại sự phân hủy đặc trưng của gen chuyển mRNA (Brigneti et al., 1998). Các gen ức chế sự bất hoạt khác đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được sử dụng như được mô tả ở đây (Chiba et al., 2006, Virology 346:7-14; được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo), ví dụ nhưng không giới hạn với, TEV-p1/HC-Pro (Virus khắc axit ở thuốc lá-p1/HC-Pro), BYV -p21, p19 của virus chùn ngọn tàn lụi cà chua (TBSV p19), protein capsit của virus làm quăn ở cà chua (TCV -CP), 2b của Virus khảm dưa chuột; CMV-2b), p25 của virus khoai tây X (PVX-p25), p11 của virus

khoai tây M (PVM-p11), p11 của virus khoai tây S (PVS-p11), p16 của virus gây khô héo cây việt quất, (BScV -p16), p23 của virus tàn lụi cam quýt (CTV-p23), p24 của virus-2 gắn với sâu cuốn lá nhỏ, (GLRaV-2 p24), p10 của virus A ở nhỏ, (GVA-p10), p14 của virus B ở nhỏ (GVB-p14), p10 của virus tiềm ẩn ở *Heracleum* (HLV-p10), hoặc p16 của virus tiềm ẩn phổ biến ở tỏi (GCLV-p16). Do đó, gen ức chế sự bất hoạt, ví dụ, nhưng không hạn chế với, HcPro, TEV -p1/HC-Pro, BYV-p21, TBSV p19, TCV-CP, CMV-2b, PVX-p25, PVM-p11, PVS-p11, BScV-p16, CTV-p23, GLRaV-2 p24, GBV-p14, HLV-p10, GCLV-p16 hoặc GVA-p10, có thể được biểu hiện đồng thời cùng với trình tự axit nucleic ghi mã protein được quan tâm để bảo đảm các mức độ cao của sự sản xuất protein trong thực vật.

Sự cấu trúc của p19 được mô tả trong WO 2010/0003225 (được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo). Tóm lại, trình tự ghi mã của protein p19 của virus chùn ngọn tàn lụi cà chua (TBSV) đã được liên kết với cấu trúc biểu hiện plastocyanin alfalfa bằng phương pháp thắt dựa trên PCR trong Darveau et al. (Phương pháp trong *Neuroscience* 26: 77-85(1995)). Trong vòng PCR thứ nhất, phân khúc của đoạn khởi động plastocyanin đã được khuếch đại sử dụng các đoạn mồi Plasto-443c:

GTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTC (SEQ ID NO:11)

và supP19-plasto.r

CCTTGTATAGCTCGTTCCATTTTCTCTCAAGATG (SEQ ID NO:12)

với cấu trúc 660 (được mô tả trong WO 2010/0003225, được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo) làm khuôn mẫu. Đồng thời, phân đoạn khác chứa trình tự ghi mã của p19 đã được khuếch đại bằng các đoạn mồi supP19-1c.

ATGGAACGAGCTATACAAGG (SEQ ID NO:13)

và SupP19-SacI.r

AGTCGAGCTCTTACTCGCTTTCTTTTTCGAAG (SEQ ID NO:14)

sử dụng cấu trúc 35S:p19 như được mô tả trong Voinnet et al. (*The Plant Journal* 33: 949-956 (2003)) làm khuôn mẫu. Các sản phẩm khuếch đại sau đó được trộn và được sử dụng làm khuôn mẫu cho vòng khuếch đại thứ hai (phản ứng kết hợp) với các đoạn mồi Plasto-443c và SupP19-SacI.r. Phân đoạn tạo ra được phân cắt bởi BamHI (trong đoạn khởi động

plastoxyanin) và SacI (tại đầu của trình tự ghi mã p19) và được tách dòng thành cấu trúc số 660, được phân cắt trước đó bởi cùng enzym hạn chế để cho cấu trúc số R472. Các plasmit được sử dụng để biến nạp *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1; ATCC, Manassas, VA 20108, USA) bằng sự điện di (Mattanovich et al., 1989). Tính nguyên vẹn của tất cả các chủng *A. tumefaciens* đã được xác nhận bằng phép ánh xạ hạn chế. Chủng *A. tumefaciens* chứa R472 (Fig. 11B) có tên gọi là “AGL1/R472”.

Cấu trúc HcPro (35HcPro) được tạo ra như được mô tả trong Hamilton et al. (2002). Tất cả các dòng được sắp xếp theo trình tự để xác định tính nguyên vẹn của các sản phẩm thiết kế. Các plasmit được sử dụng để biến nạp *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1; ATCC, Manassas, VA 20108, USA) bằng sự điện di (Mattanovich et al., 1989). Tính nguyên vẹn của tất cả các chủng *A. tumefaciens* đã được xác nhận bằng phép ánh xạ hạn chế.

Sản xuất sinh khối thực vật, chất để tiêm, sự thâm nhiễm nông nghiệp, và thu hoạch

Thực vật *Nicotiana benthamiana* đã được sinh trưởng trong các căn buồng với chất nền rêu bùn thương mại. Các cây được trồng trong nhà kính dưới chu kỳ sáng 16/8 và chế độ nhiệt độ là 25°C ngày/20°C đêm. Ba tuần sau khi gieo hạt, nhổ các cây non riêng lẻ ra, trồng lại trong các chậu và để phát triển trong nhà kính trong khoảng thời gian ba tuần nữa dưới các điều kiện môi trường như nhau. Sau sáu tuần, các cây có trọng lượng trung bình là 80 g và chiều cao 30 cm.

Agrobacterium chủng AGL1 đã được chuyển nạp (điện di) với các cấu trúc như được nhận dạng dưới đây, sử dụng các phương pháp được mô tả bởi D'Aoust et al 2008 (Plant Biotechnology Journal 6:930-940). *Agrobacterium* đã chuyển nạp được sinh trưởng trong môi trường YEB được bổ sung với axit 2-(N-morpholino)etansulfonic 10 mM (MES), axetosyringon 20 μ M, kanamycin 50 μ g/ml và carbenicillin 25 μ g/ml có pH=5,6 đến OD600 nằm trong khoảng từ 0,6 đến 1,6. Huyền phù *Agrobacterium* được ly tâm trước khi sử dụng và được huyền phù hóa lại trong môi trường thâm nhiễm (MgCl₂ 10 mM và MES 10 mM có pH =5,6).

Các cây được thâm nhiễm nông nghiệp như được mô tả trong D'Aoust et al (*supra*). Tóm lại, để thâm nhiễm trong chân không, huyền phù *A. tumefaciens* được ly tâm, được huyền phù hóa lại trong môi trường thâm nhiễm và được bảo quản qua đêm ở 4°C. Vào ngày thâm nhiễm, các mẻ môi trường cấy được pha loãng trong 2,5 thể tích môi trường

cây và được cho phép làm ấm trước khi sử dụng. Cây nguyên vẹn *N. benthamiana* được để úp ngược trong huyền phù vi khuẩn trong thùng thép không gỉ kín mít dưới chân không là 20-40 Torr trong 2 phút. Trừ khi được nêu rõ khác, tất cả các bước thâm nhiễm được thực hiện đồng thời với vi khuẩn được biến nạp với R472 (chủng AGL1/R472) ở tỷ lệ 1:1. Sau khi thâm nhiễm chân không hoặc bằng ống tiêm, các cây được đưa trở lại nhà kính trong khoảng thời gian từ 4 đến 5 ngày thời gian ủ cho đến khi thu hoạch.

Lấy mẫu lá và chiết protein tổng thể (đồng hóa cơ học)

Sau khi ủ 4, 5, 6, 7 và 8 ngày, phần trên không của cây được thu hoạch và được sử dụng ngay. Protein tổng thể tan được chiết tách bằng cách đồng thể hóa mô cây trong 3 thể tích Tris 50 mM pH=8,0 lạnh, NaCl 0,15 M chứa 1% Triton X-100 và natri metabisulfua 0,004%, Mô cây được đồng thể hóa cơ học sử dụng POLYTRON™, nghiền bằng súng cối và chày COMITROL™ trong 1 thể tích của Tris 50 mM pH=8, NaCl 0,15 M. Chất đệm được sử dụng với COMITROL™ còn chứa natri metabisulfua 0,04%. Sau khi đồng nhất hóa, huyền phù đặc được ly tâm với 5.000 g trong khoảng thời gian 5 phút ở nhiệt độ 4°C và dịch chiết thô (phần nổi trên mặt) được giữ để phân tích. Hàm lượng protein tổng số của dịch chiết thô đã lọc được xác định bằng thử nghiệm Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) sử dụng albumin huyết thanh bò làm mẫu chuẩn.

Sự chiết tách VLP bằng cách phân cắt thành tế bào

Mô lá được thu gom từ các cây *Nicotiana benthamiana* và được cắt thành các mẫu có diện tích ~1 cm². Các mẫu lá được nhúng chìm trong mannitol 500 mM trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng (RT). Dung dịch mannitol sau đó được loại bỏ và được thay đổi bằng hỗn hợp enzym (hỗn hợp của các xelulaza từ *Trichoderma viride* (Onozuka R-10; 3% thể tích/thể tích) và hỗn hợp của các pectinaza từ *Rhizopus* sp. (MACEROZYME™; 0,75% thể tích/thể tích; cả hai hỗn hợp từ hãng Yakult Pharmaceuticals) trong dung dịch tế bào nguyên sinh (mannitol 500 mM, CaCl₂ 10mM và MES/KOH 5 mM(pH= 5,6)). Tỷ lệ được sử dụng là 20 g mẫu lá trên 100 mL dung dịch Chế phẩm này được rải đều vào các bình nông (~11x18 cm) và được ủ trong 16 giờ trên máy lắc quay ở tốc độ quay 40 vòng/phút và nhiệt độ 26°C.

Ngoài ra, sự chiết tách VLP có thể được thực hiện như sau: cây được thâm nhiễm nông nghiệp với AGL1/#685 như được mô tả trong ví dụ 1. Mô lá được thu gom từ thực

vật *N. benthamiana* vào ngày thứ sáu sau khi thâm nhiễm và được cắt thành các mẫu $\sim 1 \text{ cm}^2$. Multifect Pectinaza FE, Multifect CX CG và Multifect CX B (Genencor) đã được thêm vào đến nồng độ 1,0% (thể tích/thể tích) cho mỗi chất trong Mannitol 600 mM, xitrat 75 mM, chất đệm natri bisulfua có pH= 6,0 sử dụng tỷ lệ là sinh khối mới: chất đệm phân cắt bằng 1:2,5 (trọng lượng/thể tích). Sinh khối được phân cắt trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng trong máy lắc theo quỹ đạo.

Sau khi ủ, mảnh vụn lá được loại bỏ bằng cách lọc (màng lọc nylon có cỡ lưới 250 hoặc 400 μm). Các tế bào nguyên sinh trong huyền phù được thu gom bằng cách ly tâm ở 200xg (15 phút), được theo sau bởi sự ly tâm chất nổi trên bề mặt ở 5000xg (15 phút) để làm sạch thêm chất nổi trên bề mặt. Ngoài ra, bước ly tâm đơn ở 5000xg trong 15 phút có thể được thực hiện. Bảy mươi mL chất nổi trên mặt sau đó đã được ly tâm ở 70000 xg trong 30 phút. Giọt tạo ra được huyền phù hóa lại trong 1,7mL mL PBS và được phân tích ngay hoặc được đông lạnh.

Phân tích protein

Thử nghiệm sự ngưng kết hồng cầu với H5 dựa trên phương pháp được mô tả bởi Nayak. và Reichl (2004). Tóm lại, sự pha loãng hai lần theo thứ tự các mẫu thử nghiệm (100 μL) được thực hiện trong các đĩa vi độ chuẩn 96 giếng có đáy V chứa 100 μL PBS, lấy ra 100 μL mẫu đã được pha loãng vào mỗi giếng. Một trăm microlit huyền phù tế bào máu đỏ ở ngựa 0,25% (Bio Link Inc., Syracuse, NY) được thêm vào mỗi giếng, và các đĩa được ủ trong khoảng thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tính thuận nghịch của sự pha loãng nhất cho thấy sự hemagglutinin hoàn toàn được ghi là hoạt tính đông kết hồng cầu. Tương tự, HA tái tổ hợp chuẩn (A/Vietnam/1203/2004 H5N1) (Protein Science Corporation, Meriden, CT) được pha loãng trong PBS và chạy làm mẫu đối chứng trên mỗi đĩa.

ELISA

Chuẩn HA5 đã được tạo ra bằng các hạt tương tự virus đã tinh chế mà đã được phá vỡ bằng cách xử lý với Triton X-100 1%, sau đó khuấy cơ học trong Tissue Lyser™ (Qiagen) trong 1 phút. Các đĩa vi chuẩn độ đáy hình chữ U 96 giếng được phủ với 10 $\mu\text{g/mL}$ kháng thể thu giữ (Immune Technology Corporation, #IT-003-0051) trong chất đệm bọc cacbonat-bicacbonat (pH =9,6) trong 16 đến 18 giờ ở 4°C. Tất cả các lần rửa

được thực hiện với PBS 0,01 M (muối đệm phosphat), pH=7,4 chứa Tween-20 0,1%. Sau khi ủ, các đĩa được rửa ba lần và được phong bế bằng casein 1% trong PBS trong 1 giờ ở 37°C. Sau bước phong bế, các đĩa được rửa ba lần. Chuẩn HA5 đã được pha loãng trong chất chiết thử (được bào chế từ mô lá được thâm nhiễm với chỉ AGL1/R472) để tạo ra đường cong chuẩn từ 500 đến 50 ng/mL. Các mẫu để định lượng được xử lý trong Triton X-100 1% trước khi nạp vào đĩa vi chuẩn độ. Các đĩa được ủ trong 1 giờ nữa ở 37°C. Sau khi rửa, kháng thể đa dòng từ cừu đã xuất hiện chống lại HA5 (CBER/FDA) được pha loãng với tỷ lệ 1:1000 được thêm vào và các đĩa được ủ trong 1 giờ ở 37°C. Sau khi rửa, kháng thể từ cừu kháng thể được liên hợp với peroxidaza từ cây cải ngựa được pha loãng theo tỷ lệ 1:1000 được thêm vào và các đĩa được ủ trong 1 giờ ở 37°C. Sau lần rửa cuối cùng, các đĩa được ủ với chất nền SureBlue TMB peroxidaza (KPL) trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng. Phản ứng đã được ngừng lại bằng cách thêm HCl 1N và giá trị A_{450} được đo bằng cách sử dụng máy đọc đĩa Ascent Multiskan (Thermo Scientific).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sự chiết tách HA có hoạt tính tương đối cao từ rất nhiều mô thực vật bằng enzym.

Số lượng và hoạt tính tương đối của HA thu được từ phương pháp chiết tách bằng enzym hiện nay được so sánh với số lượng và hoạt tính tương đối của HA thu được từ các phương pháp chiết tách cơ học phổ biến. Các cây *N. benthamiana* đã được thâm nhiễm với AGL1/685 và lá được thu hoạch sau khoảng thời gian từ năm đến sau ngày ủ. Dịch treo mô đồng thể từ lá đã được bào chế như sau: Hai gam lá được đồng thể hóa bằng thiết bị khuấy đều Polytron; 4g lá được nghiền với máy nghiền mã não và chày; và 25kg lá được đồng thể hóa bằng máy chế biến COMITROL™ (phòng thí nghiệm Urschel) trong chất đệm chiết (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH=8,0, tỷ lệ là 1:1 trọng lượng/thể tích). Sự chiết tách bằng enzym được thực hiện như sau: Hai mươi gram lá thu hoạch đã bị phân cắt bằng Macerozym pectinaza và Onozuka R-10 xenlulaza như mô tả ở trên. Sau khi phân cắt, mảnh vụn lá được loại bỏ bằng cách lọc (màng lọc nylon có cỡ lưới 250µm). Tế bào nguyên sinh trong huyền phù được loại bỏ bằng cách ly tâm tại 200xg (15 phút), và chất nổi trên bề mặt được làm sạch thêm bằng cách ly tâm ở 5000xg (15 phút).

Hoạt tính tương đối và số lượng HA trong mỗi chất chiết cây này được trình bày trong bảng 3. Lượng HA được giải phóng bởi sự phân cắt bằng enzym của thành tế bào vượt trội đáng kể so với các kỹ thuật khác được sử dụng.

Bảng 3: HA-VLP được thu hồi từ chất chiết thực vật được tạo ra bằng các phương pháp cơ học hoặc enzym khác nhau. Để so sánh trên cơ sở hoạt tính và ELISA, dữ liệu đã được chuẩn hóa theo thể tích tương đối của dịch chiết lỏng của sinh khối mới. Protein thu được bằng cách sử dụng phương pháp chiết Comitrol được đặt là 100%, và các phương pháp khác so với giá trị này.

Phương pháp chiết tách	Hoạt tính tương đối	Số lượng*
Chất chiết Comitrol™	100%	100%
Chất chiết polytron	50%	150%
Chất chiết vữa	100%	220%
Chất chiết phân cắt	440%	570%

*Số lượng được đánh giá bằng phân tích ELISA

Ví dụ 2: Sự phân cắt bằng enzym của mô thực vật giải phóng HA được tổ chức thành VLP

Sự kết hợp của ly tâm vi sai và sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC) đã được sử dụng để phát hiện ra HA thu được bằng phương pháp chiết tách bằng enzym được mô tả trong bản mô tả được tổ chức là VLP. Các cây trồng *N. benthamiana* đã được thâm nhiễm nông nghiệp với AGL1/685 như được mô tả trong ví dụ 1. Lá được thu gom từ các cây sau 6 ngày thâm nhiễm và được cắt thành các mẫu ~1 cm² sau đó được phân cắt, được lọc thô và được ly tâm như được mô tả trong ví dụ 1.

Các mẫu đã làm sạch sau đó được ly tâm ở 70,000xg để cho phép tách VLP. Giọt ly tâm chứa VLP, được huyền phù hóa nhẹ trong 1/50 thể tích của muối đệm Phosphat (PBS; natri phosphat 0,1M, NaCl 0,15M pH = 7,2) trước khi được nạp trên cột SEC.

