



(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)



1-0027533

(51)⁷ C07K 14/705; A61K 38/00; A61K 38/19 (13) B

(21) 1-2016-04436

(22) 23/04/2015

(86) PCT/US2015/027270 23/04/2015

(87) WO2015/164588 29/10/2015

(30) 61/983,152 23/04/2014 US

(45) 25/02/2021 395

(43) 27/03/2017 348A

(73) 1. ABBVIE INC. (US)

One North Waukegan Road, North Chicago, Illinois 60064, United States of America

2. APOGENIX AG (DE)

Im Neuenheimer Feld 584, 69120 Heidelberg, Germany

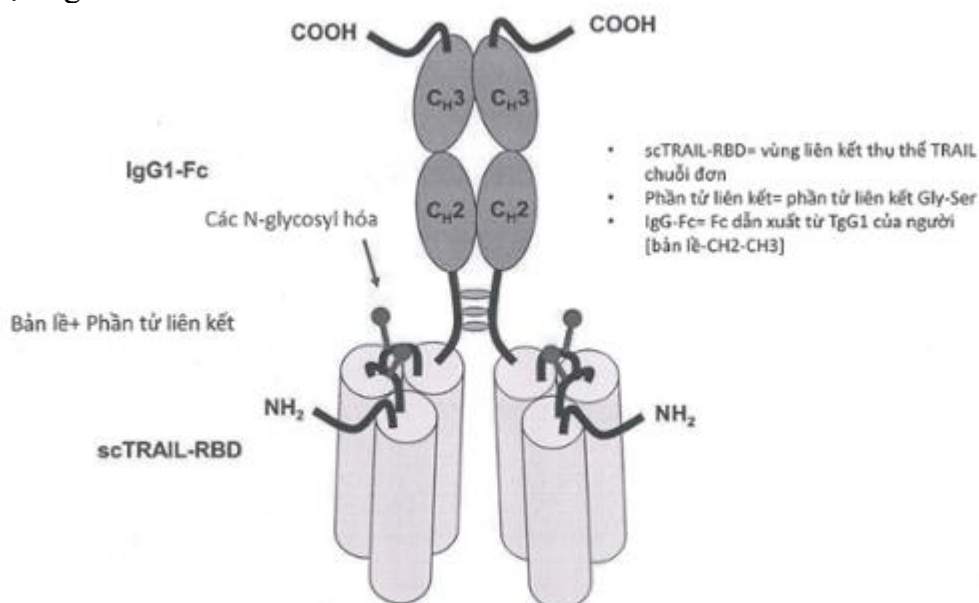
(72) HILL, Oliver (DE); GIEFFERS, Christian (DE); THIEMANN, Meinolf (DE);

BUCHANAN, Fritz, G (US); PHILLIPS, Darren, C. (GB); LAPPE, Susan, E. (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PROTEIN CHỦ VẬN THỤ THỂ TRAIL VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY

(57) Sáng chế đề xuất các protein chủ vận thụ thể TRAIL cụ thể, axit nucleic mã hóa các protein này. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa protein chủ vận thụ thể TRAIL để điều trị đối tượng mắc bệnh hoặc chứng rối loạn liên quan đến TRAIL. Các protein chủ vận thụ thể TRAIL được đề xuất chứa ba vùng TRAIL hòa tan và đoạn Fc. Các protein chủ vận thụ thể TRAIL về cơ bản là không kết tụ và thích hợp cho các ứng dụng điều trị, chẩn đoán và/hoặc nghiên cứu.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các protein là chất chủ vận thụ thể TRAIL riêng biệt bao gồm ba vùng TRAIL hòa tan và đoạn Fc, các phân tử axit nucleic mã hóa các protein là chất chủ vận thụ thể TRAIL, và sử dụng của chúng. Các protein chủ vận thụ thể TRAIL về cơ bản là không kết tụ và thích hợp cho các ứng dụng điều trị, chẩn đoán và/hoặc nghiên cứu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đã biết rằng sự trime hóa của các xytokin liên họ TNF (TNF Superfamily -TNFSF) là được yêu cầu cho việc liên kết và hoạt hóa hiệu lực thụ thể. Tuy nhiên, các phức trime của các xytokin liên họ TNF là khó được tạo từ các đơn vị monome tái tổ hợp.

WO 01/49866 và WO 02/09055 bộc lộ các protein dung hợp tái tổ hợp chứa xytokin TNF và thành phần multimer, cụ thể là protein từ họ protein C1q hoặc collectin. Tuy nhiên, nhược điểm của các protein dung hợp này là vùng trime hóa thường có khối lượng phân tử lớn và/hoặc sự trime hóa thường không hiệu quả.

Schneider và các đồng tác giả (J Exp Med 187 (1989), 1205-1213) mô tả rằng các trime của xytokin được ổn định bởi các môtip làm ổn định nằm ở đầu N. Trong CD95L, sự ổn định của trime vùng liên kết thụ thể được cho là gây ra bởi các vùng axit amin đầu N nằm ở gần màng tế bào chất.

Shiraishi và các đồng tác giả (Biochem Biophys Res Commun 322 (2004), 197-202) mô tả rằng vùng liên kết thụ thể của CD95L có thể được ổn định bởi các môtip (dạng khóa kéo leuxin) dây xoắn ốc α ở đầu N. Tuy nhiên, đã thấy rằng hướng của các chuỗi polypeptit với nhau, đó là, hướng song song hoặc đối song, có thể khó dự đoán được. Ngoài ra, con số tối ưu của các đoạn lặp bộ bảy trong môtip khóa kéo dây xoắn là khó xác định. Thêm vào đó, cấu trúc dây xoắn có xu hướng tạo thành các kết tụ đại phân tử sau khi có thay đổi về độ pH và/hoặc độ mạnh của ion.

WO 01/25277 đề cập đến các oligome polypeptit chuỗi đơn liên kết với vùng liên kết phối tử ngoại bào của thụ thể tế bào, trong đó polypeptit chứa ít nhất ba vùng liên kết thụ thể, trong đó ít nhất một vùng có khả năng liên kết với vùng liên kết phối tử của thụ thể tế bào và ít nhất một vùng có khả năng liên kết một cách hiệu quả với vùng liên

kết phối tử của thụ thể tế bào, nhờ đó các oligome polypeptit chuỗi đơn có khả năng liên kết với thụ thể, nhưng không có khả năng hoạt hóa thụ thể. Ví dụ, các monome được dẫn xuất từ các phối tử xytokin của họ TNF, cụ thể là từ TNF- α .