Các cột SEC thể tích 32 ml SEPHACRYL™ S-500 với các hạt có độ phân giải cao (S-500 HR : GE Healthcare, Uppsala, Sweden, Cat. No. 17-0613-10) được bảo chế với chất đệm cân bằng/giải hấp (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH8). Sắc ký SEC được thực hiện với nạp 1,5 mL mẫu VLP lên trên cột cân bằng, và giải hấp cột bằng 45 mL chất đệm cân bằng/giải hấp. Dung môi rửa giải hấp được thu gom trong các phân đoạn là 1,7 mL, và hàm lượng protein trong mỗi phân đoạn được đánh giá bằng cách trộn 10 µL phân đoạn

dung môi rửa giải hấp với 200 μ L chất phản ứng nhuộm protein Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). Mỗi lần tách được tiến hành bằng cách chuẩn với Blue Dextran 2000 (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA). So sánh các biên dạng giải hấp của cả Blue Dextran 2000 và protein chủ đã được thực hiện cho mỗi lần tách để đảm bảo tính đồng đều của các lần tách.

Phân tích protein của các phân đoạn được giải hấp SEC

Hàm lượng protein tổng cộng của các dịch chiết thô đã làm sạch đã được xác định bằng xét nghiệm Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) sử dụng albumin huyết thanh bò làm chuẩn tham chiếu. Các protein có trong các phân đoạn giải hấp SEC đã được kết tủa bằng axeton (Bollag et al., 1996), được huyền phù hóa lại trong 0,25 thể tích ete hoặc 0,05 thể tích của chất đệm nạp mẫu biến tính (Tris 0,1M có pH =6,8, xanh bromophenol 0,05%, glyxerol 12,5%, SDS 4% và beta-mercaptoetanol 5%) để phân tích SDS-PAGE hoặc phân tích thâm miễn dịch tương ứng. Sự tách bằng SDS-PAGE đã được thực hiện dưới điều kiện khử, và Coomassie Brilliant Blue R-250 đã được sử dụng cho sự nhuộm protein.

Xét nghiệm sự ngưng kết hồng cầu với H5 đã được thực hiện dựa trên phương pháp được mô tả bởi Nayak và Reichl (2004). Tóm lại, sự pha loãng hai lần liên tiếp của các mẫu thử nghiệm (100 μ L) được thực hiện trong các đĩa vi độ chuẩn 96 giếng có đáy V chứa 100 μ L PBS, lấy ra 100 μ L mẫu đã được pha loãng vào mỗi giếng. Một trăm microlit huyền phù tế bào máu đỏ ở ngựa 0,25% (Bio Link Inc., Syracuse, NY) được thêm vào mỗi giếng, và các đĩa được ủ trong khoảng thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tính thuận nghịch của sự pha loãng nhất cho thấy sự hemagglutinin hoàn toàn được ghi là hoạt tính đông kết hồng cầu. Tương tự, H5 tái tổ hợp chuẩn (A/Vietnam/1203/2004 H5N1) (Protein Science Corporation, Meriden, CT) được pha loãng trong PBS và chạy làm mẫu đối chứng trên mỗi đĩa.

Fig. 3A cho thấy rằng hoạt tính ngưng kết hồng cầu được cô đặc trong trong các phân đoạn tương ứng với thể tích trống của cột, xác nhận rằng hoạt tính ngưng kết hồng cầu bắt nguồn từ sự tổ chức cấu trúc trọng lượng phân tử cao. Phân tích SDS-PAGE (Fig. 3B) đã bộc lộ rằng các phân đoạn thể tích trống giống nhau đã nêu (các phân đoạn từ 7 đến 10) cũng thể hiện hàm lượng HA cao nhất, có dải tương ứng với monome HA0 có thể phát hiện được tại xấp xỉ 75 kDa.

Ví dụ 3: Sự phân cắt bằng enzym của mô thực vật giải phóng HA-VLP chứa ít tạp chất hơn

Các cây trồng *N. benthamiana* đã được thâm nhiễm nông nghiệp với AGL1/685 như được mô tả trong ví dụ 1. Lá được thu gom vào ngày thứ 6 sau khi thâm nhiễm và được cắt thành các mẫu $\sim 1 \text{ cm}^2$ được phân cắt, được lọc thô và được ly tâm như được mô tả trong ví dụ 1.

Sự phân cắt bằng enzym có kiểm soát của lá đã loại bỏ thành tế bào, ít nhất là một phần, do đó cho phép giải phóng protein và các thành phần có trong không gian giữa thành tế bào và màng sinh chất vào trong môi trường chiết tách. Do tất cả các protein và các thành phần trong tế bào vẫn không bị hư hại và được chứa trong hầu hết các tế bào nguyên sinh nguyên vẹn, bước ly tâm ban đầu cho phép loại bỏ chúng, do đó tạo ra dung dịch tạo ra chứa các enzym phân hủy thành tế bào, bổ sung các protein thực vật ngoài tế bào và các thành phần (phân đoạn vô bào), như được trình bày trong Fig. 4.

Fig. 4 trình bày phân tích SDS-PAGE của dung dịch tạo ra thu được sau khi phân cắt bằng enzym có kiểm soát của mô lá như được mô tả trước đó, với làn 1 thể hiện hỗn hợp enzym được sử dụng và làn 2 thể hiện dung dịch tạo ra sau khi phân cắt bằng enzym. Hàm lượng protein của chất chiết thô từ Comitrol™ được cung cấp trên làn 3 để so sánh. Tỷ lệ sinh khối:chất đệm đối với chất chiết được biểu diễn trong làn 2 là 1:5 (trọng lượng/thể tích) trong khi tỷ lệ này là 1:1 (trọng lượng/thể tích) được biểu diễn trong làn 3. Mỗi làn 2 hoặc 3 do đó chứa các protein thu được từ lượng cân bằng của vật liệu ban đầu. Đối với tỷ lệ chất đệm:thực vật gần giống nhau, chất chiết thực vật thu được bằng phương pháp chiết tách cơ học đã chứa nồng độ protein là xấp xỉ 3,5 đến 4 mg/ml, trong khi chất chiết thực vật thu được bằng cách sử dụng enzym thu được theo phương pháp trong sáng chế đã biểu diễn nồng độ protein là xấp xỉ 1 mg/ml.

Tạp chất chính có trong làn 3 đã được phát hiện ra là RubisCo (Ribuloza-1,5-bisphosphat carboxylaza oxygenaza), được cấu tạo từ hai loại nhóm con protein: chuỗi lớn (L, khoảng 55 kDa) và chuỗi nhỏ (S, khoảng 13 kDa). Tổng cộng gồm sáu dime chuỗi lớn và sáu chuỗi nhỏ thường kết hợp với nhau thành phức lớn hơn RubisCo 540 kDa. Trong khi tạp chất protein trong thực vật này được phát hiện ra ở lượng lớn trong các chất chiết thực vật có thu được từ phương pháp chiết tách cơ học (xem mũi tên trong Fig. 4), nó hầu

như không có mặt trong các chất chiết thực vật thu được bằng phương pháp phân cắt bằng enzym được mô tả trong bản mô tả. Do đó, phương pháp này cho phép loại bỏ tạp chất protein thực vật chính, ngoài các tạp chất khác, tại giai đoạn đầu của quy trình.

Ví dụ 4: Sự phân cắt bằng enzym của mô thực vật giải phóng HA-VLP trong các điều kiện trong đó nó có thể trực tiếp được thu giữ trên nhựa trao đổi cation

Các cây trồng *N. benthamiana* đã được thâm nhiễm nông nghiệp với AGL1/685 như được mô tả trong ví dụ 1. Các lá được thu gom vào ngày thứ 6 sau khi thâm nhiễm, được cắt thành các mẫu $\sim 1 \text{ cm}^2$ và được phân cắt trong 15 giờ tại nhiệt độ trong phòng trong máy lắc quỹ đạo. Chất đệm phân cắt chứa 1,0% (thể tích/thể tích) Multifect Pectinaza FE, 1,0% (thể tích/thể tích) Multifect CX CG và 1,0% (thể tích/thể tích) Multifect CX B (tất cả các chất này từ Genencor), mỗi dung dịch chất đệm phân cắt gồm Mannitol 600 mM, xitrat 75 mM, natri bisulfua 0,04% có pH= 6,0 sử dụng tỷ lệ sinh khối : chất đệm phân cắt là 1:2.5 (trọng lượng/thể tích).

Sau khi phân cắt, phân đoạn vô bào được lọc qua màng lọc nylon có cỡ lỗ 400 μm để loại bỏ mô thực vật chưa được phân cắt thô (<5% sinh khối ban đầu). Chất chiết đã lọc sau đó được ly tâm tại nhiệt độ trong phòng trong 15 phút ở 5000xg để loại bỏ các tế bào nguyên sinh và các tạp chất trong tế bào (protein, ADN, màng, túi, tế bào sắc tố, v.v.). Tiếp theo, chất nổi trên bề mặt được lọc sâu (để làm sạch) sử dụng bộ lọc bằng sợi thủy tinh 0,65 μm (Sartopore2/Sartorius Stedim) và bộ lọc 0,45/0,2 μm , trước khi được sắc ký.

Phân đoạn vô bào đã được làm sạch được nạp trên cột trao đổi cation (Poros HS Applied Biosystems) được làm cân bằng với chất đệm cân bằng/giải hấp (NaPO₄ 50 mM, NaCl 100 mM, Tween 80 0,005% pH= 6,0). Khi tia cực tím trở về không, chất chiết được giải hấp từng bước bằng chất đệm cân bằng/giải hấp chứa nồng độ NaCl tăng (500 mM). Khi cần thiết, các phân đoạn sắc ký được cô đặc 10 lần sử dụng thiết bị Amicon™ được trang bị với MWCO 10 kDa. Sự phân tích protein đã được thực hiện như được mô tả trong các ví dụ trước.

Dưới các điều kiện được nêu trên, hầu hết các enzym và protein thực vật đã không liên kết với nhựa trao đổi cation trong khi đó HA-VLP đã liên kết với nhựa trao đổi cation, do đó tạo ra sự làm giàu HA-VLP mong muốn trong phân đoạn đã giải hấp (Fig. 6). Ngoài ra, như được trình bày trong Fig. 6, làn 4 và 5, các xelulaza và pectinaza đã không liên kết

với cột trao đổi cation tại pH thấp hơn 7. Tiếp theo, sự thu hồi của HA-VLP trên cơ sở hoạt tính đông kết hồng cầu HA, là 92% trước khi nạp lên cột trao đổi cation, và là 66% trong phân đoạn đã giải hấp. Yếu tố tinh chế là 194 đã được đo trên phân đoạn đã giải hấp từ nhựa trao đổi cation.

Ví dụ 5: Bổ sung NaCl vào chất đệm phân cắt

Các cây *N. benthamiana* đã được thâm nhiễm nông nghiệp với các chủng *Agrobacterium* AGL1 mang cấu trúc biểu hiện hemagglutinin quan tâm (H1/Cal WT, B/Flo, H5/Indo or H1/Cal X179A) như được mô tả trong ví dụ 1. Các lá được thu gom vào ngày thứ 6 sau khi thâm nhiễm, được cắt thành các mẫu $\sim 1 \text{ cm}^2$ và được phân cắt theo ví dụ 4, trừ khi được lưu ý ở phần sau. Sự lọc, ly tâm và làm sạch được thực hiện như đã mô tả trong ví dụ 4.

NaCl được thêm vào chất đệm phân cắt để đánh giá tác dụng tiềm năng của nó lên tỷ lệ thu hồi HA-VLP. Các ưu thế đáng ngờ là sự phòng ngừa tiềm năng của sự kết hợp không đặc hiệu của HA với các tế bào thực vật hoặc với hạt trong huyền phù mà được loại bỏ trong quá trình làm sạch và hiệu quả tiềm năng lên sự đạt được và/hoặc sự duy trì và/hoặc sự cải thiện của độ ổn định chất keo của HA-VLP.

Việc bổ sung NaCl 500 mM vào chất đệm phân cắt dẫn đến sự tăng năng suất thu hồi HA-VLP trên một gam sinh khối sau khi loại bỏ tế bào nguyên sinh và mảnh vụn tế bào bằng cách ly tâm. Tuy nhiên, sự gia tăng này chỉ được ghi nhận đối với các chủng H1/Cal WT và B/Flo, trong khi năng suất thu hồi đối với H5 không được tăng đáng kể bởi cách tiếp cận này (bảng 4).

Bảng 4: Tác dụng của việc bổ sung NaCl trong bước phân cắt lên năng suất thu hồi HA-VLP (khi được đo bằng đơn vị hoạt tính ngưng kết hồng cầu, dil : sự cân bằng pha loãng)

Chủng HA	Điều kiện phân cắt	Nồng độ trong HA (dil/ml)	Năng suất (dil/g)	Năng suất tăng (gấp cuộn X) ¹
H5 Indo/05 (#972)	Ø NaCl	4608	12.430	1,2
	NaCl 500mM	4608	14.921	
H1 CA/07 WT (#604)	Ø NaCl	384	1.206	2,1
	NaCl 500mM	768	2.481	

H1 CA/07 X-179A (#605)	Ø NaCl	96	299	8,1
	NaCl 500mM	768	2.419	
B Flo/4 (#475)	Ø NaCl	16	52	7,5
	NaCl 500mM	128	392	

1 Năng suất (dil/g) có thêm NaCl chia năng suất (dil/g) không thêm NaCl

Việc bổ sung NaCl 500 mM trong quá trình phân cắt ngoài ra làm tăng sự giải phóng của HA-VLP trong quá trình phân cắt, mà nói cách khác dẫn đến tỷ lệ thu hồi tăng sau khi làm sạch cả hai chủng H1/Cal WT và H1/Cal X-179A (bảng 5), nhưng không làm tăng tỷ lệ thu hồi của chủng H5/Indo.

Bảng 5: Tác dụng của việc thêm NaCl vào bước phân cắt lên năng suất thu hồi HA-VLP (khi được đo bằng đơn vị hoạt tính ngưng kết hồng cầu) sau bước làm sạch.

Chủng HA	Điều kiện phân cắt	Thu hồi sau khi lọc sâu ¹	Sự tăng trong quá trình thu hồi (X-gấp nếp)
H5/Indo (#972)	Ø NaCl	100%	1,0
	NaCl 500mM	100%	
H1/Cal WT (#604)	Ø NaCl	25%	3,0
	NaCl 500mM	75%	
H1/Cal X-179A (#605)	Ø NaCl	50%	2,0
	NaCl 500mM	100%	

¹ Sự thu hồi được biểu diễn theo phần trăm của hoạt tính đông kết hồng cầu thu được sau khi lọc sâu so với hoạt tính được tìm thấy trong chất chiết được phân cắt đã ly tâm.

Trạng thái kết hợp của HA-VLP, có và không có sự thêm của NaCl trong quá trình phân cắt bằng enzym, đã được nghiên cứu sử dụng phân tích theo dõi các hạt nano (NTA) đối với H5/Indo và H1/Cal WT (tương ứng trong Fig. 7A và 7B). Chế phẩm phân tán hạt đơn đã được quan sát thấy đối với H5 khi sự phân cắt được thực hiện trong sự vắng mặt của NaCl, trong khi chế phẩm H1/Cal đã cho thấy mảng các loại hạt lớn hơn nhiều. Sự thêm NaCl và chất đệm phân cắt làm giảm sự tự kết hợp HA-VLP đối với H1/Cal, như được trình bày bởi sự phân bố hạt phân tán đơn rõ rệt được tìm thấy trong Fig. 7C. Số lượng các hạt ở 150 nm đối với H1/Cal WT-VLP đã được tăng cường (ca gấp cuộn 5 lần) bằng cách thêm NaCl 500 mM vào chất đệm phân cắt.

Ví dụ 6: Kiểm soát sự giải phóng của tế bào sắc tố

Các cây *N. benthamiana* đã được thâm nhiễm nông nghiệp với các chủng *Agrobacterium* AGL1 mang cấu trúc biểu hiện hemagglutinin quan tâm (H5/Indo) như được mô tả trong ví dụ 1. Các lá được thu gom vào ngày 6 sau khi thâm nhiễm được cắt thành các mẫu $\sim 1 \text{ cm}^2$, và được phân cắt như được mô tả trong ví dụ 4, có thêm NaCl 500 mM hoặc NaCl 500 mM và EDTA 25 mM vào chất đệm phân cắt. Sự lọc, ly tâm và làm sạch được thực hiện như đã mô tả trong ví dụ 4.

Sự giải phóng của các thành phần có màu xanh lá cây trong bước phân cắt bằng enzym dẫn đến chế phẩm được làm sạch của VLP có sự nhuộm màu xanh lá cây. Thành phần có trong dung dịch phân cắt thành thành tế bào do đó đã được tìm thấy và được điều chỉnh để thu được chế phẩm đã tinh chế VLP có sự nhuộm màu xanh nhạt, và do đó có độ tinh khiết tăng. Không muốn bị bó buộc bởi lý thuyết, do Ca^{2+} đóng một vai trò quan trọng trong giữ lại các thành phần trong các lá mỏng giữa của thành tế bào lại với nhau, và thực tế rằng có thường là một nồng độ cao của Ca^{2+} trong thành tế bào, việc thêm EDTA có càng Ca^{2+} có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc khử trùng hợp enzym của thành tế bào, do đó bảo tồn các cơ quan tế bào nguyên vẹn, như lục lạp, và ngăn cản sự giải phóng của các thành phần tế bào sắc tố xanh.

Như được trình bày trong bảng 6, việc thêm EDTA 25mM vào chất đệm phân cắt cho phép giảm sự nhuộm màu xanh lá cây của chế phẩm H5-VLP đã tinh chế, khi được đánh giá bằng cách đo sự khác nhau trong sự hấp thụ của chế phẩm ($\text{OD}_{672\text{nm}} - \text{OD}_{650\text{nm}}$). Khi các cấu trúc màu xanh lá cây được giải phóng ở lượng lớn, hoặc không được loại bỏ ổn định, chế phẩm VLP thể hiện $\square \text{OD} > 0,040$.

Bảng 6: Tác dụng của việc thêm EDTA 25 mM vào chất đệm phân cắt lên sự nhuộm màu xanh của các chế phẩm H5-VLP

	$\text{OD}_{672\text{nm}} - \text{OD}_{650\text{nm}}$
NaCl 0 mM, EDTA 0 mM	$0,071 \pm 0,061$
NaCl 500mM	$0,087 \pm 0,060$
NaCl 500 mM + EDTA 25 mM	$0,010 \pm 0,002$

Ví dụ 7: Chế phẩm đậm phân cắt khác

Các cây *N. benthamiana* đã được thâm nhiễm nông nghiệp với các chủng *Agrobacterium* AGL1 mang cấu trúc biểu hiện hemagglutinin quan tâm (H5/Indo) như được mô tả trong ví dụ 1. Các lá đã được thu gom vào ngày thứ 6 sau khi thâm nhiễm được cắt thành các mẫu $\sim 1 \text{ cm}^2$ và được phân cắt theo ví dụ 4, với sự biến đổi của chất đậm phân cắt đến gồm 0%, 0,25%, 0,5%, 0,75% hoặc 1% thể tích/thể tích của Multifect Pectinaza FE, Multifect CX- CG xelulaza và Multifect CX B xenluloza như được lưu ý trong các bảng từ 7 đến 9. Sự lọc, ly tâm và làm sạch như đã mô tả trong ví dụ 4.

Như được trình bày trong các bảng 7 và 8 sau, pectinaza đã được cho thấy rằng không cần thiết trong chất đậm phân cắt. Các mức tương tự của H5/Indo hoặc H1/Cal WT VLP có thể được chiết tách bằng phương pháp này trong sự có mặt hoặc không có mặt pectinaza. Hơn nữa, đã phát hiện ra rằng sự giảm nồng độ của xelulaza so với các ví dụ trước không có ảnh hưởng đáng kể lên chất lượng chiết tách (bảng 9).

Bảng 7: Sự giải phóng của H5/Indo VLP bởi sự phân cắt của các lá *N. benthamiana*. Tất cả các điều kiện được thử nghiệm lặp lại. (Nồng độ trong HA-VLP được đo bằng hoạt tính đông kết hồng cầu, dil: tính thuận nghịch của sự pha loãng)

Pectinaza (% thể tích/thể tích)	Xelulaza* (% thể tích/thể tích)	Nồng độ trong H5 VLP (dil/ml)
1	1	1152
0,5	1	6144
0	1	768
0	2	1536

*Multifect CX GC

Bảng 8: Sự giải phóng của H1/Cal WT VLP bởi sự phân cắt của các lá *N. benthamiana*. Tất cả các điều kiện được thử nghiệm lặp lại. (Nồng độ trong HA-VLP được đo bằng hoạt tính đông kết hồng cầu, dil: tính thuận nghịch của sự pha loãng)

Pectinaza (% thể tích/thể tích)	Xelulaza* (% thể tích/thể tích)	Nồng độ trong H1 VLP (dil/ml)
1	2	2304
0	2	3840

*1% của Multifect CX GC và Multifect CX B

Bảng 9: Sự giải phóng của H1/Cal WT VLP bởi sự phân cắt của các lá *N. benthamiana*. Tất cả các điều kiện được thử nghiệm lặp lại. (Nồng độ trong HA-VLP được đo bằng hoạt tính đông kết hồng cầu, dil: sự cân bằng pha loãng)

Pectinaza (% thể tích/thể tích)	Xelulaza* (% thể tích/thể tích)	Nồng độ trong H1 VLP (dil/ml)
1,0	1	384
0,75	1	480
0,50	1	480
0,25	1	480

*Multifect CX GC

Ví dụ 8: Sự phân cắt bằng enzym trong các điều kiện gần với pH trung tính

Sự điều chỉnh pH trong quá trình phân cắt có thể là tối ưu cho sự chiết tách của một số VLP. Tính đến rằng sự khử trùng hợp của thành tế bào diễn ra trong bước phân cắt có thể giải phóng đường có bản chất axit mà có thể axit hóa dung dịch (có nghĩa là, từ pH =6 đến pH =5) trong sự có mặt của các chất đệm thích hợp, và một số VLP (như VLP bao gồm H3/Bris và B/Flo HA) đã được chứng minh rằng có tính nhạy cao với các điều kiện tính axit trung bình, ảnh hưởng của sự axit hóa tiềm năng như vậy lên năng suất của VLP được tạo ra đã được khám phá.

Các cây *N. benthamiana* đã được thâm nhiễm nông nghiệp với các chủng *Agrobacterium* AGL1 mang cấu trúc biểu hiện hemagglutinin quan tâm (B/Flo, H5/Indo, H3/Bris) như được mô tả trong ví dụ 1. Các lá được thu gom vào ngày thứ 6 sau khi thâm nhiễm, được cắt thành các mẫu ~1 cm² và được phân cắt theo ví dụ 4, với sự biến đổi các điều kiện phân cắt tới gồm NaCl 500 mM; EDTA 25 hoặc 50 mM; natri bisulfua 0,03 hoặc 0,04 %; 0, 100, mannitol 200 hoặc 600 mM, xitrat 75, 125 hoặc 150 mM; và/hoặc NaPO₄ 75 mM; với pH của chất đệm phân cắt được điều chỉnh như được trình bày trong các bảng từ 10 đến 14. Sự lọc, ly tâm và làm sạch như đã mô tả trong ví dụ 4.

Các chế phẩm chất đệm phân cắt khác nhau đã được thử nghiệm để đạt được pH xấp xỉ 5,5 khi kết thúc quá trình phân cắt bằng enzym, bao gồm nồng độ xitrat tăng (hiệu quả đệm nằm trong khoảng pH từ 3,0 đến 5,4) và sự thêm natri phosphat (hiệu quả đệm ở pH

lớn hơn 6,0). Bảng 10 cho thấy rằng VLP từ chủng B đã được chiết tách hiệu quả hơn khi pH sau khi phân cắt gần đến pH =6.

Bảng 10: Ảnh hưởng của chế phẩm chất đệm phân cắt lên năng suất chiết của B/Flo VLP

Chế phẩm đệm ¹	Nồng độ của B/Flo VLP (dil/ml)	Nồng độ protein (mg/ml)	pH sau khi phân cắt
Xitrat 75 mM + NaCl 500mM + EDTA 25 mM có pH =6,0	1	0,92	5,0
Xitrat 75 mM pH= 6,0	0	1,43	5,6
Xitrat 125 mM + NaCl 500mM + EDTA 25 mM có pH =6,0	1,5	1,07	5,4
Xitrat 150 mM + NaCl 500mM + EDTA 25 mM có pH =6,0	1,5	1,07	5,4
Xitrat 125 mM + NaPO ₄ 75mM + NaCl 500mM + EDTA 25 mM có pH= 6,5	4	2,19	5,9

¹Tất cả các chất đệm chứa mannitol 600 mM, và natri metabisulfua 0,04%.

Tiếp theo, tác dụng của sự môi phân cắt tại pH cao hơn nhằm để đạt được giá trị pH gần với pH =6,0 đã được thử nghiệm. Như được trình bày trong bảng 11, sự phân cắt của thành tế bào với các điều kiện gần trung tính đã nêu là có thể thực hiện được, và không làm giảm năng suất chiết tách đối với H5/Indo VLP.

Bảng 11: Hiệu quả của pH ban đầu của chất đệm phân cắt lên năng suất chiết là H5/Indo VLP

pH ban đầu của dung dịch phân cắt ¹	Nồng độ của H5/Indo VLP (dil/ml)	Nồng độ protein (mg/ml)	pH sau khi phân cắt
6,5	2304	2,79	6,08
6,4	1536	2,31	5,93
6,3	2304	2,40	5,81
6,2	2304	2,09	5,73
6,1	2304	1,72	5,61

¹Tất cả các chất đệm phân cắt đều chứa mannitol 600 mM, natri metabisulfua 0,04%, Xitrat 125 mM + NaPO₄ 75mM+ NaCl 500mM + EDTA 25 mM

Các thành phần khác trong dung dịch phân cắt cũng đã cho thấy rằng có thể biến đổi được mà không gây tác động tiêu cực lên năng suất chiết tách của VLP. Bảng 12 minh họa những sự biến đổi mà có thể được áp dụng với dung dịch phân cắt nhằm để nâng cao năng suất chiết tách của B/Flo VLP, trong khi thu được pH sau khi phân cắt là pH = 5,4 -5,7. Những biến đổi đã nêu bao gồm sự tăng nồng độ của xitrat và thêm chất đệm PO₄. Đã phát

hiện ra rằng sự tăng nồng độ của EDTA thường dẫn đến chất chiết được axit hóa nhiều hơn và năng suất chiết VLP thấp hơn.

Bảng 12: Tác dụng của các thành phần trong chất đệm phân cắt lên năng suất chiết của B/Flo VLP

Chế phẩm đệm ¹							
Mannitol (mM)	Xitrat (mM)	PO ₄ (mM)	EDTA (mM)	pH	Nồng độ của B VLP (dil/ml)	Nồng độ protein (mg/ml)	pH sau khi phân cắt
600	75	0	25	6,1	2	1,07	5,0
600	125	0	25	6,1	192	0,83	5,7
600	125	75	25	6,2	192	1,81	5,5
600	125	75	50	6,2	96	1,26	5,4
200	125	75	25	6,2	384	1,05	5,7
200	125	75	50	6,2	96	1,04	5,4
200	125	75	75	6,2	96	1,55	5,4

¹Tất cả các chất đệm đều chứa NaCl 500 mM, và natri metabisulfua 0,04%.

Chế phẩm đệm đã được biến đổi thêm để cải thiện năng suất chiết của H3/Brisbane VLP (bảng 13)

Bảng 13: Ảnh hưởng của nồng độ của mannitol và natri bifulfit trong dung dịch phân cắt lên năng suất chiết của H3/Bris VLP

Chế phẩm đệm					
Mannitol (mM)	Natri bifulfit (%)	EDTA (mM)	pH	Nồng độ protein (mg/ml)	pH sau khi phân cắt
600	0,04	25	6,2	1,87	5,7
600	0,04	50	6,2	1,62	5,6
200	0,03	25	6,2	1,89	5,7
200	0,03	50	6,2	1,24	5,6

¹Tất cả các chất đệm chứa Xitrat 125 mM, NaPO₄ 75 mM, NaCl 500 mM,

Như được trình bày trong các bảng 12 và 13, nồng độ mannitol có thể được giảm đến 20 mM mà không gây tác động đáng kể đến năng suất chiết VLP. Sự giảm thêm của các nồng độ mannitol đến 100 mM, và thậm chí sự bỏ qua tổng thể của mannitol từ dung dịch phân cắt, không ảnh hưởng đáng kể đến mức HA-VLP thu được (bảng 14).

Bảng 14: Sự giải phóng H5/Indo VLP từ sự phân cắt của sinh khối được thực hiện trong các chất đệm với nồng độ mannitol khác nhau

Nồng độ mannitol trong dung dịch phân cắt ¹	Nồng độ của H5/Indo VLP (dil/ml)	Nồng độ protein (mg/ml)
Thử nghiệm ² 1: không chứa mannitol	2304	1,62
Thử nghiệm ² 1: chứa mannitol 600 mM	3072	1,73
Trial ² 2: chứa mannitol 100 mM	4608	1,77
Trial ² 2: chứa mannitol 600 mM	4608	2,0

¹Tất cả các chất đệm chứa xitrat 75 mM có pH 6,0 + natri metabisulfua 0,04%.

²Hai thử nghiệm đã được thực hiện để so sánh năng suất chiết của VLP không chứa mannitol (thử nghiệm 1) và chứa mannitol 100mM (thử nghiệm 2) đối với mannitol 600 mM.

Ví dụ 9: Khả năng thích hợp của sự phân cắt bằng enzyme đối với rất nhiều loại HA-VLP.

Phương pháp phân cắt bằng enzyme cho sinh khối thực vật được mô tả trong bản mô tả có khả năng được áp dụng để chiết tách nhiều loại HA-VLP. Thêm sự chiết HA-VLP bao gồm H5/Indo, H1/Cal WT VLP, H3/Bris và B/Flo được trình bày trong các ví dụ trước, phương pháp được mô tả trong sáng chế cũng đã cho thấy là thích hợp đối với sự chiết của of HA-VLP từ H1/Bris và H1/NC theo mùa, như được trình bày trong bảng 15.

Bảng 15: Sự giải phóng của H1/Bris và H1/NC VLP theo mùa từ sự phân cắt của lá N. benthamiana đã thâm nhiễm nông nghiệp. (Nồng độ trong HA được đo bằng hoạt tính đông kết hồng cầu, dil: số nghịch đảo của độ pha loãng)

Chủng HA	Nồng độ trong HA (dil/ml)
H1/Bri	1536
H1/NC	384

Ví dụ 10: Sự bào chế, biểu hiện và phân tích kháng thể

Sự kết hợp của cấu trúc biểu hiện P19 (cấu trúc #595)

C2B8 là kháng thể đơn dòng khảm (chuột/người) trực tiếp chống lại kháng nguyên đặc hiệu tế bào B CD20 được biểu hiện trên u lympho non-Hodgkin's (NHL). C2B8 gián tiếp bổ sung và độc tố gây hại tế bào gây ra bởi tế bào phụ thuộc kháng thể và có ảnh hưởng chống tăng sinh trực tiếp đối với các dòng tế bào B ác tính trong ống nghiệm (N Selenko et. al., Leukemia, October 2001, 15 (10); 1619-1626).

Đoạn ADN bao gồm 84 bp của đoạn khởi động alfalfa plastocyanin, trình tự chuỗi nhẹ C2B8 hoàn toàn và đoạn kết thúc alfalfa plastocyanin đã được tổng hợp (đoạn LC). Đoạn LC được chèn bên hông bởi vị trí giới hạn DraIII (được phát hiện ra trong đoạn khởi động plastocyanin) và xuôi dòng vị trí EcoRI của đơn vị mã kết thúc plastocyanin. Trình tự của đoạn LC được biểu diễn trong Fig. 9 (SEQ ID NO:15). Plasmid chứa đoạn LC được phân cắt bằng DraIII và EcoRI và được tách dòng thành cấu trúc #660 (D'Aoust et al., Plant Biotechnol. J. 2008, 6: 930-940), được phân cắt trước đó bằng cùng enzym. Plasmid tạo ra được đặt tên là cấu trúc số 590. Đoạn ADN được tổng hợp bao gồm 84 bp đoạn khởi động alfalfa plastocyanin, trình tự ghi mã chuỗi nặng C2B8 và đoạn tận cùng alfalfa plastocyanin (đoạn HC). Đoạn HC được chèn bên hông bởi vị trí giới hạn DraIII (được phát hiện ra trong đoạn khởi động plastocyanin) và xuôi dòng vị trí EcoRI của mã kết thúc plastocyanin. Trình tự của đoạn HC được biểu diễn trong Fig. 16 (SEQ ID NO:16). Plasmid chứa đoạn HC được phân cắt bằng DraIII và EcoRI và được tách dòng thành cấu trúc #660 (D'Aoust et al., Plant Biotechnol. J. 2008, 6: 930-940), được phân cắt trước đó bằng cùng enzym. Plasmid tạo ra được đặt tên là cấu trúc số 592. Chủng *A. tumefaciens* chứa 592, được đặt tên là "AGL1/592".

Plasmid chứa kết cấu biểu hiện kép cho biểu hiện C2B8 (cấu trúc #595) đã được kết hợp như sau. Cấu trúc số 592 được phân cắt bằng EcoRI, được xử lý với đoạn Klenow để tạo ra các đầu bằng và được phân cắt với SbfI. Các đoạn tạo ra, chứa cấu trúc hoàn thiện cho sự biểu hiện của chuỗi nặng C2B8 được chèn bên hông bởi vị trí SbfI và đầu bằng, được chèn vào trong cấu trúc #590 đã được phân cắt trước đó với SbfI và SmaI. Fig. 11A biểu diễn sự biểu diễn bằng sơ đồ của cấu trúc #595 được sử dụng cho sự biểu hiện của C2B8 trong thực vật.

Sự kết hợp của cấu trúc biểu hiện P19 (cấu trúc #R472)

Cấu trúc R472, mã hóa protein p19 được mô tả ở trên (“ức chế sự bất hoạt”; xem Fig. 11B)

Bào chế sinh khối thực vật, vi khuẩn chủng, sự thâm nhiễm nông nghiệp, và sự thu hoạch

Các cây *Nicotiana benthamiana* được sinh trưởng như được mô tả ở trên (“Bào chế sinh khối thực vật, vi khuẩn chủng, sự thâm nhiễm nông nghiệp, và sự thu hoạch”) trong nhà kính dưới 16/8 chu kỳ sáng và chế độ nhiệt độ là 25°C vào ban ngày/20°C vào ban đêm. Ba tuần sau khi gieo hạt, nhổ các cây non riêng lẻ ra, trồng lại trong các chậu và để phát triển trong nhà kính trong khoảng thời gian ba tuần nữa dưới các điều kiện môi trường như nhau.

Agrobacteria mang cấu trúc #595 hoặc #R472 đã được sinh trưởng trong môi trường nước canh APS LB có chọn BBL được bổ sung với axit 2-[N-morpholino]etansulfonic 10 mM (MES), kanamycin 50 µg/ml và carbenixilin 25 µg/ml có pH=5,6 cho đến khi chúng đạt đến OD₆₀₀ > 2,0. Các huyền phù *Agrobacterium* đã được ly tâm trước khi sử dụng và được huyền phù hóa lại trong môi trường thâm nhiễm (MgCl₂ 10 mM và MES 10 mM có pH= 5,6) và được bảo quản qua đêm ở 4°C. Vào ngày thâm nhiễm, các mẻ canh trường được pha loãng 6,7 lần thể tích nuôi cấy và được cho phép làm ấm trước khi sử dụng. Tổng thể cây của *N. benthamiana* đã được đặt úp ngược trong huyền phù hóa chứa vi khuẩn trong thùng thép không gỉ kín khí dưới chân không là 20 đến 40 Torr trong 1 phút. Sau khi thâm nhiễm, các cây được mang trở lại nhà kính trong thời gian ủ là 5 ngày cho đến khi thu hoạch. Sự thâm nhiễm được thực hiện là đồng thâm nhiễm với các chủng AGL1/595 và AGL1/R472 theo tỷ lệ 1:1.

Lấy mẫu lá và chiết tách protein tan toàn thể (sự chiết tách cơ học)

Sau khi ủ, các phần trên không của cây trồng đã được thu hoạch và được sử dụng ngay. Protein tan hoàn toàn đã được chiết tách bằng cách đồng thể hóa mô thực vật trong máy trộn gia đình trong 3 phút, với 1,5 thể tích của NaPO₄ 20 mM có pH= 6,0, NaCl 0,15 M và natri metabisulfua 2 mM. Sau khi đồng thể hóa, bùn sệt của vật liệu cây đã nghiền được lọc trên Miracloth để loại bỏ mảnh vụn lớn không tan. pH của chất chiết được điều chỉnh đến 4,8 bằng cách thêm HCl 1M và các vật liệu không tan được loại bỏ bằng cách ly tâm 18 000 g trong 15 phút (4°C). Chất nổi trên bề mặt đã được thu thập và pH được điều

chỉnh đến 8,0 bằng bazơ Tris 2M. Các vật liệu không tan được loại bỏ bằng cách ly tâm tại 18 000 g trong 15 phút ở 4°C và chất chiết thô (chất nổi trên bề mặt) được thu thập. Hàm lượng protein tổng số của dịch chiết thô đã lọc được xác định bằng thử nghiệm Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) sử dụng albumin huyết thanh bò làm mẫu chuẩn.