WO 2005/103077 bộc lộ polypeptit dung hợp chuỗi đơn chứa ít nhất ba monome của thành phần phối tử họ TNF và ít nhất hai phần tử liên kết peptit mà liên kết với các monome của các thành phần họ phối tử TNF với nhau. Tuy nhiên, các thử nghiệm gần đây đã chỉ ra rằng các polypeptit dung hợp chuỗi đơn - thể hiện sự kết tụ không mong muốn.

WO 2010/010051 bộc lộ polypeptit dung hợp chuỗi đơn chứa ba vùng xytokin họ TNF hòa tan và ít nhất hai phần tử liên kết peptit. Các polypeptit dung hợp được mô tả là gần như không kết tụ.

Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đây, bao gồm nghiên cứu của Papadopoulos và các đồng tác giả (Cancer Chemother Pharmacol, 2015, DOI 10.1007/s00280-015-2712-0), đã chứng minh rằng sự siêu kết tụ thụ thể TRAIL có thể có tính độc.

Do đó, có nhu cầu trong lĩnh vực chuyên ngành về các chất chủ vận thụ thể TRAIL mới thể hiện hoạt tính sinh học cao, độ ổn định cao, tính độc thấp, và có khả năng sản xuất tái tổ hợp hiệu quả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các protein thụ thể TRAIL đặc hiệu thể hiện sự giảm thủy phân protein thấp, thời gian bán hủy dài, và sự kết tụ thụ thể TRAIL thấp *in vivo* (đi kèm với tính độc).

Các protein chủ vận thụ thể TRAIL theo sáng chế thường bao gồm: (i) vùng xytokin TRAIL hòa tan thứ nhất; (ii) phần tử liên kết peptit thứ nhất; (iii) vùng TRAIL hòa tan thứ hai; (iv) phần tử liên kết peptit thứ hai; (v) vùng TRAIL hòa tan thứ ba; và (vi) đoạn FC của kháng thể.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit dung hợp chuỗi đơn chứa: (i) vùng TRAIL hòa tan thứ nhất, (ii) phần tử liên kết peptit thứ nhất, (iii) vùng TRAIL hòa tan thứ hai, (iv) phần tử liên kết peptit thứ hai, (v) vùng TRAIL hòa tan thứ ba, và (vi) đoạn FC của kháng thể. Theo một phương án, đoạn FC của kháng thể (vi) là nằm ở đầu N so với vùng TRAIL thứ nhất (i) và/hoặc đầu C so với vùng TRAIL thứ ba (v). Theo

phương án khác, đoạn FC của kháng thể nằm ở đầu C so với vùng TRAIL thứ ba (v). Theo một phương án, polypeptit về cơ bản là không kết tụ. Theo phương án khác, vùng TRAIL hòa tan thứ hai và/hoặc vùng TRAIL hòa tan thứ ba là vùng được rút ngắn ở đầu N tùy ý chứa các đột biến trình tự axit amin.

Theo một phương án, ít nhất một trong số các vùng TRAIL hòa tan, cụ thể là ít nhất một trong số các vùng TRAIL hòa tan (iii) và (v), là vùng TRAIL hòa tan với trình tự đầu N bắt đầu giữa axit amin Gln120 và Val122 của TRAIL ở người và trong đó Arg121 có thể được thay thế bằng axit amin trung tính, ví dụ, Ser hoặc Gly. Theo phương án khác, ít nhất một trong số các vùng TRAIL hòa tan, cụ thể là ít nhất một trong số các vùng TRAIL hòa tan (iii) và (v), là vùng TRAIL hòa tan với trình tự đầu N được chọn từ (a) Arg121 – Val122 – Ala123 và (b) (Gly/Ser)121 – Val122 – Ala123. Theo một phương án, vùng TRAIL hòa tan kết thúc với axit amin Gly281 của TRAIL của người và/hoặc tùy ý chứa đột biến ở các vị trí R130, G160, H168, R170, H177, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267 hoặc D269 hoặc ở hai hoặc nhiều vị trí này. Theo một phương án, vùng TRAIL hòa tan (i) bao gồm các axit amin Gln120 – Gly281 của TRAIL của người theo SEQ ID NO: 1 và các vùng TRAIL hòa tan (iii) và (v) bao gồm các axit amin Arg121 – Gly281 của TRAIL của người theo SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án, phần tử liên kết peptit thứ nhất và phần tử liên kết peptit thứ hai (ii) và (iv) độc lập có độ dài là 3-8 axit amin, cụ thể là độ dài là 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 axit amin, và tốt hơn là là các phần tử liên kết glyxin/serin, tùy ý chứa gốc asparagin mà có thể được glycosyl hóa. Theo một phương án, phần tử liên kết peptit thứ nhất và phần tử liên kết peptit thứ hai (ii) và (iv) bao gồm trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 2. Theo phương án khác, polypeptit tùy ý chứa vùng peptit tín hiệu đầu N, ví dụ, của SEQ ID NO: 12, mà có thể chứa vị trí phân cắt bằng proteaza, và/hoặc tùy ý chứa phần tử đầu C, phần tử này có thể chứa và/hoặc kết nối với vùng nhận diện/tinh sạch, ví dụ, Strep-tag theo SEQ ID NO: 13.

Theo một phương án, đoạn FC của kháng thể (vi) được dung hợp vào vùng TRAIL hòa tan (i) và/hoặc (v) thông qua phần tử liên kết bản lề, tốt hơn là của SEQ ID NO: 11. Theo phương án khác, đoạn FC của kháng thể (vi) chứa trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 10 hoặc 17. Theo một phương án, polypeptit chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14, 15 hoặc 18.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19, 20 hoặc 21.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, hoặc 30.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19. Theo một phương án, hai polypeptit được liên kết đồng hóa trị với nhau thông qua ba liên kết disulfit liên chuỗi được tạo giữa các gốc xystein 513, 519, và 522 của mỗi polypeptit.

Theo một phương án, một hoặc nhiều gốc asparagin ở vị trí 168 và 337 của (các) polypeptit là được N-glycosyl hóa. Theo phương án khác, gốc asparagin ở các vị trí 168 và 337 của (các) polypeptit là đều được N-glycosyl hóa.