Chiết tách protein bằng cách phân cắt thành tế bào

Mô lá được thu gom từ các cây *Nicotiana benthamiana* và được cắt thành các mẫu có diện tích $\sim 1 \text{ cm}^2$. Các mẫu lá được đặt trong 2,425 thể tích của dung dịch phân cắt (xitrat 75 mM có pH= 6,9, mannitol 600 mM, Multifect Pectinaza FE 1%, Multifect CXG 1%, Multifect B 1%). Chế phẩm này được trải đều vào các bình nông và được ủ trong 16 giờ trên máy lắc theo quỹ đạo ở tốc độ 120 vòng/phút và 18°C. Sau khi ủ, mảnh vụn lá được loại bỏ bằng cách thấm nhiễm trên màng lọc nylon (kích thước lưới 250 μm). Chất chiết được ly tâm tại 5 000 g trong 15 phút. (22°C) và chất nổi trên bề mặt được thu thập và được lọc trên sợi thủy tinh có đường kính 0,65 μm . Chất chiết được điều chỉnh đến pH= 6,0 bằng bazơ Tris 0,5 M và được lọc trên màng PES 0,45/0,22 μm .

Kết tủa amoni sulfat và tinh chế kháng thể

Amoni sulfat đã được thêm từ từ vào chất chiết protein để đạt đến sự bão hòa 45%. Chất chiết được giữ trên nước đá trong 60 phút và được ly tâm tại 18 000 trong 20 phút. (4°C). Chất nổi trên bề mặt được bỏ đi và giọt được giữ đông lại (-80°C) cho đến khi sử dụng.

Giọt protein đã đông lại được làm tan và được huyền phù hóa lại trong 1/10 thể tích (so với thể tích trước khi kết tủa) của dung dịch huyền phù hóa lại protein (Tris 50 mM có pH=7,4, NaCl 150 mM). Dung dịch đã được ly tâm tại 12 000 g trong 20 phút, (4°C) để loại bỏ các chất không tan. Dung dịch protein được nạp lên nhựa MabSelect Sure (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada). Cột được rửa với 10 CV Tris 50 mM pH=7,4, NaCl 150 mM và kháng thể được giải hấp với 6 CV của natri xitrat 100 mM có pH=3,0. Thể tích giải hấp được thu gom trong 1 CV phân đoạn trong các ống chứa 1/10 CV của Tris 2M có pH= 7,4, NaCl 150 mM. Các phân đoạn giải hấp được chọn trên cơ sở hàm lượng protein (được đo bằng Bradford) và các phân đoạn được chọn được kết hợp và được giữ đông lạnh (-80°C) trước khi phân tích.

Định lượng protein và phân tích SDS-PAGE

Hàm lượng protein tổng cộng đã được xác định bằng xét nghiệm Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) sử dụng albumin huyết thanh bò (đối với các chất chiết protein thô) hoặc rituximab thương mại (Rituxan[®], Hoffmann-La Roche, Mississauga, Canada) (đối với các kháng thể đã tinh chế) làm chuẩn tham chiếu. SDS-PAGE được nhuộm Coomassie đã được thực hiện như được mô tả bởi Laemmli (Nature 1970, 227: 680–685).

Sự định lượng C2B8 bởi ELISA

Các đĩa nhiều giếng (Immulon 2HB, ThermoLab System, Franklin, MA) đã được phủ với 2,0 µg/ml của IGG người kháng chuột đơn dòng (Abcam, Ab9243) trong chất đệm cacbonat 50mM (pH= 9,6) tại 4°C trong 16 đến 18 giờ. Các đĩa nhiều giếng sau đó được phong bế thông qua sự ủ trong 1 giờ trong casein 1% trong muối đệm phosphat (PBS) (Pierce Biotechnology, Rockford, Il) tại 37°C. Đường cong chuẩn đã được tạo ra với các dung dịch loãng của Rituximab (Rituxan[®], Hoffmann-La Roche, Mississauga, Canada). Khi thực hiện các xét nghiệm miễn dịch, tất cả các dung dịch loãng (đối chứng và mẫu) được thực hiện trong chất chiết thực vật thu được từ mô thực vật được thâm nhiễm và được ủ với chất tiêm truyền (AGL1/R472 only) để loại bỏ hiệu ứng chất nền. Các đĩa được ủ với các mẫu protein và các dung dịch loãng đường cong chuẩn trong 1 giờ ở 37 °C. Sau ba đĩa với 0,1% Tween-20 trong PBS (PBS-T), các đĩa được ủ với IgG người kháng lừa được liên hợp với peroxidaza (dung dịch loãng 1/4000 trong dung dịch đệm phong bế) (Jackson ImmunoResearch 709-035-149) trong 1 giờ tại 37 °C. Sự rửa với PBS-T được lặp lại và các đĩa được ủ với chất nền 3,3', 5,5'-Tetrametylbenzidin (TMB) Sure Blue peroxidaza (KPL, Gaithersburg, MD). Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm HCl 1N và sự hấp thụ được đọc tại 450 nm. Mỗi mẫu được phân tích ba lần và các nồng độ được nội suy trong tỷ lệ tuyến tính của đường cong chuẩn.

Phân tích N-glycan

Các mẫu chứa C2B8 (RituxanTM; 50 µg) đã được tách trên 15% SDS/PAGE. Các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đã được bộc lộ với xanh Coomassie và dải protein tương ứng với chuỗi nặng được cắt và được cắt thành các đoạn nhỏ. Các đoạn được rửa ba lần với 600 µL dung dịch của NH₄HCO₃ 0,1M / CH₃CN (1/1) trong 15 phút mỗi lần và được sấy khô.

Sự giảm cầu nối disulfua diễn ra bởi sự ủ của các đoạn gelyo trong DTT 0,1M trong NH₄HCO₃ 0,1M, tại 56°C trong 45 phút. Sự Alkylat đã được thực hiện bằng cách thêm

600 μL dung dịch của iodoaxetamid 55 mM trong NH_4HCO_3 0,1M, tại nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Chất nổi trên bề mặt được loại bỏ và các đoạn polyacrylamit được rửa lại một lần trong NH_4HCO_3 0,1M / CH_3CN (1/1).

Các protein sau đó được phân cắt với 7,5 μg trypsin (Promega) trong 600 μL NH_4HCO_3 0,05M, tại 37°C trong 16 giờ. Hai trăm μL của CH_3CN đã được thêm vào và chất nổi trên bề mặt được thu gom. Các đoạn gel sau đó được rửa với 200 μL NH_4HCO_3 0,1M, sau đó được rửa lại với CH_3CN 200 μL và cuối cùng được rửa với 200 μL axit formic 5%. Tất cả các chất nổi trên bề mặt được kết hợp và được làm khô lạnh.

Glycopeptit được tách từ các peptit bằng sắc ký trên lõi lọc Sep-Pack C18. Các glycopeptit được giải hấp đặc biệt với CH_3CN 10% trong nước và sau đó được phân tích bằng MALDI-TOF-MS trên dụng cụ Voyager DE-Pro MALDI-TOF (Applied Biosystems, USA) được trang bị với laser nitơ 337-nm. Phổ khối lượng đã được thực hiện trong chế độ chiết tách chậm trong thiết bị phản xạ sử dụng axit dihydrobenzoic (Sigma-Aldrich) làm chất nền.

Ví dụ 11: So sánh năng suất chiết tách kháng thể C2B8

Sự phân cắt bằng enzym đã được so sánh với sự chiết tách cơ học đối với sự chiết tách kháng thể C2B8. Các cây *N. benthamiana* đã được thâm nhiễm agro với AGL1/595 và AGL1/R472. Sau 6 ngày ủ, các lá được thu hoạch và các protein được chiết tách bằng sự phân cắt bằng enzym hoặc sự chiết tách cơ học. Các lần chiết tách được thực hiện hai lần và các chất chiết tạo ra được so sánh về thể tích, nồng độ protein và hàm lượng kháng thể (C2B8). Kết quả được trình bày trong bảng 16.

Bảng 16: So sánh năng suất chiết tách của sự phá vỡ cơ học (chiết tách bằng máy trộn) và sự phân cắt bằng enzym của thành tế bào

Mê chiết tách	Sinh khối được xử lý (g)	Thể tích chất chiết thô (ml)	Nồng độ protein trong chất chiết (mg/ml)	Nồng độ C2B8 (%TSP)	Năng suất chiết tách C2B8 (mg C2B8/kg FW)
Máy trộn, mẻ số 1	700	1400	2,42	3,33%	161,4
Máy trộn, mẻ số 2	700	1480	2,47	3,65%	190,5
Phân cắt, mẻ số 1	700	2337	1,45	4,89%	236,6
Phân cắt, mẻ số 2	700	2233	1,64	4,68%	244,9

Từ 700 g sinh khối, sự chiết tách cơ học đã tạo ra trung bình là 1440 ml chất chiết protein trong khi đó sự phân cắt đã tạo ra 2285 ml chất chiết protein. Phần trăm của kháng thể C2B8 trong chất chiết từ sự phân cắt (giá trị trung bình là 4,79% protein đã chiết tách) cao hơn so với phần trăm của kháng thể C2B8 trong chất chiết được tạo ra trong máy trộn (giá trị trung bình là 3,49% protein đã chiết tách). Đồng thời, thể tích chất chiết cao hơn và nồng độ của kháng thể cao hơn được phát hiện ra trong chất chiết dẫn đến năng suất chiết tách bằng phân cắt là 37% (240,75 mg C2B8/kg trọng lượng mới) cao hơn so với năng suất chiết tách cơ học (175,95 mg C2B8/kg trọng lượng mới).

Ví dụ 13: So sánh kháng thể C2B8 đã tinh chế (hàm lượng protein)

Kháng thể C2B8 đã được tinh chế từ các chất chiết bằng sắc ký ái lực trên protein A như được mô tả trong ví dụ 10. Các sản phẩm được tinh chế từ các chất chiết thu được bằng sự chiết tách cơ học hoặc sự phân cắt đã được so sánh trên cơ sở hàm lượng protein của chúng. Biên dạng điện di của các kháng thể được tinh chế từ mỗi mẻ chiết tách được trình bày trong Fig. 12. Kết quả cho thấy rằng các biên dạng điện di của các sản phẩm được tinh chế từ sự chiết tách trong máy trộn hoặc sự phân cắt thành tế bào là tương tự.

Ví dụ 14: So sánh kháng thể C2B8 đã tinh chế (sự glycosyl hóa tại vị trí N)

Sự glycosyl hóa tại vị trí N của các protein ở chỗ sự bổ sung của cấu trúc glycan phức lên asparagin của các protein được tiết mang trình tự N-X-S/T, trong đó N là asparagin, X là bất kỳ amino axit ngoại trừ prolin và S/T là serin hoặc threonin. Glycan tiền thân được thêm vào ban đầu trong lưới nội bào trong quá trình dịch mã protein, và trong thời gian đi qua con đường bài tiết của chúng, N-polisacarit có thể cho trưởng thành. Từ N-glycan loại mannoza cao trong lưới nội bào (ER), sự trưởng thành của N-glycan trong thực vật bao gồm sự bổ sung và loại các phần dư glucoza, sự loại mannoza ở vị trí xa, bổ sung các phần dư N-Axetylglucosamin, xyloza, fucoza và galactoza. Sự trưởng thành của N-polisacarit trong thực vật được mô tả bởi Gomord et al. trong Post-translational modification of therapeutic proteins in plants (Curr. Opin. Plant Biol. 2004, 7: 171-181). Enzym của con đường N-glycosyl hóa được định vị tại các địa điểm chính xác trong từng ngăn của con đường bài tiết, cụ thể là lưới nội bào, cis-Golgi, Golgi trung gian và Golgi chuyển tiếp. Do đó, mô hình glycosyl hóa ở vị trí N của protein sẽ khác phụ thuộc lên vị trí của nó tại thời điểm chiết tách. Chúng tôi đã quan sát thấy trước đó rằng tỷ

lệ nhất định của kháng thể được tạo ra sử dụng sự thâm nhiễm nông nghiệp *N. benthamiana* gây nhiều các N-glycan không trưởng thành thuộc loại mannoza cao mặc dù được nhắm mục tiêu đến không bào (Vézina et al., *Plant Biotechnol. J.* 2009 7: 442-455). Sự quan sát tương tự đã được báo cáo trong tài liệu khác (Sriraman et al., *Plant Biotechnol. J.* 2004, 2, 279-287). Trong cả hai trường hợp, sự có mặt của các N-glycan không trưởng thành lên tỷ lệ nhất định của kháng thể được giải thích là hậu quả của sự có mặt của kháng thể trong các ngăn ban đầu của con đường bài tiết tại thời điểm chiết tách.

Nghiên cứu sau đã nghiên cứu sự chiết tách của các glycoprotein được tiết bởi sự phân cắt thành tế bào là các protein tái tổ hợp đang chiết tách được ưu tiên mang N-glycan phức. Các kháng thể và các glycoprotein được tiết vào trong không bào được mong đợi mang N-glycan đã hoàn toàn trưởng thành. N-glycan trưởng thành phổ biến nhất mang các gốc N-acetylglucosamin hoặc galactosa tận cùng và còn được gọi tên là N-glycan phức. Ngược lại, N-glycan không trưởng thành, hầu hết được tìm thấy trên các protein đang trên con đường bài tiết, chứa các gốc mannoza tận cùng. Hàm lượng mannoza cao của N-glycan trên C2B8 (RituxanTM) liên quan đến chu kỳ bán hủy giảm trong dòng máu (Kanda et al., *Glycobiology* 2006, 17: 104-118). Trong bối cảnh này, sẽ mong muốn một phương pháp chiết tách có khả năng có lợi cho việc chiết tách các glycoprotein không bào mang N-glycan phức từ thực vật.

Phép phân tích so sánh của sự glycosyl hóa tại vị trí N lên các kháng thể C2B8 đã tinh chế đã được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 10. Kết quả chứng minh rằng các kháng thể được tinh chế sinh khối được phân cắt làm thay đổi mạnh phần N-glycan oligomannosit thấp hơn đáng kể (Fig. 13A) và tạo ra phần N-glycan phức cao hơn đáng kể (Fig. 13B).

Sự chiết tách bằng cách phân cắt thành tế bào có thể được áp dụng với thực vật đồng biểu hiện glycoprotein và một hoặc nhiều enzym để biến đổi biên dạng của sự glycosyl hóa ở vị trí N như được mô tả trong WO 20008/151440 (Modifying glycoprotein production in plants; được đưa vào đơn làm tài liệu tham khảo) để làm thuận lợi cho sự thu hồi các glycoprotein mang các N-glycan trưởng thành được biến đổi. Ví dụ, N-polisacarit trưởng thành có thể được giảm hoặc loại các gốc xyloza và fucoza.

Các phương pháp biến đổi N-glycosyl có thể gồm đồng biểu hiện các protein quan tâm cùng với một mã hóa trình tự nucleotit beta-1,4-galactosyltransferaza (ví dụ, GalT, được cung cấp là SEQ ID NO: 14 WO 20008/151440), ví dụ, nhưng không giới hạn đối với GalT ở động vật có vú, hoặc GalT người, tuy nhiên GalT từ các nguồn khác cũng có thể được sử dụng. Miền xúc tác của GalT (ví dụ, các nucleotit từ 370 đến 1194 trong SEQ ID NO:14 như được mô tả trong WO 20008/151440), cũng có thể được dung hợp với miền CTS chứa N-acetylglucosaminyl transferaza (GNT1; ví dụ, bao gồm các nucleotit từ 34 đến 87 trong SEQ ID NO:17 như được cung cấp trong WO 20008/151440), để tạo ra enzym lai GNT1-GalT. Enzym lai có thể được biểu hiện đồng thời với trình tự mã hóa protein siêu cấu trúc quan tâm. Ngoài ra, trình tự mã hóa siêu cấu trúc quan tâm có thể được biểu hiện đồng thời với trình tự nucleotit mã hóa N-acetylglucosaminyltransferaza III (GnT-III; SEQ ID NO:16 như được mô tả trong WO 20008/151440). GnT-III ở động vật có vú hoặc GnT-III, GnT-III ở người từ các nguồn khác cũng có thể được sử dụng. Ngoài ra, enzym lai GNT1-GnT-III (SEQ ID NO:26; như được mô tả trong WO 20008/151440), bao gồm CTS của GNT1 được dung hợp thành GnT-III cũng có thể được sử dụng.

Toàn bộ các tài liệu trích dẫn được đưa vào trong bản mô tả làm tài liệu tham khảo, mỗi công bố riêng lẻ có thể được chỉ ra đặc biệt và cụ thể được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo và tất cả các tài liệu trích dẫn này được nêu đầy đủ trong bản mô tả. Trích dẫn tài liệu tham khảo trong bản mô tả không được hiểu hoặc không được coi là sự dẫn nhập của tình trạng kỹ thuật của sáng chế.

Một hoặc nhiều phương án được ưu tiên hiện nay của sáng chế đã được mô tả bằng cách ví dụ. Sáng chế bao gồm tất cả các phương án, cải tiến và biến đổi về cơ bản như đã mô tả ở trên và có tham chiếu đến các ví dụ và các hình vẽ. Tuy nhiên, người có chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng sẽ rõ ràng hơn về số lượng các biến đổi và cải tiến có thể được tạo ra mà không vượt ra ngoài phạm vi của sáng chế như được xác định trong yêu cầu bảo hộ. Ví dụ về những cải tiến đó bao gồm sự thay thế các phương án tương đương đã biết đối với bất kỳ khía cạnh của sáng chế nhằm đạt được cùng kết quả về cơ bản theo cùng cách.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất protein, hoặc siêu cấu trúc protein có nguồn gốc thực vật, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:
 - a. thu nhận thực vật hoặc vật chất thực vật chứa protein hoặc protein siêu cấu trúc tập trung tại khoảng gian bào; trong đó vật chất thực vật bao gồm toàn bộ thực vật, lá, thân, quả, rễ thực vật hoặc tổ hợp của chúng;
 - b. tạo ra phân đoạn tế bào trần/tế bào có vách không hoàn chỉnh và phân đoạn gian bào bằng cách xử lý thực vật hoặc vật chất thực vật bằng hỗn hợp enzym nhiều thành phần phân giải thành tế bào bao gồm xenlulaza, hoặc hỗn hợp enzym nhiều thành phần phân giải thành tế bào chứa một hoặc nhiều hơn một xenlulaza và pectinaza, trong đó tỷ lệ xenlulaza so với pectinaza từ 1:1 đến 1:0,25; và,
 - c. thu hồi phân đoạn gian bào, phân đoạn gian bào này chứa các protein, hoặc protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật, trong đó protein siêu cấu trúc có phân tử lượng từ 75 đến 1500 kDa.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tỷ lệ xenlulaza so với pectinaza là từ 1:1, 1:0,75, 1:0,5, hoặc 1:0,25.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hỗn hợp enzym nhiều thành phần phân giải thành tế bào còn chứa thêm chất đệm hoặc hệ đệm mà duy trì độ pH trong khoảng từ 5 đến 7,8, chất thẩm thấu hoặc tổ hợp của cả hai thành phần này.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó bước tạo ra (bước b) bao gồm phân giải thực vật hoặc vật chất thực vật bằng hỗn hợp enzym nhiều thành phần phân giải thành tế bào để tạo ra phân đoạn đã phân giải và bước thu hồi (bước c) bao gồm lọc phân đoạn đã phân giải để tạo ra phân đoạn đã lọc và thu hồi protein, hoặc protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật từ phân đoạn đã lọc này.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó hỗn hợp enzym nhiều thành phần phân giải thành tế bào không bao gồm một hoặc nhiều lipaza, proteaza hoặc pectinaza.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó nồng độ một hoặc nhiều hơn một pectinaza nằm trong khoảng từ 0,01% thể tích/thể tích đến 2,5%

thể tích/thể tích hoặc trong đó nồng độ một hoặc nhiều hơn một xenlulaza nằm trong khoảng từ 0,1% đến 5% trọng lượng/thể tích.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó ở bước thu nhận (bước a), thực vật được biến nạp bằng trình tự axit nucleic mã hóa protein, hoặc protein siêu cấu trúc, được chọn từ nhóm gồm peptit, protein, cụm protein hình hoa, phức protein, proteasom, metabolon, phức phiên mã, phức tái tổ hợp, phức quang hợp, phức vận chuyển qua màng, phức hệ lỗ nhân, hạt protein cỡ nano, glycoprotein, kháng thể, kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể đơn dòng chuỗi đơn, protein vỏ virus, protein cấu trúc virus, protein capsid virus, protein màng virus, protein khảm, phức protein khảm, hạt protein khảm cỡ nano, glycoprotein khảm, kháng thể khảm, kháng thể đơn dòng khảm, kháng thể đơn dòng chuỗi đơn khảm, hemagglutinin khảm, protein vỏ virus, protein cấu trúc virus, protein capsid virus, protein màng virus, và thực vật hoặc vật chất thực vật được thu hoạch.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó axit nucleic được đưa vào thực vật theo kiểu tạm thời hoặc trong đó, axit nucleic được tích hợp ổn định trong hệ gen của thực vật.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó ở bước thu nhận (bước a), thực vật được trồng và thực vật hoặc vật chất thực vật được thu hoạch hoặc trong đó phương pháp này còn bao gồm bước d) tinh chế protein, hoặc protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật từ phân đoạn gian bào.
10. Phương pháp theo điểm 7 hoặc 8 trong đó axit nucleic mã hóa kháng thể đơn dòng hoặc hemagglutinin cúm.
11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó protein, hoặc protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật không bao gồm neuraminidaza hoặc protein M.
12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó vật chất thực vật là lá.
13. Phương pháp theo điểm 4, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước d) tách protein, hoặc protein siêu cấu trúc trong phân đoạn đã lọc ra khỏi các mảnh tế bào và các vật liệu không tan hoặc d) tinh chế protein, hoặc protein siêu cấu trúc có nguồn gốc thực vật từ phân đoạn đã lọc.

14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó bước tách được thực hiện bằng cách ly tâm hoặc trong đó bước tách được thực hiện bằng cách lọc sâu.

15. Phương pháp theo điểm 9 hoặc 13, trong đó bước tinh chế bao gồm lọc phân đoạn bằng phương pháp lọc sâu để tạo ra sản phẩm chiết đã làm trong, sau đó sắc ký sản phẩm chiết đã làm trong này bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước, nhựa trao đổi cation hoặc sắc ký ái lực, hoặc kết hợp các phương pháp này.

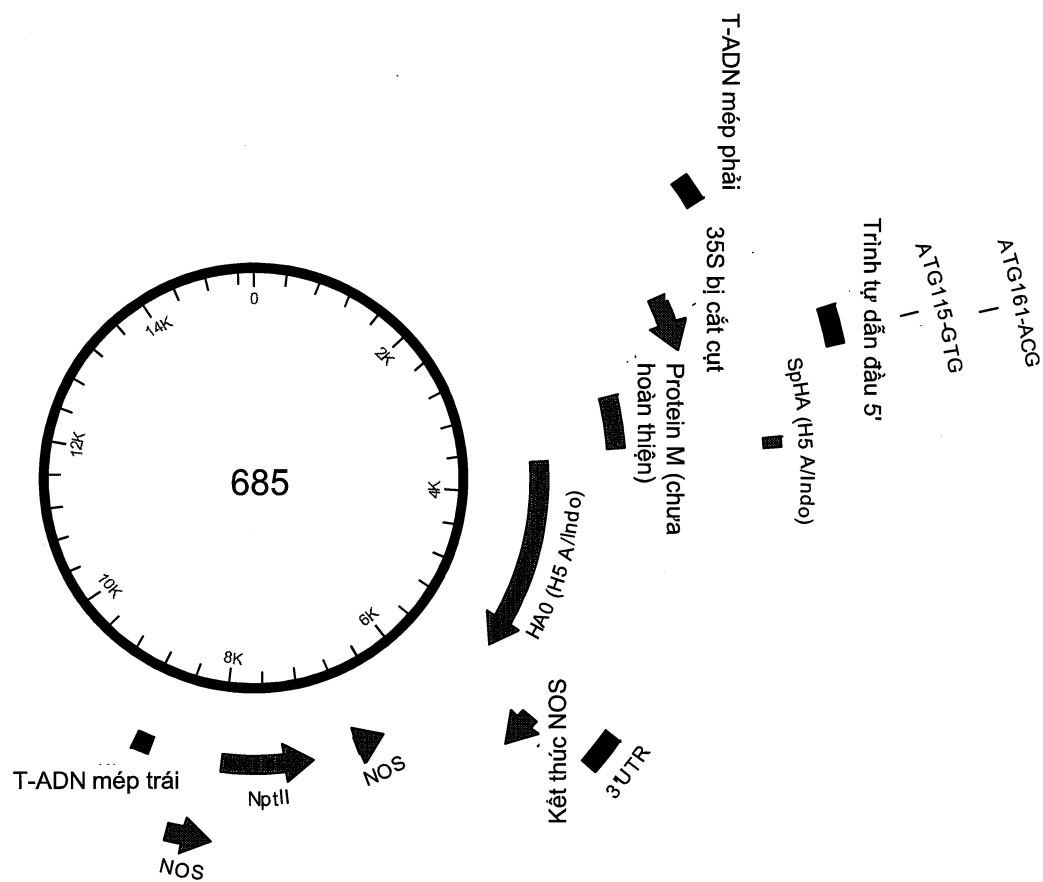


Fig. 1

Fig. 2A

TTAATTAAGAATTCGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTA
TTGAGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCAT
CGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAA
AAGAAGACGTTCCAACCACGCTCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGAT
GACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGG
TATTAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAAC
TCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAG
ATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACG
TAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCT
TGCTGGAGGCTGCTGTTACAGCCCCATACCTTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATA
TCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTTCTATA
AGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTAAAGC
TTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGGCCCATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAGTCAGTCT
TGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAACAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCA
TGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTG
CGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACC
CAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAAT
GACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCA
TTTTGAGAAAATCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGTAC
AGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTGAAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTAC
ATACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTTGGTACTGTGGGGAATTC
ACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCATTGGG
ACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAAGTG
GAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAAT
TTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGAATT
GGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCC
ACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCA
ACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAG
CAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATTGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAG
CAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAAGTCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCAACCAATAAGG
TCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAA
AGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGA
ACTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTTAAGAACCTCTACGA
CAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACA
AATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACCTATCCGCAGTATTCAGAAGA
AGCAAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAATAGGAACTTACCAATACTG
TCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATG
TGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAAATTTGCATTTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGT
TATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTA
ATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTGCTCCCTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTTATTA
AAAAAAAAGAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTT
GGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGCTTTCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAA
TTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAG
AGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTAT
CGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATTCTAGAGTCTCAAGCTTCGGCGCGCC

Fig. 2B

MEKIVLLLAIVSLVKSQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCDLGDKPLILRDCS
 VAGWLLGNPMCDDEFINVPESYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYIELKHLISRINHFEEKIIPKSSWSDHEASS
 GVSSACPYLGSPSFFRNVLWLIKKNSTYPTIKKSYNNNTNQEDLLVLWGIHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIG
 TSTLNQRLVPKIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGN
 CNTKQCQTPMGAINSSMPFHNHPLTIGECPKYVKSRLVLATGLRNSPQRESRRKKRGLFGAIGFIEGGWQ
 GMDVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKKM
 EDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLVDKVRQLQRLDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESIR
 NGTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWMCSNGLQCRICI

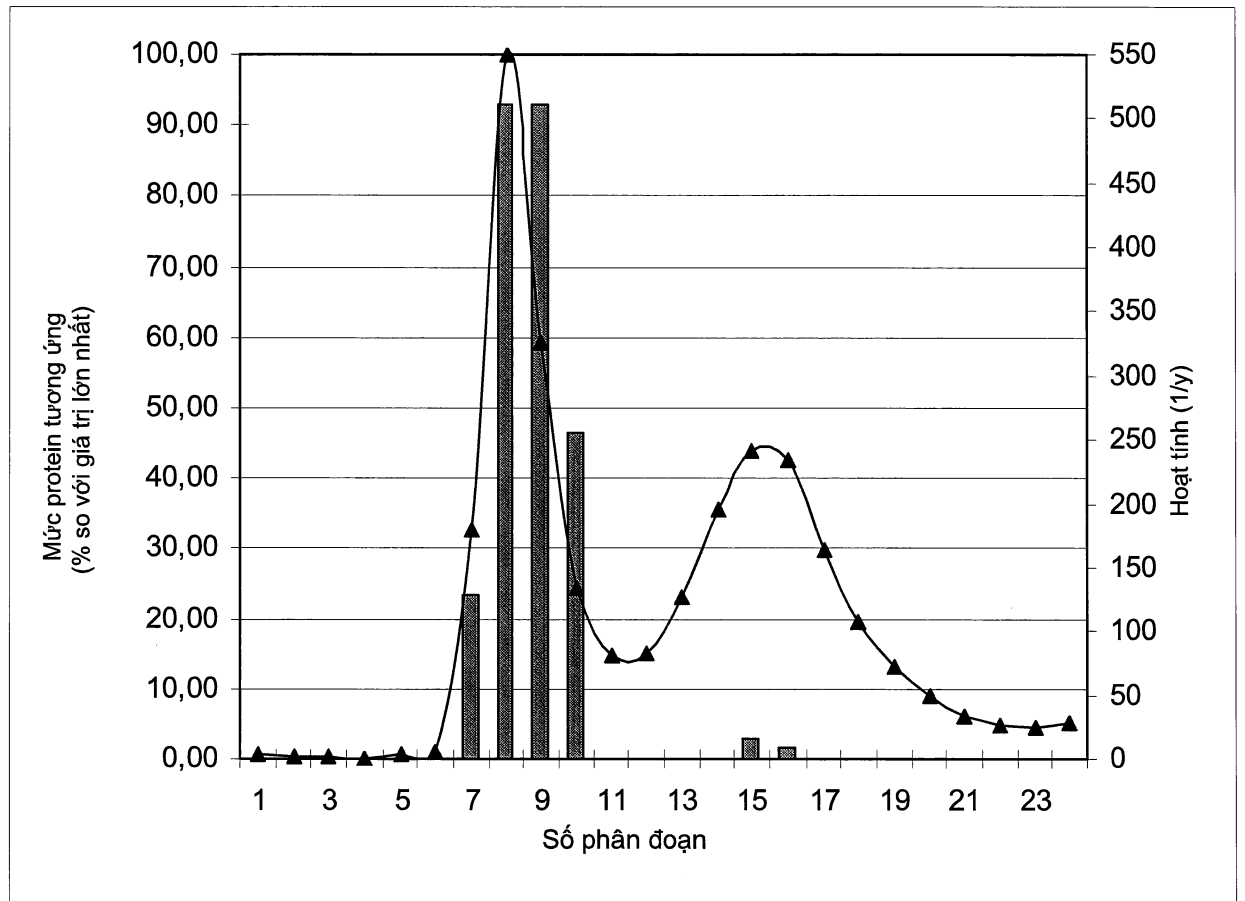
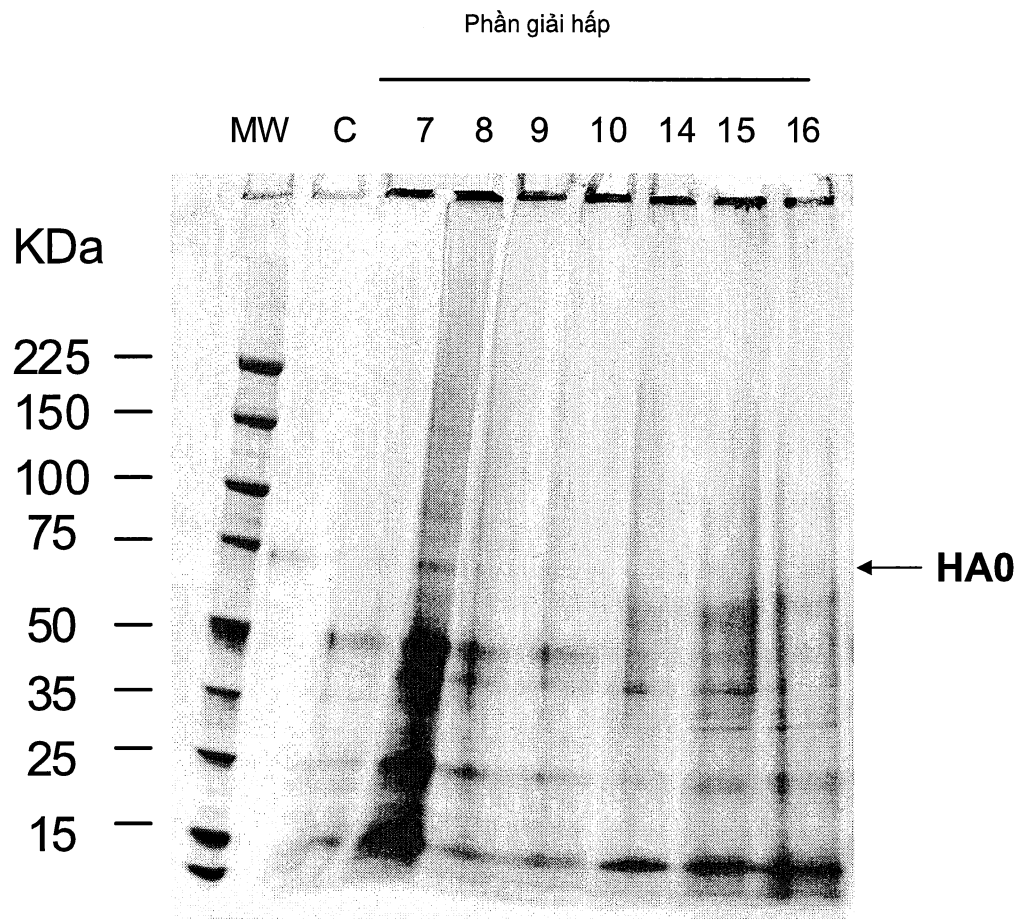