Theo phương án khác, (các) polypeptit còn được biến đổi sau dịch mã. Theo phương án khác, sự biến đổi sau dịch mã bao gồm glutamin đầu N được biến đổi thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa protein chủ vận thụ thể TRAIL được bộc lộ trong bản mô tả này và một hoặc nhiều chất mang được dụng, chất pha loãng, tá được và/hoặc chất bổ trợ.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa protein chủ vận thụ thể TRAIL. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất vector biểu hiện chứa phân tử phân tử axit nucleic. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào chứa phân tử axit nucleic. Theo phương án khác, tế bào là tế bào nhân chuẩn. Theo phương án khác, tế bào là tế bào người. Theo phương án khác, tế bào là tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary -CHO). Theo các phương án khác, tế bào được chọn từ nhóm bao gồm tế bào CHO-DBX11, CHO-DG44, CHO-S, và CHO-K1. Theo các phương án khác, tế bào được chọn từ nhóm bao gồm Vero, BHK, HeLa, COS, MDCK, HEK-293, NIH-3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, NS0, CRL7030, HsS78Bst, PER.C6, SP2/0-Agl4, và tế bào lai.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị đối tượng mắc bệnh hoặc chứng rối loạn liên quan đến TRAIL, phương pháp bao gồm cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu của protein chủ vận thụ thể TRAIL. Theo một phương án, protein chủ

vận thụ thể TRAIL được dùng một mình. Theo phương án khác, protein chủ vận thụ thể TRAIL được dùng trước, đồng thời, hoặc sau khi dùng tác nhân thứ hai. Theo phương án khác, bệnh hoặc chứng rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm: khối u, bệnh nhiễm trùng, bệnh viêm, bệnh về trao đổi chất, chứng rối loạn tự miễn, bệnh suy thoái, bệnh liên quan đến sự chết tế bào theo chương trình, và thải loại mảnh ghép. Theo một phương án, khối u là khối u rắn. Theo một phương án, khối u là từ nhóm bao gồm ung thư bao gồm sacôm, ung thư thực quản, và ung thư dạ dày. Theo phương án khác, khối u là từ sacom Ewing hoặc sacom sợi. Theo phương án khác, khối u từ nhóm bệnh ung thư bao gồm canxinom phổi tế bào không nhỏ (Non-Small Cell Lung Carcinoma - NSCLC), ung thư tụy, ung thư trực tràng, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư đầu và cổ, và ung thư phổi tế bào nhỏ (Small Cell Lung Cancer -SCLC). Theo phương án khác, khối u là khối u bạch huyết. Theo một phương án, khối u là khối u máu. Theo phương án khác, khối u là từ u lympho không Hodgkin, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tạo lympho bào cấp tính (Acute Lymphoblastic Leukemia - ALL), bệnh bạch cầu cấp dòng tủy (Acute Myeloid Leukemia - AML), u lympho tế bào B, u lympho Burkitt, bệnh bạch cầu tủy bào mạn tính (Chronic Myelocytic Leukemia - CML), bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (Chronic Lymphocytic Leukemia - CLL), hoặc bệnh bạch cầu tế bào lông. Theo phương án khác, chứng rối loạn tự miễn là các bệnh thấp khớp, các bệnh viêm khớp, hoặc các bệnh thấp khớp và viêm khớp. Theo phương án khác, bệnh hoặc chứng rối loạn là viêm khớp dạng thấp. Theo phương án khác, bệnh thoái hóa là bệnh thoái hoá thần kinh. Theo phương án khác, bệnh thoái hoá thần kinh là đa xơ cứng.

Theo một phương án, tác nhân thứ hai là tác nhân hóa trị liệu, tác nhân xạ trị hoặc tác nhân sinh học. Theo một phương án, tác nhân thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm Duvelisib, Ibrutinib, Navitoclax, và Venetoclax. Theo phương án khác, tác nhân thứ hai là tác nhân gây chết tế bào theo chương trình. Theo một phương án, tác nhân thứ hai gây chết tế bào theo chương trình được chọn từ nhóm bao gồm Bortezomib, Azacitidine, Dasatinib, và Gefitinib. Theo phương án cụ thể, các dược phẩm được bọc lộ trong bản mô tả này được dùng cho bệnh nhân theo đường dùng trong tĩnh mạch hoặc dưới da. Theo các phương án khác, các dược phẩm được bọc lộ được dùng cho bệnh nhân theo đường miệng, ngoài ruột, trong cơ, trong khớp, trong phế quản, trong bụng, trong bao, trong sụn, trong khoang, intracelially, trong tiểu não, trong não thất, trong cơn đau quặn, trong cổ tử cung, trong dạ dày, trong gan, trong cơ tim, trong xương, trong chậu hông,

trong màng ngoài tim, trong màng bụng, trong màng phổi, trong tuyến tiền liệt, trong phổi, trong trực tràng, trong thận, trong võng mạc, trong xương sống, trong bao hoạt dịch, trong ngực, trong vòng đặt trong tử cung, trong bàng quang, âm đạo, trực tràng, má, dưới lưỡi, hoặc qua da.

Theo một phương án, protein chủ vận thụ thể TRAIL được dùng là liều bolus đơn. Theo phương án khác, protein chủ vận thụ thể TRAIL có thể được dùng qua vài liều phân nhỏ. Protein chủ vận thụ thể TRAIL có thể được dùng ở khoảng 0,1-100 mg/kg. Theo một phương án, protein chủ vận thụ thể TRAIL có thể được dùng với liều được chọn từ nhóm bao gồm: khoảng 0,1-0,5, 0,1-1, 0,1-10, 0,1-20, 0,1-50, 0,1-75, 1-10, 1-15, 1-7,5, 1,25-15, 1,25-7,5, 2,5-7,5, 2,5-15, 5-15, 5-7,5, 1-20, 1-50, 7-75, 1-100, 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-50, 5-75, 10-20, 10-50, 10-75 và 10-100 mg/kg. Theo các phương án khác, protein chủ vận thụ thể TRAIL có mặt trong dược phẩm với lượng khoảng 0,1-100 mg/ml. Theo một phương án, protein chủ vận thụ thể TRAIL có mặt trong dược phẩm với lượng được chọn từ nhóm bao gồm: khoảng 0,1-0,5, 0,1-1, 0,1-10, 0,1-20, 0,1-50, 0,1-75, 1-10, 1-20, 1-50, 1-75, 1-100, 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-50, 5-75, 10-20, 10-50, 10-75, hoặc 10-100 mg/ml. Theo các phương án khác, lượng hữu hiệu điều trị của protein chủ vận thụ thể TRAIL được dùng cho đối tượng. Theo phương án khác, lượng hữu hiệu phòng bệnh của protein chủ vận thụ thể TRAIL được dùng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. Cấu trúc vùng polypeptit dung hợp chuỗi đơn chứa ba vùng TRAIL. I., II., III. Các vùng TRAIL hòa tan.