Fig. 3A

**Fig. 3B**

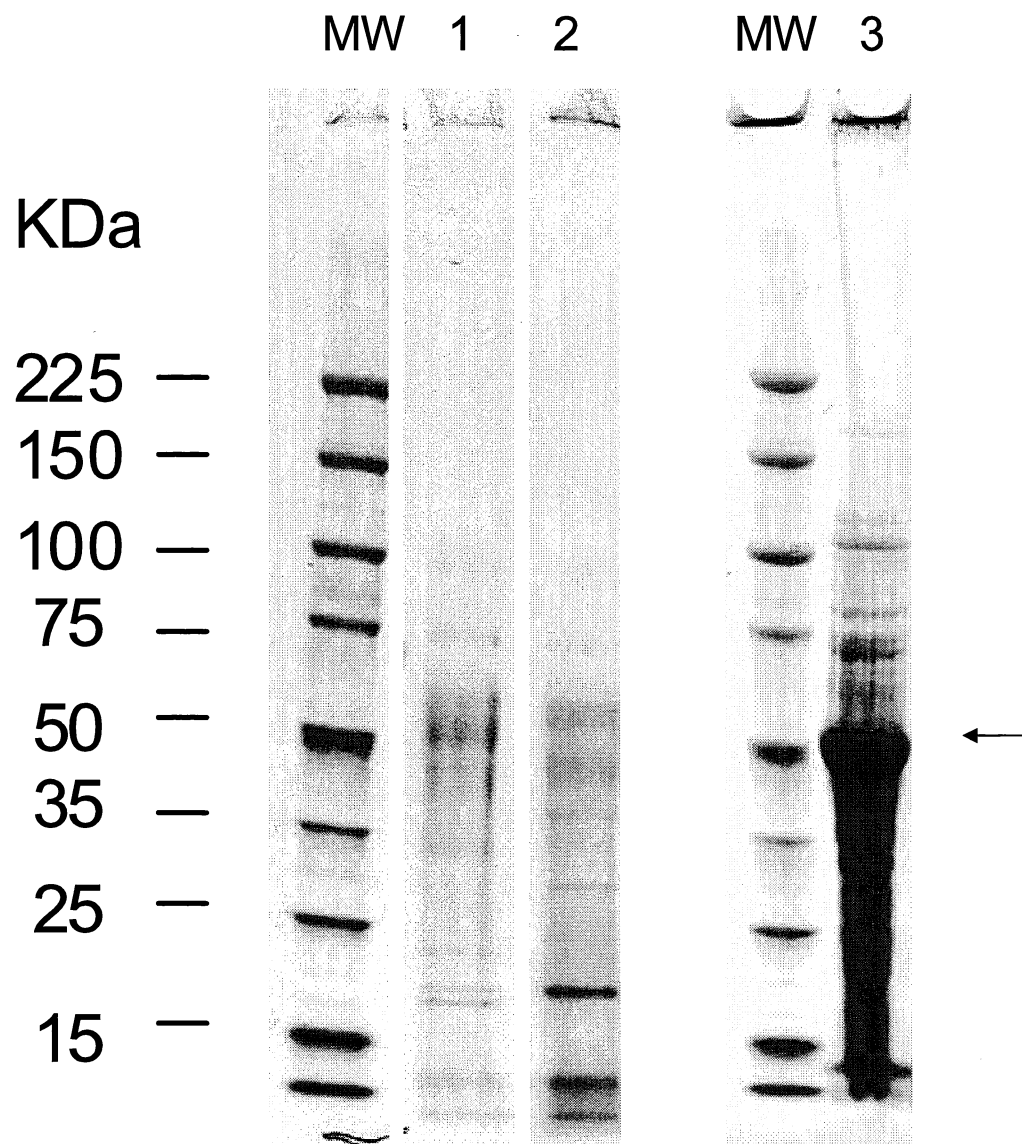
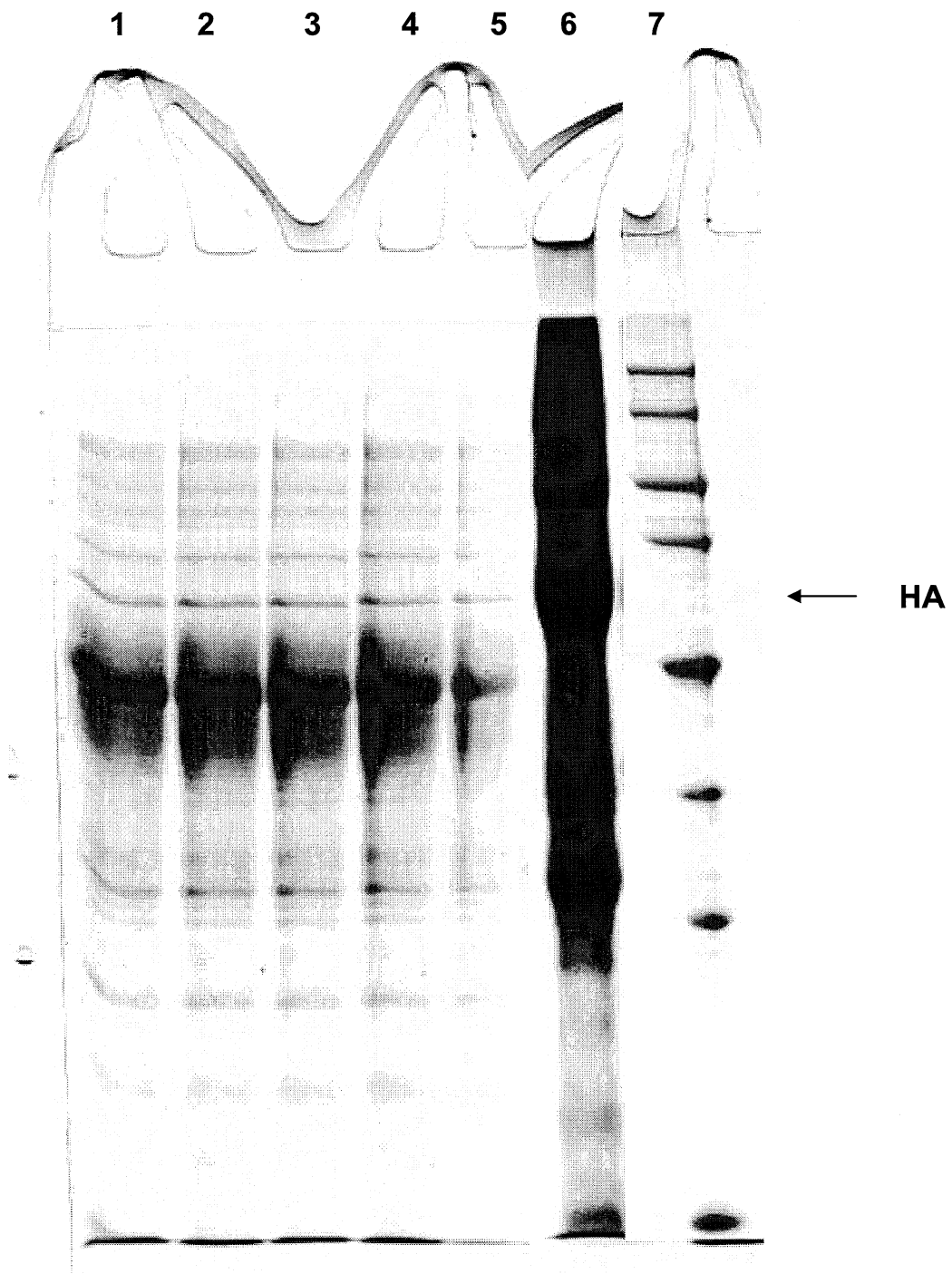
**Fig. 4**

Fig. 5

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAAACTCAAAAACCATAAAAAGTTTAAAGTTAG
 CAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAAACATTA
 GAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTGCAACATTT
 GAGAAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGA
 ATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATA
 TCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCA
 TTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAAGAAATAAATTATTTTTAAAA
 TAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTT
 GTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAG
 AGTCAGTTAACTCATTTTATATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAA
 AAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAG
 GATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGTCATCTGT
 GGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATC
 TTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAA
 AGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCA
 ATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAATTCAACAGAGCAGGTT
 GACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACG
 GGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTC
 CTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAA
 TCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCA
 GAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAG
 GAGTTAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAA
 AGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTTGGTACTG
 TGGGGAATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAACCACCTATAT
 TTCCATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACG
 GGCAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGT
 AATGGAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAA
 AAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTA
 TGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTA
 GTCCTTGCAACAGGGCTCAGAAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAAAGAGAGGACTATTTG
 GAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCAT
 AGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCA
 CCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAAT
 AACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTT
 ATAATGCCGAACCTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTTCATGACTCAAATGTAAAG
 ACCTCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAG
 TTCTATCACAATGTGATAATGAATGTATGGAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACCTATCCGCAGTA
 TTCAGAAGAAGCAAGATTAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAAATTGGAATCAATAGGAACTTAC
 CAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCT
 TTATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAGAGCTCTAAGTTAAAATGCTT
 CTTCTGCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTT
 GTTGTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAG
 AATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAAGTACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAA
 CAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACCTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGT
 TCAATAGATTAATAATGGAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACCTAC
 TAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACA

**Fig. 6**

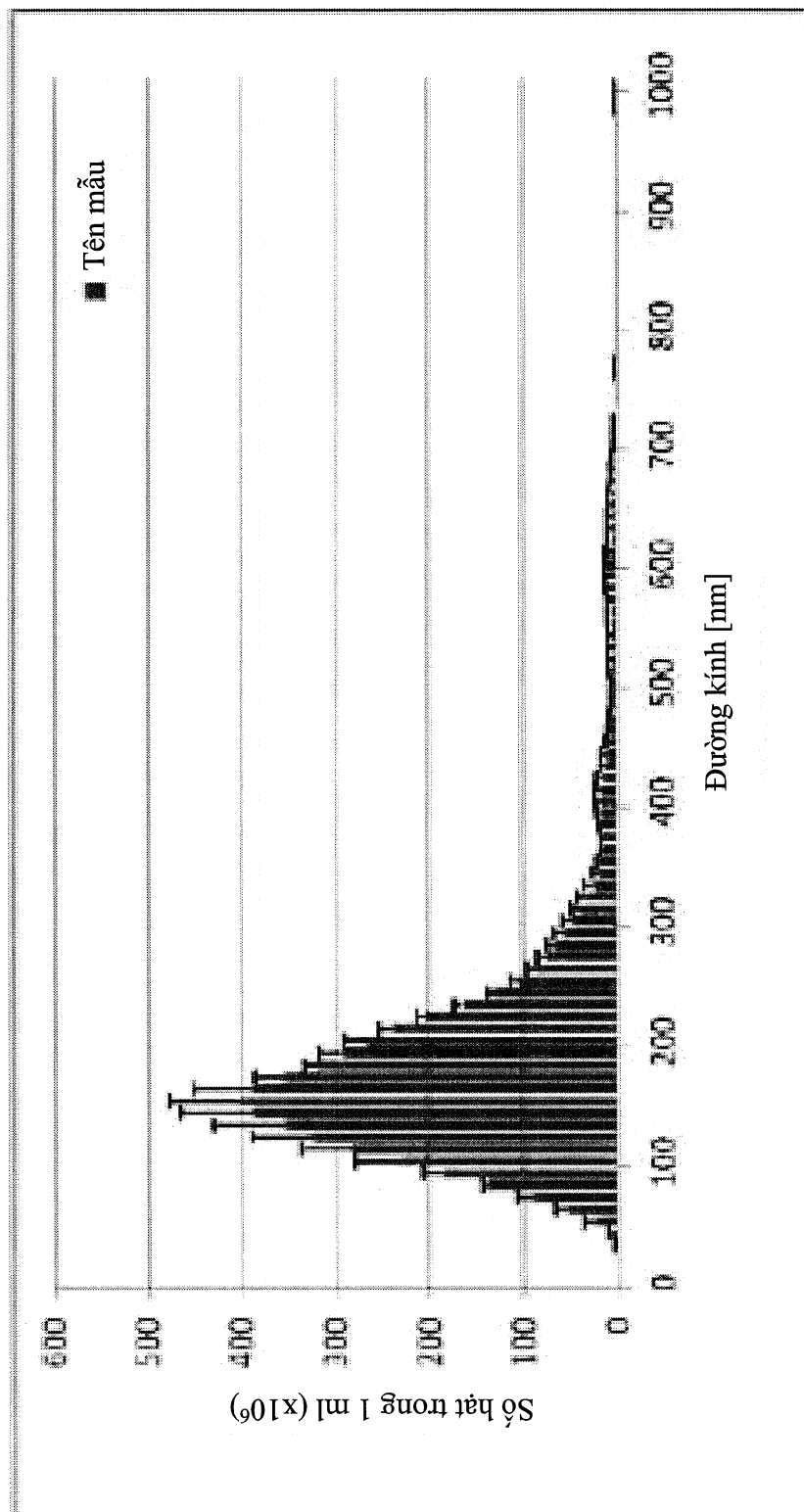


Fig. 7A

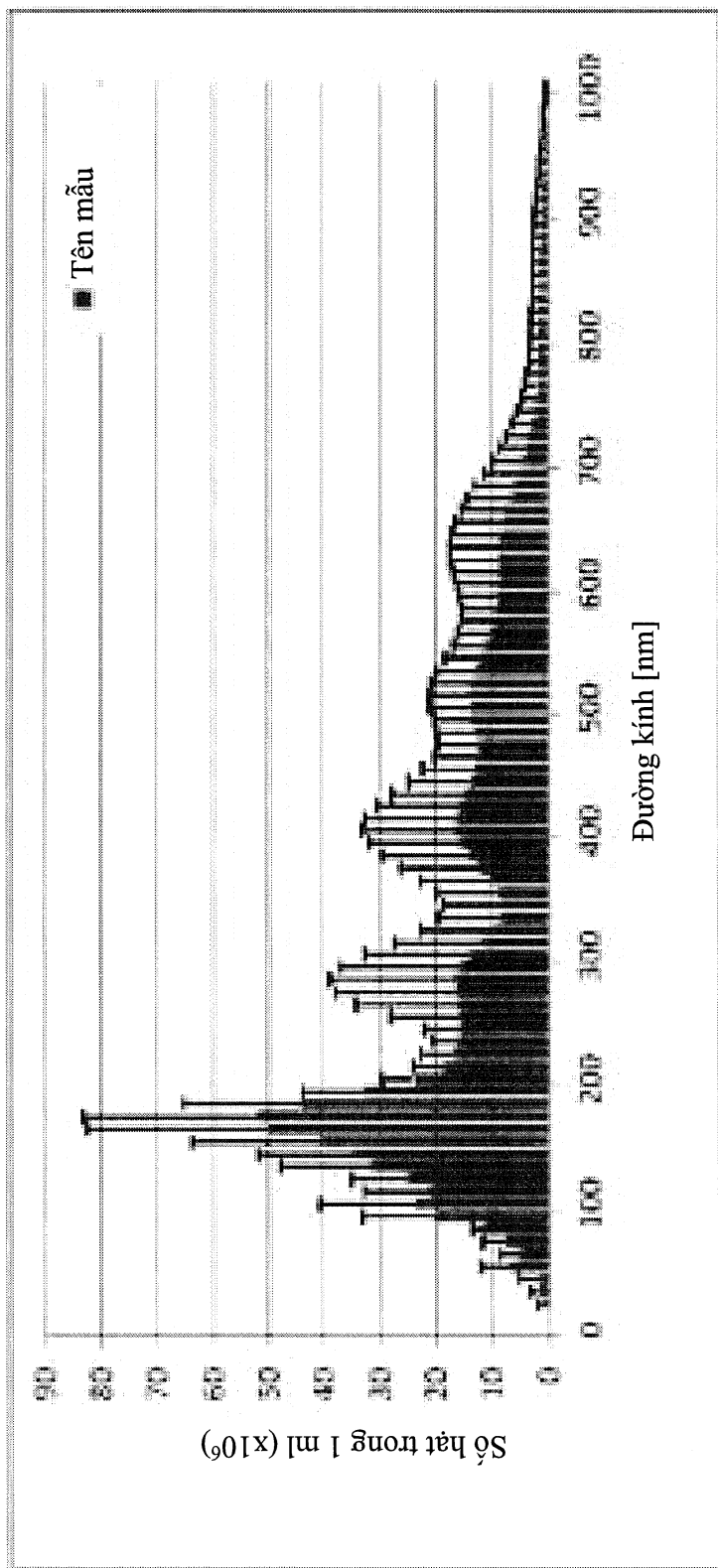


Fig. 7B

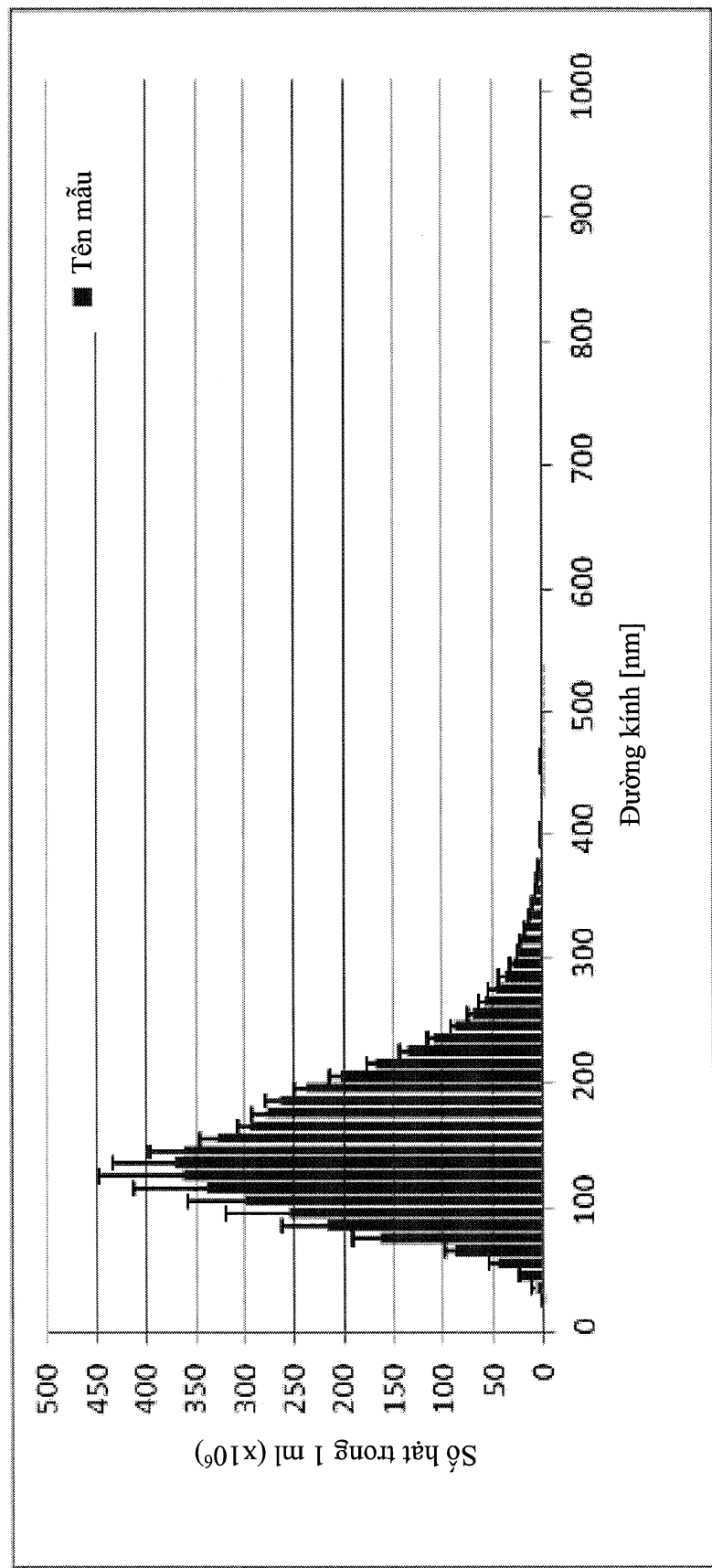
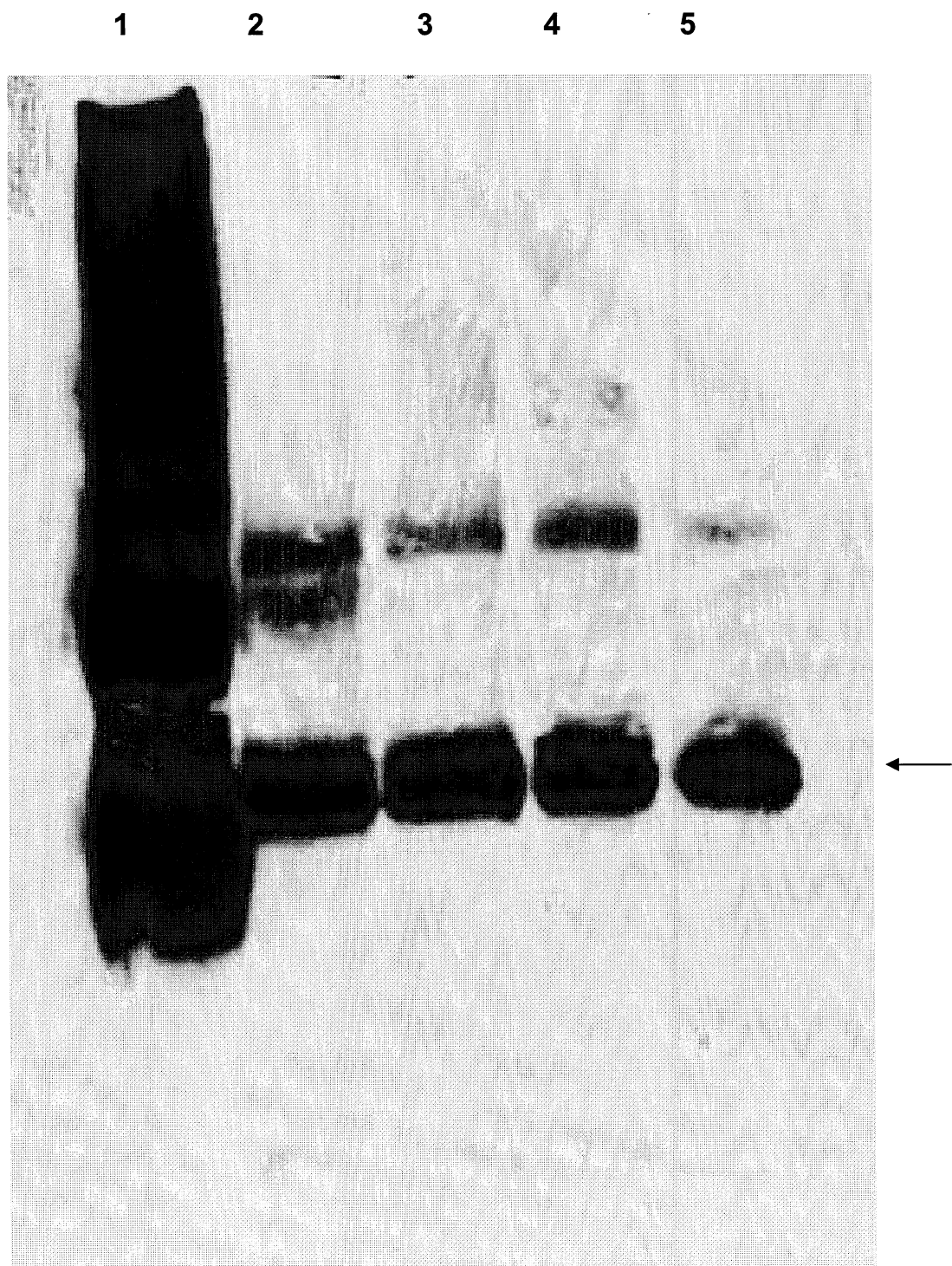