Fig. 2. Sơ đồ biểu diễn cấu trúc chung của TRAIL.

■ ■ ■ màng tế bào, đầu N nằm trong tế bào,

1. Cấu trúc gấp β đối song của vùng liên kết với thụ thể (Receptor-Binding Domain -RBD),

2. Bề mặt chung của RBD và màng tế bào,

3. Điểm cắt bằng proteaza.

Fig. 3. Sơ đồ biểu diễn cấu trúc của trime TRAIL tự nhiên. Các cấu trúc trụ biểu diễn các RBD. Đầu N kết nối các RBD với màng tế bào.

Fig. 4. Sơ đồ biểu diễn cấu trúc của ba vùng hòa tan chứa vùng liên kết thụ thể của TRAIL. Các vùng TRAIL hòa tan I., II., III.

Fig. 5. Sự trimer hóa của các vùng hòa tan chứa RBD của TRAIL, khác biệt ở chỗ đầu N và đầu C của ba vùng hòa tan tạo thành bề mặt.

Fig. 6. Sơ đồ biểu diễn cấu trúc của TRAIL chuỗi đơn chứa toàn bộ hoặc một phần của vùng thân mình họa yêu cầu của các phân tử liên kết dài hơn để bù lại khoảng cách đối với đầu N của vùng hòa tan tiếp theo.

Fig. 7. Protein dung hợp scFv-TRAIL đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Fig. 8. Protein dung hợp Fc-TRAIL đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Fig. 9A. Polypeptit dung hợp chuỗi đơn chứa đoạn kháng thể Fab bổ sung.

Fig. 9B. Polypeptit dung hợp chuỗi đơn chứa đoạn kháng thể scFv bổ sung.

Fig. 10. Sự dime hóa của hai polypeptit dung hợp scFc được dung hợp ở đầu N thông qua các cầu nối disulfit.

Fig. 11. Sự dime hóa của hai polypeptit dung hợp scFc được dung hợp ở đầu C thông qua các cầu nối disulfit.

Fig. 12. Sự dime hóa của các polypeptit dung hợp chuỗi đơn thông qua phân tử liên kết.

Fig. 13. Polypeptit dung hợp chuỗi đơn chứa đoạn kháng thể Fab bổ sung còn được dung hợp với polypeptit dung hợp thứ hai hoặc với polypeptit dung hợp scFv.

Fig. 14. Sự dime hóa của hai polypeptit dung hợp scFab thông qua các cầu nối disulfit.

Fig. 15. Các polypeptit dung hợp scFc được dung hợp ở đầu N còn chứa đoạn kháng thể Fv và/hoặc Fab.

Fig. 16. Các polypeptit dung hợp scFc được dung hợp ở đầu C còn chứa đoạn kháng thể Fv và/hoặc Fab.

Fig. 17A. Protein chủ vận thụ thể TRAIL ví dụ như được thể hiện với vùng peptit tín hiệu đầu N được nêu trong SEQ ID NO: 14. Protein trưởng thành (mà không bao gồm vùng peptit tín hiệu đầu N) được nêu trong SEQ ID NO: 19.

Fig. 17B. Sơ đồ biểu diễn cấu trúc tổng thể và trình tự được chú giải của protein chủ vận thụ thể TRAIL ví dụ.

Fig. 18. Thiết lập thử nghiệm của ELISA để định lượng chất chủ vận thụ thể TRAIL chứa vùng FC.

Fig. 19. Protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 gây sự chết tế bào trong các dòng tế bào khối u ở người *in vitro*. Các tế bào SKM-1, Colo205 hoặc Jurkat được xử lý bằng cách tăng nồng độ của protein chủ vận thụ thể TRAIL trong 24 giờ và khả năng sống của tế bào được đánh giá.

Fig. 20(A-C). Protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 hiệp đồng với các tác nhân chống tạo u *in vitro*. Các tế bào SU-DHL-4 được nuôi trong lồng ấp với sự tăng nồng độ của protein chủ vận thụ thể TRAIL với sự có mặt hoặc vắng mặt của các nồng độ đã chỉ ra của venetoclax (Fig. 20A) hoặc navitoclax (Fig. 20B) trong 24 giờ. Theo cách khác, các tế bào NCI-H596 (Fig. 20C) được xử lý bằng cách tăng nồng độ của protein chủ vận thụ thể TRAIL với sự có mặt hoặc vắng mặt của các nồng độ đã chỉ ra của docetaxel (DTX) trong 72 giờ. Khả năng sống của tế bào được đánh giá và sự hiệp đồng được xác định bằng tổng Bliss.

Fig. 21. Hiệu quả của protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 đối với sự phát triển của khối u trong mô hình ghép khác loại caxinom trực tràng Colo205.

Fig. 22. Hiệu quả protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 đối với sự phát triển của khối u trong mô hình ghép khác loại bệnh bạch cầu cấp dòng tủy SKM-1.

Fig. 23. Hiệu quả của protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 đối với sự phát triển của khối u ở mô hình ghép khác loại tế bào phổi không nhỏ H460LM.

Fig. 24(A-G). Hiệu quả của protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 đối với sự phát triển của khối u ở các mô hình PDX. Hình thoi, protein chủ vận thụ thể TRAIL-được xử lý; Hình vuông, không được xử lý. Thể tích khối u được thể hiện cho (A) CTG-0069, (B) CTG-0167, (C) CTG-0293, (D) CTG-0785, (E) CTG-0714, (F) CTG-0136, và (G) CTG-0485.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, đã phát hiện ra rằng sự dung hợp vùng liên kết thụ thể TRAIL chuỗi đơn vào vùng Fc dẫn đến chất chủ vận thụ thể TRAIL hóa trị sáu có hoạt tính sinh học cao kết hợp với độ ổn định tốt. Do đó, polypeptit dung hợp chuỗi đơn chứa ít nhất ba vùng vùng TRAIL hòa tan được liên kết bởi hai phần tử liên kết peptit và đoạn FC của kháng thể phía đầu N và/hoặc đầu C, được đề xuất.

Tốt hơn là, polypeptit dung hợp chuỗi đơn là không kết tụ. Thuật ngữ "không kết tụ" đề cập đến hàm lượng monome của dạng bào chế $\geq 50\%$, tốt hơn là $\geq 70\%$ và tốt hơn nữa là $\geq 90\%$. Tỷ lệ hàm lượng monome đối với hàm lượng kết tụ có thể được xác định bằng cách xác định lượng phát sinh kết tụ sử dụng sắc ký loại kích thước (Size-Exclusion Chromatography -SEC). Sự ổn định liên quan đến sự kết tụ có thể được xác định bởi SEC sau các khoảng thời gian xác định, ví dụ từ ít đến vài ngày, đến hàng tuần và hàng tháng trong các điều kiện bảo quản khác nhau, ví dụ, ở 4°C hoặc 25°C. Đối với protein dung hợp, để được phân loại là gần như không kết tụ, ưu tiên là hàm lượng monome là như được xác định trên đây sau khoảng thời gian là vài ngày, ví dụ, 10 ngày, tốt hơn nữa là sau vài tuần, ví dụ, 2, 3 hoặc 4 tuần, và tốt nhất là sau vài tháng, ví dụ, 2 hoặc 3 tháng bảo quản ở 4°C, hoặc 25°C.

Polypeptit dung hợp chuỗi đơn có thể chứa các vùng bổ sung mà có thể nằm ở đầu N và/hoặc đầu C của nó. Các ví dụ về các vùng dung hợp bổ sung là, ví dụ, vùng peptit tín hiệu đầu N có thể chứa vị trí cắt bằng proteaza hoặc nhân tố đầu C mà có thể chứa và/hoặc kết nối với vùng nhận diện/tính sạch. Theo phương án ưu tiên, polypeptit dung hợp chứa Strep-tag ở đầu C của nó mà được dung hợp thông qua phần tử liên kết. Strep-tag ví dụ bao gồm phần tử liên kết serin ngắn được nêu trong SEQ ID NO: 13.

Protein chủ vận thụ thể TRAIL theo sáng chế chứa ba vùng hòa tan dẫn xuất từ TRAIL. Tốt hơn là, các vùng hòa tan này được dẫn xuất từ động vật có vú, cụ thể là TRAIL của người bao gồm các biến dị alen và/hoặc các dẫn xuất của nó. Các vùng hòa tan chứa phần ngoại bào của TRAIL bao gồm vùng liên kết thụ thể không có các vùng nằm ở màng. Giống như các protein khác của liên họ TNF, TRAIL được neo với màng thông qua phần đầu N của 15-30 axit amin, được gọi là vùng thân. Vùng thân góp phần vào việc trimer hóa và tạo ra khoảng cách nhất định đến màng tế bào. Tuy nhiên, vùng thân không phải là một phần của RBD.

Quan trọng là, RBD được đặc trưng bởi sự xác định vị trí cụ thể của các axit amin đầu N và đầu C của nó. Các axit amin này gần kề một cách trực tiếp và nằm ở trung tâm so với trục của trime. Các axit amin đầu N thứ nhất của RBD tạo thành dải beta đối song với các axit amin đầu C của RBD (các Fig. 2 và 3).

Do đó, dải beta đối song của RBD tạo thành giao diện với màng tế bào, mà được liên kết với và được neo trong màng tế bào thông qua các axit amin của vùng thân. Ưu tiên ở mức độ cao nếu các vùng TRAIL hòa tan của protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa vùng liên kết thụ thể của TRAIL thiếu bất kì axit amin nào ở vùng thân (Figs. 4 và 5). Nếu không thì, phần tử liên kết dài liên kết đầu C của một trong số các vùng hòa tan với đầu N của vùng hòa tan tiếp theo có thể được yêu cầu để bù chính cho vùng thân đầu N của vùng hòa tan tiếp theo (Fig. 6), điều này có thể dẫn đến kết quả là sự không ổn định và/hoặc sự tạo kết tụ.

Ưu điểm khác của các vùng hòa tan này là các axit amin đầu N và đầu C của RBD là không thể tiếp cận được đối với kháng thể kháng thuốc bất kỳ. Tốt hơn là, polypeptit dung hợp chuỗi đơn có khả năng tạo thành cấu trúc trime theo trật tự chứa ít nhất một điểm liên kết chức năng cho thụ thể TRAIL tương ứng.

Protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa ba vị trí liên kết thụ thể TRAIL chức năng, đó là các trình tự axit amin có khả năng tạo phức hợp với thụ thể TRAIL. Do đó, các vùng hòa tan có khả năng liên kết với thụ thể TRAIL tương ứng. Theo một phương án, ít nhất một trong số các vùng hòa tan có khả năng hoạt hóa thụ thể, nhờ đó hoạt tính gây chết theo chương trình và/hoặc tăng sinh có thể bị ảnh hưởng. Theo phương án khác, một hoặc nhiều vùng hòa tan được lựa chọn do không có khả năng hoạt hóa thụ thể.

Vùng TRAIL hòa tan có thể được dẫn xuất từ TRAIL của người như được nêu trong SEQ ID NO: 1. Tốt hơn là, các vùng TRAIL hòa tan được dẫn xuất từ TRAIL của người, cụ thể là bắt đầu từ các axit amin 120-122 và chứa cụ thể là các axit amin 120-281, 121-281 hoặc 122-281 của SEQ ID NO: 1. Một cách tùy ý, axit amin Arg121 của SEQ ID NO: 1 có thể được thay thế bởi axit amin không mang điện, ví dụ, Ser hoặc Gly.

Bảng 1: Trình tự protein TRAIL của người

SEQ ID NO	Trình tự
1	MAMMEVQGGPSLGQTCVLIVFTVLLQSLCVAVTYVYFTNELKQM QDKYSKSGIACFLKEDDSYWDPNDEESMNPCWQVKWQLRQLVRK MILRTSEETISTVQEKQQNISPLVRERGPQRVA AHITGTRGRSNTLSSP NSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYS QTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWS KDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFL VG

Như chỉ ra trên đây, các vùng TRAIL hòa tan có thể chứa các trình tự kiểu đại như trong SEQ ID NO: 1. Tuy nhiên, nên chú ý rằng có thể đưa các đột biến vào một hoặc nhiều vùng hòa tan này, ví dụ, các đột biến làm thay đổi (ví dụ, tăng hoặc giảm) các đặc tính liên kết của các vùng hòa tan. Theo một phương án, các vùng hòa tan có thể được chọn mà không thể liên kết với thụ thể xytokin tương ứng.