Fig. 7C

**Fig. 8**

11/17

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACT
 AATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAG
 CTTCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCC
 CAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCA
 GGGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATCCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGATCCTC
 CCCCCAACCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGC
 TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAGG
 CTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACCCACGTT
 CGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
 ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCC
 TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGC
 CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
 ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA
 AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTCACAAAGAG
 CTTCAACAGGGGAGAGTGTGAGACGTCGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTT
 ATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTTCCTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGT
 TGTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTA
 CATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGAC
 CTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCA
 CAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAA
 TAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCACTTAACGTTATTAACT
 ACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGA
 ATTC

#590 (đoạn LC; SQE ID No.15).

Fig. 9

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAA
 TTAATCATCTTGAGAGAAAATGGGTTGGAGCCTCATCTTGCTCTTCCTTGTGCTGTTGCTACGC
 GTGTCCTGTCCCAGGTACAACGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
 AAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAAACAGAC
 ACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCCTACAATC
 AGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTC
 AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGA
 CTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTGCAGCTAGCACCAAGGGCC
 CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGC
 CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGG
 CGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
 TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC
 AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCGAGC
 ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAGGACACCCCTCATGA
 TCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG
 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA
 CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
 AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
 AAAGGGCAGCCTAGGGAACCACAAGTGTACACTCTTCCACCATCTAGGGATGAGCTTACTAAGAA
 CCAAGTTTCTCTTACTTGTCTTGTGAAGGGATTTTATCCATCTGACATCGCCGTGGAATGGGAAT
 CCAACGGACAACCAGAGAACAATTACAAGACTACTCCACCAGTTCTTGATTCTGATGGATCCTTC
 TTTCTTTATTCCAAGCTTACTGTTGATAAGTCCAGATGGCAGCAAGGAAATGTGTTCTCTTGTTT
 TGTTATGCACGAAGCTCTTCATAATCATTATACTCAAAAGTCCCTTTCTCTTCTCCTGGAAAGT
 GAGACGTCGTTAAAAATGCTTCTTCGTCTCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTAAATTTTGTT
 CTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGT
 AATGTAAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAAGACATG
 AAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAATAAAATGGAACATCTTTTGCCACAAC
 TTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAG
 TTATCGAAATTCATTAACAATCACTTAACGTTATTAATACTACTAATTTTATATCATCCCTTTGA
 TAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGAATTC

#590 (đoạn HC; SQE ID No.16).

Fig. 10

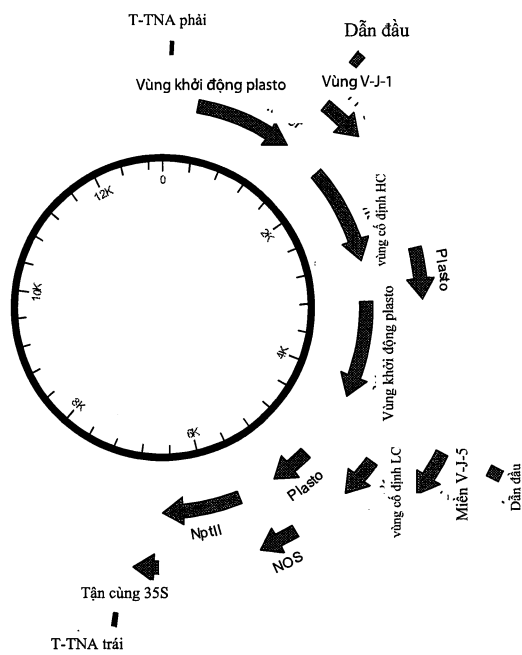


Fig. 11A

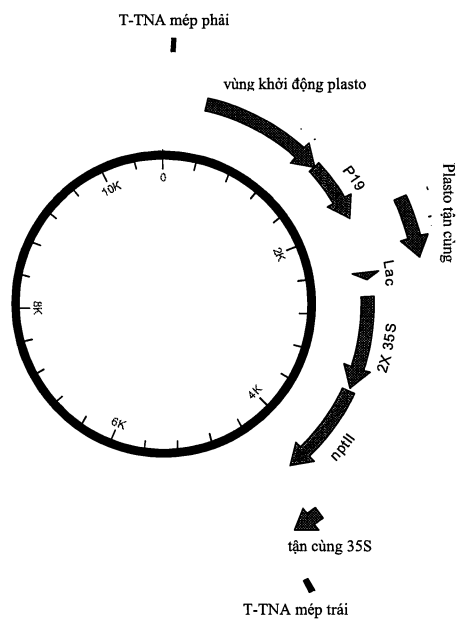


Fig. 11B

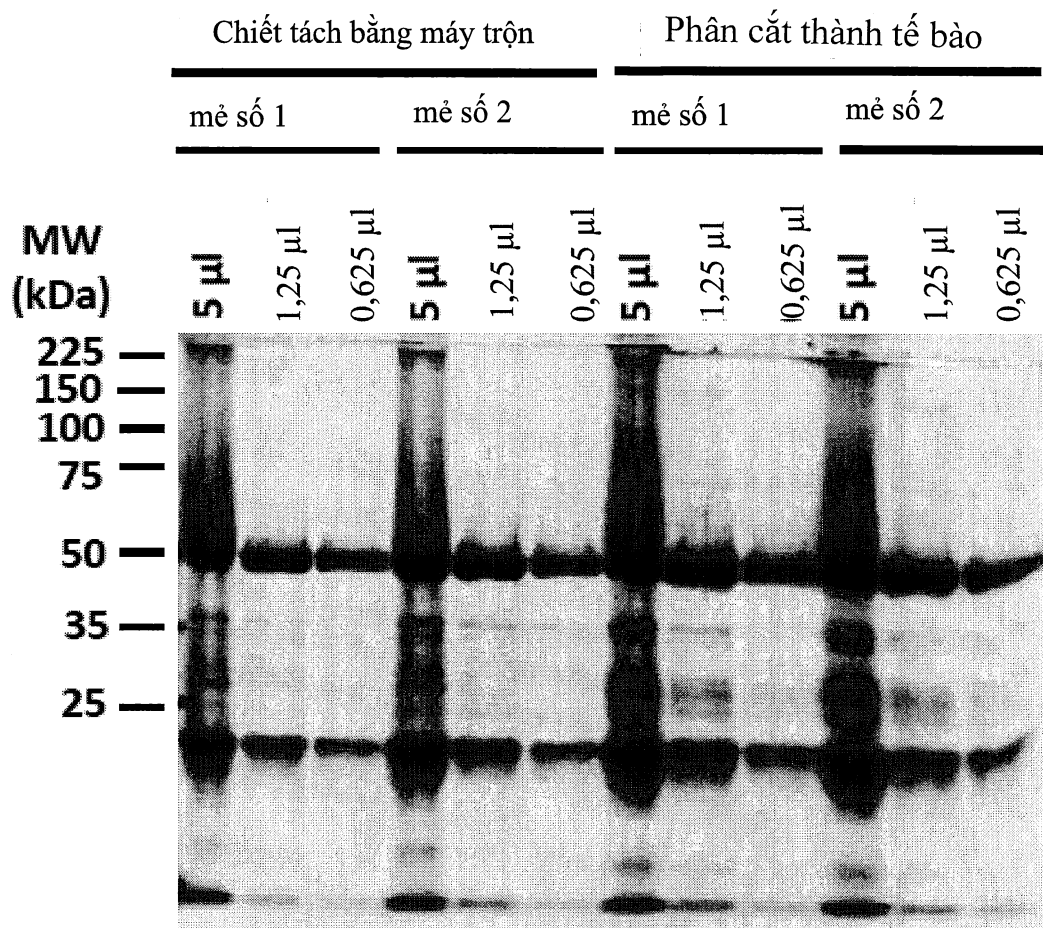
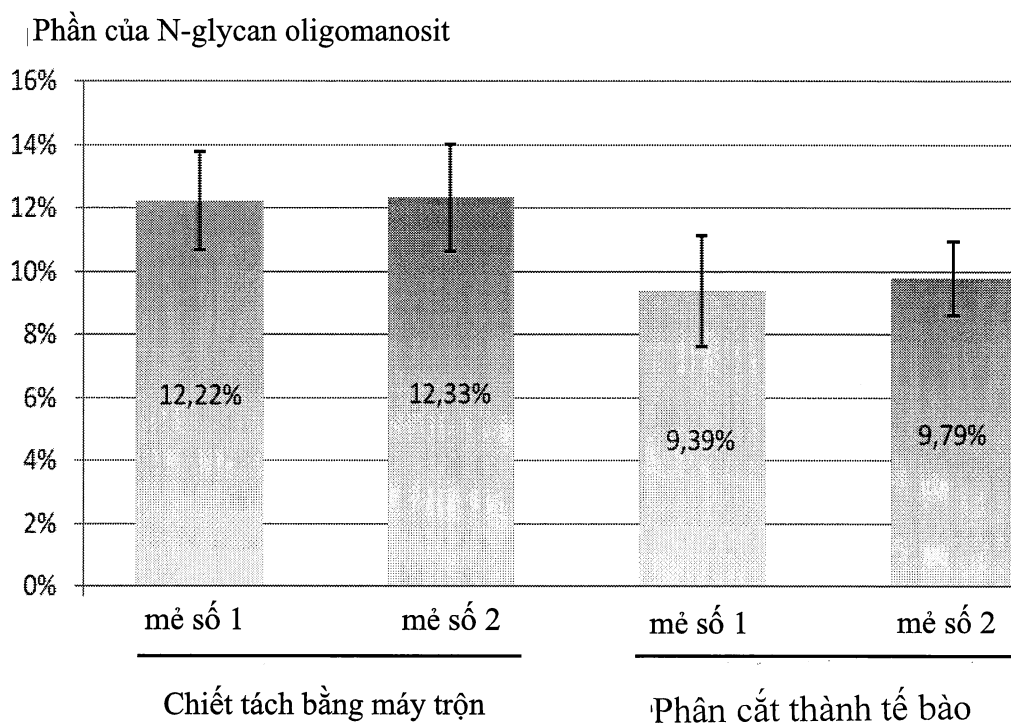


Fig. 12



Phân tích thống kê

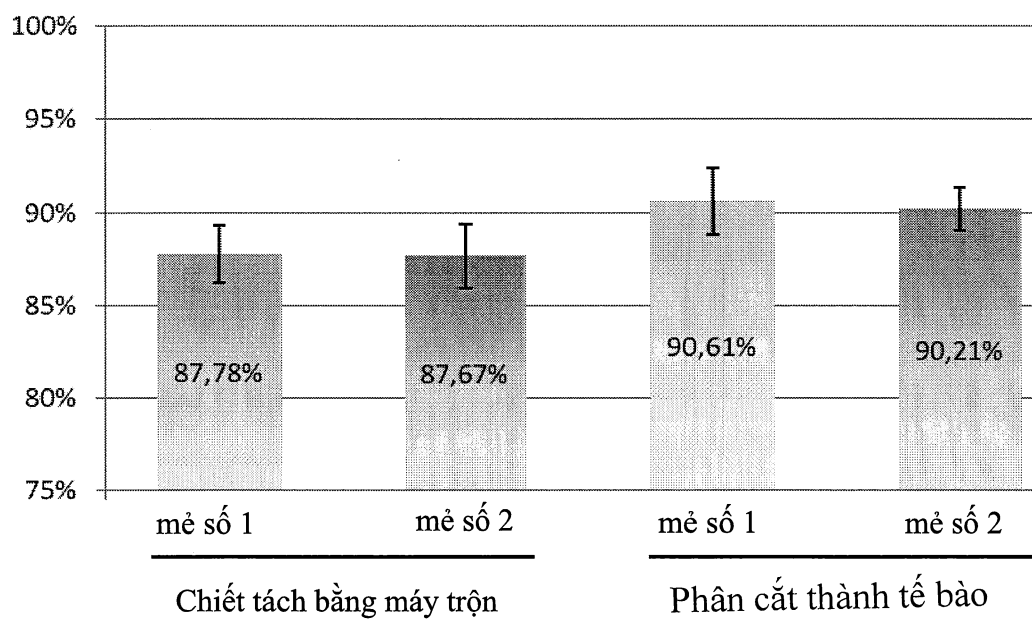
Giá trị p	Máy trộn, mẻ số 1	Phân cắt , mẻ số 1	Máy trộn, mẻ số 2
Phân cắt , mẻ số 1	$3,3.10^{-4}$ (***)		
Máy trộn, mẻ số 2	1 (giống nhau)	$1,9.10^{-4}$ (***)	
Phân cắt, mẻ số 2	$2,39.10^{-3}$ (**)	1 (giống nhau)	$1,41.10^{-3}$ (**)

** Sự khác nhau về phần của N-glycan oligomanosit là rất đáng kể (giá trị p nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,1)

*** Sự khác nhau về phần của N-glycan oligomanosit là khá đáng kể (giá trị p nằm trong khoảng từ 0 đến 0,01)

Fig. 13A

Phần của N-glycan phức



Phân tích thống kê

Giá trị p	Máy trộn, mẻ số 1	Phân cắt, mẻ số 1	Máy trộn, mẻ số 2
Phân cắt, mẻ số 1	$3,3 \cdot 10^{-4}$ (***)		
Máy trộn, mẻ số 2	1 (giống nhau)	$1,9 \cdot 10^{-4}$ (***)	
Phân cắt, mẻ số 2	$2,39 \cdot 10^{-3}$ (**)	1 (giống nhau)	$1,41 \cdot 10^{-3}$ (**)

** Sự khác nhau về phần của N-glycan oligomanosit là rất đáng kể (giá trị p nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,1)

*** Sự khác nhau về phần của N-glycan oligomanosit là khá đáng kể (giá trị p nằm trong khoảng từ 0 đến 0,01)

Fig. 13B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Medicago Inc.
 VEZINA, Louis-Philippe
 DARGIS, Michele
 COUTURE, Manon
 PAQUET, Dany
 D'AOUST, Marc-Andre

<120> PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PROTEIN CÓ NGUỒN GỐC THỰC VẬT