Theo phương án được ưu tiên khác của sáng chế, vùng TRAIL hòa tan (i) chứa thể đột biến của TRAIL hoặc vùng liên kết thụ thể của nó mà liên kết và/hoặc hoạt hóa thụ thể TRAIL -1 (TRAIL-Receptor 1 - TRAILR1) và/hoặc thụ thể TRAIL 2 (TRAIL-Receptor 2 -TRAILR2). Sự liên kết và/hoặc hoạt tính của thể đột biến có thể, ví dụ, được xác định bằng các thử nghiệm như được mô tả bởi Van Der Sloot và các đồng tác giả. (PNAS, 2006, 103:8634-8639), Kelley và các đồng tác giả (J. Biol. Chem., 2005, 280:2205-2215), hoặc MacFarlane và các đồng tác giả (Cancer Res., 2005, 65: 11265-11270).

Thể đột biến có thể được tạo bởi kỹ thuật bất kỳ và đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, ví dụ, các kỹ thuật được mô tả bởi Van Der Sloot và các đồng tác giả (PNAS, 2006, 103:8634-8639), Kelley và các đồng tác giả (J. Biol. Chem., 2005, 280:2205-2215), hoặc MacFarlane và các đồng tác giả (Cancer Res., 2005, 65: 11265-11270) và có thể chứa đột biến cấu trúc bất kỳ, ví dụ, thay thế, xóa, sao lại và/hoặc chèn vào của các axit amin. Phương án ưu tiên là sự tạo thành các thay thế. Sự thay thế có thể ảnh hưởng ít nhất một axit amin của TRAIL hoặc vùng liên kết thụ thể của nó như được mô tả trong bản mô tả này. Theo phương án ưu tiên, sự thay thế có thể ảnh hưởng ít nhất một trong số các axit amin của TRAIL, ví dụ, TRAIL của người (ví dụ, SEQ ID NO: 1).

Các thay thế được ưu tiên liên quan đến vấn đề này ảnh hưởng ít nhất một trong số các axit amin sau đây của TRAIL của người của SEQ ID NO: 1: R130, G160, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267, D269. Các thay thế axit amin được ưu tiên của TRAIL của người của SEQ ID NO:1 là ít nhất một trong số các thay thế sau đây: R130E, G160M, Y189A, Y189Q, R191K, Q193S, Q193R, E195R, N199V, N199R, K201R, Y213W, T214R, S215D, H264R, I266L, D267Q, D269H, D269R, hoặc D269K.

(Các) thay thế axit amin có thể ảnh hưởng đến sự liên kết và/hoặc hoạt tính của TRAIL, ví dụ, TRAIL của người, đối với hoặc trên TRAILR1 hoặc TRAILR2. Theo cách khác, (các) thay thế axit amin có thể ảnh hưởng đến sự liên kết và/hoặc hoạt tính của TRAIL, ví dụ, TRAIL của người, đến hoặc trên cả TRAILR1 và TRAILR2. Sự liên kết và/hoặc hoạt tính của TRAILR1 và/hoặc TRAILR2 có thể bị ảnh hưởng một cách tích cực, đó là, sự liên kết và/hoặc hoạt hóa thụ thể mạnh hơn, và chọn lọc hơn hoặc đặc hiệu hơn. Theo cách khác, sự liên kết và/hoặc hoạt tính của TRAILR1 và/hoặc TRAILR2 có thể bị ảnh hưởng một cách tiêu cực, *đó là*, sự liên kết và/hoặc hoạt hóa thụ thể yếu hơn, và kém chọn lọc hơn hoặc kém đặc hiệu hơn.

Các ví dụ về các thể đột biến của TRAIL với (các) thay thế axit amin theo sáng chế mà ảnh hưởng đến sự liên kết và/hoặc sự hoạt hóa của cả TRAILR1 và TRAILR2 có thể thấy, ví dụ, trong bảng 1 của MacFarlane và các đồng tác giả (cũng xem trên đây) và có thể chứa thể đột biến TRAIL ở người với hai thay thế axit amin sau đây của SEQ ID NO: 1 Y213W và S215D hoặc với sự thay thế một axit amin sau đây: Y189A.

Các ví dụ về các thể đột biến của TRAIL với (các) thay thế axit amin theo sáng chế mà ảnh hưởng đến liên kết và/hoặc hoạt hóa của TRAILR1 có thể thấy, ví dụ, trong bảng 1 của MacFarlane và các đồng tác giả (cũng xem trên đây) và có thể chứa thể đột biến TRAIL ở người với bốn thay thế axit amin sau đây của SEQ ID NO: 1 N 199V, K201R, Y213W và S215D hoặc với năm thay thế axit amin dưới đây: Q193S, N199V, K201R, Y213W và S215D, hoặc có thể thấy trong bảng 2 của Kelley và các đồng tác giả (cũng xem trên đây) và có thể chứa thể đột biến TRAIL ở người với sáu thay thế axit amin dưới đây: Y213W, S215D, Y189A, Q193S, N199V, và K201R, hoặc với Y213W, S215D, Y189A, Q193S, N199R, và K201R.

Các ví dụ về các thể đột biến của TRAIL với (các) thay thế axit amin theo sáng chế mà ảnh hưởng đến liên kết và/hoặc hoạt hóa của TRAILR2 có thể thấy, ví dụ, trong bảng 1 của MacFarlane và các đồng tác giả (cũng xem trên đây) hoặc trong bảng 2 của Kelley và các đồng tác giả (cũng xem trên đây) và có thể chứa thể đột biến TRAIL ở người với sáu thay thế axit amin sau đây của SEQ ID NO: 1: Y189Q, R191 K, Q193R, H264R, I266L, và D267Q, hoặc có thể thấy trong bảng 2 của Van Der Sloot và các đồng tác giả (cũng xem trên đây) và có thể chứa thể đột biến TRAIL ở người với một thay thế axit amin dưới đây: D269H, hoặc với hai thay thế axit amin dưới đây: D269H và E195R hoặc D269H và T214R.

Do đó, một phương án ưu tiên là protein chủ vận thụ thể TRAIL như được mô tả trong bản mô tả này trong đó ít nhất một trong số các vùng hòa tan chứa thể đột biến của TRAIL hoặc của vùng liên kết thụ thể của nó mà liên kết và/hoặc hoạt hóa TRAILR1 và/hoặc TRAILR2.

Các ví dụ khác về các thể đột biến của TRAIL, thể hiện sự kết tụ thụ thể gây ra bởi TRAIL giảm là H168 (S, T, Q), R170 (E, S, T, Q) và H177 (S, T).

Một phương án ưu tiên của protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa thể đột biến của TRAIL hoặc của vùng liên kết thụ thể như được mô tả trong bản mô tả này là protein chủ vận thụ thể TRAIL trong đó thành phần (i) chứa ít nhất một thay thế axit amin, cụ thể là như được chỉ ra dưới đây.

Sự thay thế axit amin như vậy ảnh hưởng đến ít nhất một trong số các vị trí axit amin sau đây của TRAIL của người (SEQ ID NO: 1): R130, G160, H168, R170, H177, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267, D269.

Sự thay thế axit amin như vậy là ít nhất một trong số các thay thế sau đây: R130E, G160M, H168 (S, T, Q), R170 (E, S, T, Q), H177 (SJ)1 Y189A, Y189Q, R191K, Q193S, Q193R, E195R, N199V, N199R, K201R, Y213W, T214R, S215D, H264R, I266L, D267Q, D269H, D269R, hoặc D269K.

Vùng chọn lọc TRAIL-R2 được ưu tiên chứa các thay thế axit amin Y189Q, R191K, Q193R, H264R, I266L và D267Q.

Vùng chọn lọc TRAIL-R1 được ưu tiên chứa các thay thế axit amin Y189A, Q193S, N199V, K201R, Y213W và S215D.

Phân tử dung hợp chuỗi đơn theo sáng chế chứa ba vùng TRAIL hòa tan, cụ thể là các thành phần (i), (iii) và (v). Sự ổn định của polypeptit dung hợp TRAIL chuỗi đơn chống lại sự kết tụ được tăng cường, nếu vùng TRAIL hòa tan thứ hai và/hoặc vùng TRAIL hòa tan thứ ba là vùng được rút ngắn phía đầu N, vùng này tùy ý chứa các đột biến trình tự axit amin. Do đó, tốt hơn là, cả vùng TRAIL hòa tan thứ hai và thứ ba là các vùng được rút ngắn phía đầu N tùy ý chứa các đột biến trình tự axit amin trong vùng đầu N, tốt hơn là trong năm axit amin đầu tiên của đầu N của vùng TRAIL hòa tan. Các đột biến này có thể chứa sự thay thế của thành phần mang điện tích, ví dụ, các axit amin axit hoặc bazơ, bởi các axit amin trung tính, cụ thể là serin hoặc glyxin.

Ngược lại, sự lựa chọn vùng TRAIL hòa tan thứ nhất là không phải do quan trọng. Ở đây, vùng hòa tan có trình tự đầu N chiều dài đầy đủ có thể được sử dụng. Tuy nhiên, nên chú ý rằng, vùng TRAIL hòa tan thứ nhất cũng có thể có trình tự được rút ngắn phía đầu N và tùy ý được tạo đột biến.

Theo phương án ưu tiên khác của sáng chế, các vùng TRAIL hòa tan (i), (iii) và (v) là các vùng TRAIL hòa tan của người. Vùng TRAIL hòa tan thứ nhất (i) có thể được chọn từ các trình tự tự nhiên, được làm ngắn và/hoặc được đột biến. Do đó, vùng TRAIL hòa tan thứ nhất (i) có trình tự đầu N, trình tự này có thể bắt đầu giữa axit amin GIu116 và Val122 của TRAIL của người, và trong đó Arg121 có thể được thay thế bằng axit amin trung tính, ví dụ, by Ser hoặc Gly. Các vùng TRAIL hòa tan thứ hai và thứ ba (iii) và (v) có trình tự đầu N được rút ngắn, trình tự này tốt hơn là bắt đầu giữa axit amin Gln120 và Val122 của TRAIL của người và trong đó Arg121 có thể được thay thế bởi axit amin khác, ví dụ, Ser hoặc Gly.

Tốt hơn là, trình tự đầu N của các vùng TRAIL hòa tan (iii) và (v) được chọn từ:

(a) Arg121 - Val122 - Ala123 và

(b) (Gly/Ser) 121.

Vùng TRAIL hòa tan tốt hơn là kết thúc với axit amin Gly281 của TRAIL của người. Theo các phương án cụ thể, vùng TRAIL có thể chứa các đột biến bên trong như được mô tả trên đây.

Các thành phần (ii) và (iv) của protein chủ vận thụ thể TRAIL là các phân tử liên kết peptit nằm giữa các thành phần (i) và (iii) hoặc (iii) và (v), một cách tương ứng. Các

phần tử liên kết linh hoạt có chiều dài gồm 3-8 axit amin, cụ thể là chiều dài gồm 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 axit amin. Các phần tử liên kết tốt hơn là các phần tử liên kết glyxin/serin, đó là, các phần tử liên kết peptit về cơ bản chứa các axit amin glyxin và serin. Trong trường hợp trong đó vùng xytokin hòa tan kết thúc với S hoặc G (đầu C), ví dụ, TRAIL của người, phần tử liên kết bắt đầu sau S hoặc G. Trong trường hợp trong đó vùng xytokin hòa tan bắt đầu với S hoặc G (đầu N), phần tử liên kết kết thúc trước S hoặc G này.

Nên chú ý rằng phần tử liên kết (ii) và phần tử liên kết (iv) không cần phải có cùng chiều dài. Nhằm giảm tính sinh miễn dịch tiềm năng, các phần tử liên kết ngắn hơn có thể được ưu tiên để sử dụng. Ngoài ra, đã thấy rằng các phần tử liên kết ngắn hơn dẫn đến các phân tử chuỗi đơn với xu hướng tạo kết tụ giảm. Xét vì các phần tử liên kết mà về cơ bản dài hơn các phần tử được bộc lộ ở đây có thể thể hiện các đặc tính kết tụ không mong muốn.