<130> G656-81HNPT

<150> 61/244,786

<151> 2009-09-22

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3067

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp 685

<400> 1

ttaattaaga attcgagctc caccgcggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct	60
gtcactttat tgagaagata gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg	120
ataaaggaaa ggccatcggt gaagatgcct ctgccgacag tgggtcccaa gatggacccc	180
caccacagag gagcatcggt gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg	240
attgatgtga tatctccact gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag	300
acccttcctc tatataagga agttcatttc atttggagag gtattaaaat cttaataggt	360
tttgataaaa gogaacgtgg ggaaaccga accaaacctt cttctaaact ctctctcatc	420
tctcttaaag caaacttctc tcttgctttt cttgcgtgag cgatcttcaa cgttgtcaga	480
tcgtgcttcg gcaccagtac aacgttttct ttcactgaag cgaaatcaaa gatctctttg	540
tggaacacgta gtgcggcgcc attaaataac gtgtacttgt cctattcttg tcggtgtggt	600
cttgggaaaa gaaagcttgc tggaggctgc tgttcagccc catacattac ttgttacgat	660
tctgctgact ttcggcgggt gcaatatctc tacttctgct tgacgaggta ttgttgctg	720
tacttctttc ttcttcttct tgctgattgg ttctataaga aatctagtat tttctttgaa	780
acagagtttt ccggtggttt tcgaacttgg agaaagattg ttaagcttct gtatattctg	840
cccaaatttg tcgggcccac ggagaaaata gtgcttcttc ttgcaatagt cagtcttggt	900
aaaagtgatc agatttgcat tggttaccat gcaaacaatt caacagagca ggttgacaca	960
atcatggaaa agaacgttac tggttacacat gcccaagaca tactggaaaa gacacacaac	1020

gggaagctct	gcgatctaga	tggagtgaag	cctctaattt	taagagattg	tagtgtagct	1080
ggatggctcc	tcgggaaccc	aatgtgtgac	gaattcatca	atgtaccgga	atggctttac	1140
atagtggaga	aggccaatcc	aaccaatgac	ctctgttacc	cagggagttt	caacgactat	1200
gaagaactga	aacacctatt	gagcagaata	aaccattttg	agaaaattca	aatcatcccc	1260
aaaagttctt	ggtccgatca	tgaagcctca	tcaggagtta	gctcagcatg	tcataacctg	1320
ggaagtccct	ccttttttag	aaatgtggta	tggcttatca	aaaagaacag	tacataccca	1380
acaataaaga	aaagctacaa	taataccaac	caagaggatc	ttttggtact	gtggggaatt	1440
caccatccta	atgatgcggc	agagcagaca	aggctatatc	aaaacccaac	cacctatatt	1500
tccattggga	catcaacact	aaaccagaga	ttggtaccaa	aatagctac	tagatccaaa	1560
gtaaacgggc	aaagtggaag	gatggagttc	ttctggacaa	ttttaaacc	taatgatgca	1620
atcaacttcg	agagtaatgg	aaatttcatt	gctccagaat	atgcatacaa	aattgtcaag	1680
aaaggggact	cagcaattat	gaaaagtga	ttggaatatg	gtaactgcaa	caccaagtgt	1740
caaactccaa	tgggggcat	aaactctagt	atgccattcc	acaacataca	ccctctcacc	1800
atcggggaat	gccccaaata	tgtgaaatca	aacagattag	tccttgcaac	agggtcaga	1860
aatagccctc	aaagagagag	cagaagaaaa	aagagaggac	tatttgagc	tatagcaggt	1920
tttatagagg	gaggatggca	gggaatggta	gatggttggt	atgggtacca	ccatagcaat	1980
gagcagggga	gtgggtacgc	tgcagacaaa	gaatccactc	aaaaggcaat	agatggagtc	2040
accaataagg	tcaactcaat	cattgacaaa	atgaacactc	agtttgaggc	cgttggaagg	2100
gaatttaata	acttagaaag	gagaatagag	aatttaaaca	agaagatgga	agacgggttt	2160
ctagatgtct	ggacttataa	tgccgaactt	ctggttctca	tggaaaatga	gagaactcta	2220
gactttcatg	actcaaattg	taagaacctc	tacgacaagg	tccgactaca	gcttagggat	2280
aatgcaaagg	agctgggtaa	cggttggttc	gagttctatc	acaaatgtga	taatgaatgt	2340
atggaaagta	taagaaacgg	aacgtacaac	tatccgcagt	attcagaaga	agcaagatta	2400
aaaagagagg	aaataagtgg	ggtaaaattg	gaatcaatag	gaacttacca	aatactgtca	2460
atattattcaa	cagtggcgag	ttccctagca	ctggcaatca	tgatggctgg	tctatcttta	2520
tggatgtgct	ccaatggatc	gttacaatgc	agaatttgca	tttaaaggcc	tattttcttt	2580
agtttgaatt	tactgttatt	cggtgtgcat	ttctatgttt	ggtgagcggg	tttctgtgct	2640
cagagtgtgt	ttattttatg	taatttaatt	tctttgtgag	ctcctgttta	gcaggctcgc	2700
ccttcagcaa	ggacacaaaa	agattttaat	tttattaaaa	aaaaaaaaaa	aaaagaccgg	2760
gaattcgata	tcaagcttat	cgacctgcag	atcgttcaaa	catttggtgca	taaagtttct	2820
taagattgaa	tcctgttgcc	ggtcttgcca	tgattatcat	ataatttctg	ttgaattacg	2880
ttaagcatgt	aataattaac	atgtaatgca	tgacgttatt	tatgagatgg	gtttttatga	2940

ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaact 3000
 aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tggtactaga ttctagagtc tcaagcttcg 3060
 gcgcgcc 3067

<210> 2
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Amino axit tổng hợp được mã hóa bởi Seq Id No: 1

<400> 2

Met	Glu	Lys	Ile	Val	Leu	Leu	Leu	Ala	Ile	Val	Ser	Leu	Val	Lys	Ser	1	5	10	15
Asp	Gln	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr	His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Glu	Gln	Val	20	25	30	
Asp	Thr	Ile	Met	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Val	Thr	His	Ala	Gln	Asp	Ile	35	40	45	
Leu	Glu	Lys	Thr	His	Asn	Gly	Lys	Leu	Cys	Asp	Leu	Asp	Gly	Val	Lys	50	55	60	
Pro	Leu	Ile	Leu	Arg	Asp	Cys	Ser	Val	Ala	Gly	Trp	Leu	Leu	Gly	Asn	65	70	75	80
Pro	Met	Cys	Asp	Glu	Phe	Ile	Asn	Val	Pro	Glu	Trp	Ser	Tyr	Ile	Val	85	90	95	
Glu	Lys	Ala	Asn	Pro	Thr	Asn	Asp	Leu	Cys	Tyr	Pro	Gly	Ser	Phe	Asn	100	105	110	
Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Leu	Ser	Arg	Ile	Asn	His	Phe	Glu	115	120	125	
Lys	Ile	Gln	Ile	Ile	Pro	Lys	Ser	Ser	Trp	Ser	Asp	His	Glu	Ala	Ser	130	135	140	
Ser	Gly	Val	Ser	Ser	Ala	Cys	Pro	Tyr	Leu	Gly	Ser	Pro	Ser	Phe	Phe	145	150	155	160
Arg	Asn	Val	Val	Trp	Leu	Ile	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Tyr	Pro	Thr	Ile	165	170	175	
Lys	Lys	Ser	Tyr	Asn	Asn	Thr	Asn	Gln	Glu	Asp	Leu	Leu	Val	Leu	Trp	180	185	190	
Gly	Ile	His	His	Pro	Asn	Asp	Ala	Ala	Glu	Gln	Thr	Arg	Leu	Tyr	Gln	195	200	205	
Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ile	Ser	Ile	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Arg	210	215	220	
Leu	Val	Pro	Lys	Ile	Ala	Thr	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Gly	225	230	235	240
Arg	Met	Glu	Phe	Phe	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	Asp	Ala	Ile	Asn	245	250	255	

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285
 Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300
 Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320
 Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335
 Pro Gln Arg Glu Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 340 345 350
 Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365
 Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380
 Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400
 Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415
 Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 420 425 430
 Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445
 Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 450 455 460
 Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 485 490 495
 Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
 500 505 510
 Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
 515 520 525
 Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
 530 535 540
 Leu Ala Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
 545 550 555 560
 Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>		
<223>	Oligonucleotit tổng hợp pBinPlus.2613c	
<400>	3	
	aggaagggaa gaaagcgaaa ggag	24
<210>	4	
<211>	56	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Oligonucleotit tổng hợp Mut-ATG115.r	
<400>	4	
	gtgccgaagc acgatctgac aacgttgaag atcgctcacg caagaaagac aagaga	56
<210>	5	
<211>	52	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Oligonucleotit tổng hợp Mut-ATG161.c	
<400>	5	
	gttgctcatg cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt tcaactgaagc ga	52
<210>	6	
<211>	25	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Oligonucleotit tổng hợp LC-C5-1.110r	
<400>	6	
	tctcctggag tcacagacag ggtgg	25
<210>	7	
<211>	39	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Oligonucleotit tổng hợp ApaI-H5 (A-Indo).1c	
<400>	7	
	tgtcgggccc atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaat	39
<210>	8	
<211>	37	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Oligonucleotit tổng hợp H5 (A-Indo)-StuI.1707r	
<400>	8	
	aaataggcct ttaaagcaa attctgcatt gtaacga	37
<210>	9	
<211>	3111	

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc oligonucleotit tổng hợp 660

<400> 9

```

agaggtaccc cgggctggta tatttatatg ttgtcaaata actcaaaaac cataaaagtt      60

taagttagca agtgtgtaca tttttacttg acaaaaaata ttcacctact actgtttataa      120

atcattatta aacattagag taaagaaata tggatgataa gaacaagagt agtgatattt      180

tgacaacaat tttgttgcaa catttgagaa aattttgttg ttctctcttt tcattgggtca      240

aaaacaatag agagagaaaa aggaagaggg agaataaaaa cataatgtga gtatgagaga      300

gaaagttgta caaaagttgt accaaaatag ttgtacaaat atcattgagg aatttgacaa      360

aagctacaca aataaggggt aattgctgta aataaataag gatgacgcat tagagagatg      420

taccattaga gaatttttgg caagtcatta aaaagaaaga ataaattatt tttaaaatta      480

aaagttgagt catttgatta aacatgtgat tatttaatga attgatgaaa gagttggatt      540

aaagttgtat tagtaattag aatttggtgt caaatttaat ttgacatttg atcttttctt      600

atatattgcc ccatagagtc agttaactca tttttatatt tcatagatca aataagagaa      660

ataacggtat attaatccct ccaaaaaaaaa aaaacggtat atttactaaa aaatctaagc      720

cacgtaggag gataacagga tcccgcagg aggataacat ccaatccaac caatcacaac      780

aatcctgatg agataacca ctttaagccc acgcatctgt ggcacatcta cattatctaa      840

atcacacatt cttccacaca tctgagccac acaaaaacca atccacatct ttatcaccca      900

ttctataaaa aatcacactt tgtgagtcta cactttgatt cccttcaaac acatacaaag      960

agaagagact aattaattaa ttaatcatct tgagagaaaa tggagaaaat agtgcttctt      1020

cttgcaatag tcagtcttgt taaaagtgat cagatttgca ttggttacca tgcaacaat      1080

tcaacagagc aggttgacac aatcatggaa aagaacgtta ctgttacaca tgoccaaagac      1140

atactggaaa agacacacaa cgggaagctc tgcgatctag atggagtgaa gcctctaatt      1200

ttaagagatt gtagtgtagc tggatggctc ctcggaacc caatgtgtga cgaattcatc      1260

aatgtaccgg aatggtctta catagtggag aaggccaatc caaccaatga cctctgttac      1320

ccagggagtt tcaacgacta tgaagaactg aaacacctat tgagcagaat aaaccatttt      1380

gagaaaattc aaatcatccc caaaagttct tgggtccgac atgaagcctc atcaggagtt      1440

agctcagcat gtccatacct gggaagtccc tcctttttta gaaatgtggt atggcttatac      1500

aaaaagaaca gtacataccc aacaataaag aaaagctaca ataataccaa ccaagaggat      1560

cttttggtac tgtggggaat tcaccatcct aatgatgogg cagagcagac aaggctatat      1620

caaaacccaa ccacctatat ttccattggg acatcaacac taaaccagag attgggtacca      1680

aaaatagcta ctagatccaa agtaaacggg caaagtggaa ggatggagtt cttctggaca      1740

```

```

attttaaaac ctaatgatgc aatcaacttc gagagtaatg gaaatttcat tgctccagaa      1800
tatgcataca aaattgtcaa gaaaggggac tcagcaatta tgaaaagtga attggaatat      1860
ggtaactgca acaccaagtg tcaaactcca atggggggcg taaactctag tatgccattc      1920
cacaacatac accctctcac catcggggaa tgccccaaat atgtgaaatc aaacagatta      1980
gtccttgcaa cagggctcag aaatagccct caaagagaga gcagaagaaa aaagagagga      2040
ctatttgagg ctatagcagg ttttatagag ggaggatggc agggaatggg agatggttgg      2100
tatgggtacc accatagcaa tgagcagggg agtgggtacg ctgcagacaa agaatccact      2160
caaaaggcaa tagatggagt caccaataag gtcaactcaa tcattgacaa aatgaacact      2220
cagtttgagg ccgttggaag ggaatttaaat aacttagaaa ggagaataga gaatttaaac      2280
aagaagatgg aagacggggt tctagatgtc tggacttata atgccgaact tctggttctc      2340
atggaaaatg agagaactct agactttcat gactcaaatg ttaagaacct ctacgacaag      2400
gtccgactac agcttaggga taatgcaaag gagctgggta acggttggtt cgagttctat      2460
cacaaatgtg ataatgaatg tatggaaagt ataagaaacg gaacgtacaa ctatccgcag      2520
tattcagaag aagcaagatt aaaaagagag gaaataagtg gggtaaaatt ggaatcaata      2580
ggaacttacc aaatactgtc aattttattca acagtggcga gttccctagc actggcaatc      2640
atgatggctg gtctatcttt atggatgtgc tccaatggat cgttacaatg cagaatttgc      2700
atttaagagc tctaagttaa aatgcttctt cgtctcctat ttataatatg gtttgttatt      2760
gttaattttg ttcttgtaga agagcttaat taatcgttgt tgttatgaaa tactatttgt      2820
atgagatgaa ctggtgtaat gtaattcatt tacataagtg gagtcagaat cagaatgttt      2880
cctccataac taactagaca tgaagacctg ccgcgtacaa ttgtcttata tttgaacaac      2940
taaaattgaa catcttttgc cacaacttta taagtgggta atatagctca aatatatggg      3000
caagttcaat agattaataa tggaaatatc agttatcgaa attcattaac aatcaactta      3060
acgttattaa ctactaattt tatatcatcc cctttgataa atgatagtac a              3111

```

<210> 10

<211> 26

<212> PRT

<213> Medicago sativa

<400> 10

```

Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Leu
1           5           10           15

```

```

Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Glu Glu
          20           25

```

<210> 11

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>		
<223>	Oligonucleotit tổng hợp Plasto-443c	
<400>	11	
	gtattagtaa ttagaatttg gtgtc	25
<210>	12	
<211>	34	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Oligonucleotit tổng hợp supP19-plasto.r	
<400>	12	
	ccttgtatag ctcgttccat tttctctcaa gatg	34
<210>	13	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Oligonucleotit tổng hợp supP19-1c	
<400>	13	
	atggaacgag ctatacaagg	20
<210>	14	
<211>	32	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Oligonucleotit tổng hợp SupP19-SacI.r	
<400>	14	
	agtcgagctc ttactcgctt tctttttcga ag	32
<210>	15	
<211>	1214	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn LC tổng hợp của C2B8	
<400>	15	
	cacttttgta gtctacactt tgattccctt caaacacata caaagagaag agactaatta	60
	attaattaat catcttgaga gaaaatggat tttcaggtgc agattatcag cttcctgcta	120
	atcagtgctt cagtcataat gtccagagga caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc	180
	ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca atgacttgca gggccagctc aagtgttaagt	240
	tacatccact ggttccagca gaagccagga tcctcccca aaccctggat ttatgccaca	300
	tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc ttcagtgga gtgggtctgg gacttcttac	360
	tctctcacia tcagcagagt ggaggctgaa gatgctgcca cttattactg ccagcagtg	420
	actagtaacc caccacggt cgaggggggg accaagctgg aaatcaaacg tacgggtggct	480

gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct 540
gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat 600
aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc 660
acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc 720
tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 780
ggagagtgtt gagacgtcgt taaaatgctt cttcgtctcc tatttataat atggtttgtt 840
attgttaatt ttgttcttgt agaagagctt aattaatcgt tgttgttatg aaatactatt 900
tgtatgagat gaactgggtg aatgtaattc atttacataa gtggagtcag aatcagaatg 960
tttctccat aactaactag acatgaagac ctgcgcgta caattgtctt atatttgaac 1020
aactaaaatt gaacatcttt tgccacaact ttataagtgg ttaatatagc tcaaatatat 1080
ggtcaagttc aatagattaa taatggaaat atcagttatc gaaattcatt aacaatcaac 1140
ttaacgttat taactactaa ttttatatca tccccttga taaatgatag tacaccaatt 1200
aggaaggaga attc 1214

<210> 16
<211> 1919
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn HC tổng hợp của C2B8

<400> 16
cactttgtga gtctacactt tgattccctt caaacacata caaagagaag agactaatta 60
attaattaat catcttgaga gaaaatgggt tggagcctca tcttgctctt ccttgctgct 120
gttgctacgc gtgtcctgtc ccaggtacaa ctgcagcagc ctggggctga gctgggtgaag 180
cctggggcct cagtgaagat gtctgcaag gcttctggct acacatttac cagttacaat 240
atgcactggg taaaacagac acctggctgg ggctggaat ggattggagc tatttatccc 300
ggaaatggtg atacttccta caatcagaag ttcaaaggca aggccacatt gactgcagac 360
aaatcctcca gcacagccta catgcagctc agcagcctga catctgagga ctctgcggtc 420
tattactgtg caagatcgac ttactacggc ggtgactggg acttcaatgt ctggggcgca 480
gggaccacgg tcaccgtctc tgcagctagc accaagggcc catcggctct cccctggca 540
ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctgg caaggactac 600
ttccccgaac cgggtgacggg gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc 660
ttcccggctg tctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc 720
tccagcagct tgggcacca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc 780
aaggtggaca agaaagttga gcccaaactc tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 840

ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac	900
accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtaggacgt gagccacgaa	960
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	1020
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	1080
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca	1140
gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc ctagggaacc acaagtgtac	1200
actcttcac catctaggga tgagcttact aagaaccaag tttctcttac ttgtcttgtg	1260
aagggatttt atccatctga catcgccgtg gaatgggaat ccaacggaca accagagaac	1320
aattacaaga ctactccacc agttcttgat tctgatggat ccttctttct ttattccaag	1380
cttactgttg ataagtccag atggcagcaa ggaaatgtgt tctcttgttc tgttatgcac	1440
gaagctcttc ataatcatta tactcaaaag tccctttctc tttctcctgg aaagtgagac	1500
gtcgtaaaaa tgcttcttcg tctcctattt ataatatggt ttgttattgt taattttgtt	1560
cttgtagaag agcttaatta atcgttgttg ttatgaaata ctatttgtat gagatgaact	1620
ggtgtaatgt aattcattta cataagtgga gtcagaatca gaatgtttcc tccataacta	1680
actagacatg aagacctgcc gcgtacaatt gtcttatatt tgaacaacta aaattgaaca	1740
tcttttgcca caactttata agtgggtaat atagctcaaa tatatggtca agttcaatag	1800
attaataatg gaaatatcag ttatcgaaat tcattaacaa tcaacttaac gttattaact	1860
actaatttta tatcatcccc tttgataaat gatagtacac caattaggaa ggagaattc	1919