Nếu muốn, phần tử liên kết có thể chứa gốc asparagin mà có thể tạo thành vị trí glycosyl hóa Asn-Xaa-Ser. Theo các phương án cụ thể, một trong số các phần tử liên kết, ví dụ, phần tử liên kết (ii) hoặc phần tử liên kết (iv) chứa vị trí glycosyl hóa. Theo các phương án khác, các phần tử liên kết (iv) chứa các vị trí glycosyl hóa. Nhằm tăng tính tan của các protein sc TRAIL và/hoặc nhằm giảm tính sinh miễn dịch tiềm năng, có thể ưu tiên rằng phần tử liên kết (ii) hoặc phần tử liên kết (iv) hoặc cả hai chứa vị trí glycosyl hóa.

Các trình tự của phần tử liên kết được ưu tiên được chọn từ GSGSGSGS (SEQ ID NO: 3), GSGSGNGS (SEQ ID NO: 2), GGSGSGSG (SEQ ID NO: 4), GGSGSG (SEQ ID NO: 5), GGSG (SEQ ID NO: 6), GGSGNGSG (SEQ ID NO: 7), GGNGSGSG (SEQ ID NO: 8), GGNGSG (SEQ ID NO: 9) và GSGS (SEQ ID NO: 23).

Theo phương án được ưu tiên nhất, các trình tự của phần tử liên kết là mỗi GSGSGNGS theo SEQ ID NO: 2. Các trình tự của phần tử liên kết ví dụ được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: Các trình tự của phân tử liên kết ví dụ

SEQ ID No	Trình tự
2	GSGSGNGS
3	GSGSGSGS
4	GGSGSGSG
5	GGSGSG
6	GGSG
7	GGSGNGSG
8	GGNGSGSG
9	GGNGSG
22	GSGSGS
23	GSGS
24	GSG

Protein chủ vận thụ thể TRAIL tùy ý chứa vùng đoạn FC của kháng thể có thể nằm ở đầu N đối với vùng TRAIL thứ nhất (i) và/hoặc đầu C so với vùng TRAIL thứ ba (v). Tốt hơn là, vùng đoạn FC của kháng thể chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo cách khác, vùng đoạn Fc chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 17. Các vùng Fc ví dụ được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3: Các vùng đoạn Fc ví dụ

SEQ ID NO	Trình tự
10	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
17	PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Tổng số vị trí glycosit và vị trí riêng của các carbohydrat trong ba chiều tác động đến tính ổn định *in vivo* của các protein chủ vận thụ thể TRAIL. Ngoài ra, sự nhận diện carbohydrat phụ thuộc vào mật độ cục bộ của các sacarit tận cùng, sự phân nhánh của cây carbohydrat và vị trí liên quan của cây carbohydrat.

Sự suy giảm của các carbohydrat vùng CH2 là cần thiết để tránh sự tạo liên kết chéo dựa trên thụ thể Fc *in vivo* và tính độc có thể có trên cơ sở sự siêu kết tụ thụ thể TRAIL. Ngoài ra, các carbohydrat bị giảm đi một phần làm giảm thời gian bán hủy *in vivo* của các protein chủ vận thụ thể TRAIL thông qua các cơ chế dẫn bởi lectin. Bằng cách làm giảm tổng số vị trí glycosyl hóa trên phân tử, hợp chất thu được ít có khả năng sử dụng bởi các cơ chế này, làm tăng thời gian bán hủy. Do đó, trong một phương án, số lượng glycosit trên các protein chủ vận thụ thể TRAIL theo sáng chế là giảm đi thông qua sự giảm của các glycosit CH2, dẫn đến các protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa các đột biến tương đương N297S (theo hệ thống đánh số của EU) tạo ra các vùng aglycosyl-CH2.

Các CH2-glycosit có mặt trên vùng bề mặt trong thường che chắn các vùng phụ khỏi các proteaza trong giai đoạn “chuyển đổi cấu hình Fc mở” trong đó các liên kết disulfit liên chuỗi-bản lề bị giảm đi và sự liên kết liên chuỗi đồng hóa trị bị gián đoạn. Điều này cho phép sự phân tách CH2 và sự tiếp cận của vùng bề mặt bên trong với các proteaza.

Các protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa đột biến tương đương N297S (theo hệ thống đánh số của EU) tạo ra aglycosyl-CH2 do đó dường như là kém ổn định hơn về mặt phân giải protein, khiến các cấu trúc là tương đương với sự glycosyl hóa CH2 kiểu đại. Điều này có thể tác động lên sự ổn định của hợp chất trong khi USP/DSP/bảo quản, trong đó các proteaza của tế bào chủ có mặt và có sự tiếp cận trong thời gian dài đối với cấu trúc. Do đó, trong các phương án cụ thể, chất chủ vận thụ thể TRAIL thiếu các CH2 glycosit, nhưng chứa các glycosit trong các trình tự của phân tử liên kết của mỗi chuỗi polypeptit (ví dụ, GSGSGNGS theo SEQ ID NO: 2). Trong các phương án làm ví dụ cụ thể, chất chủ vận thụ thể TRAIL chứa hai glycosit trên chuỗi polypeptit, cho tổng số là bốn glycosit.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, vùng đoạn FC của kháng thể được dung hợp thông qua phân tử liên kết bản lề. Phân tử liên kết bản lề có chiều dài là 10-30 axit amin,

cụ thể là chiều dài là 15-25 axit amin, ví dụ, 22 axit amin. Phần tử liên kết bản lề tốt hơn là chứa trình tự vùng bản lề của globulin miễn dịch, sau đây đề cập là “vùng bản lề Ig”. Thuật ngữ “vùng bản lề Ig” có nghĩa là polypeptit bất kỳ chứa trình tự axit amin mà có mức độ tương đồng hoặc tương tự về trình tự với một phần của trình tự vùng bản lề Ig có trong tự nhiên, trình tự này bao gồm các gốc xystein ở đó các liên kết disulfit liên kết hai chuỗi nặng của globulin miễn dịch.

Các dẫn xuất và dạng tương tự của vùng bản lề có thể thu được bằng các đột biến. Dẫn xuất hoặc dạng tương tự như được đề cập đến ở đây là polypeptit chứa an trình tự axit amin mà có độ đồng nhất hoặc tương tự về trình tự với trình tự có chiều dài đầy đủ của dạng đại (hoặc protein có trong tự nhiên) ngoại trừ việc nó có một hoặc nhiều sự khác biệt về trình tự axit amin có thể là do sự xóa, chèn và/hoặc thay thế. Tuy nhiên, theo sáng chế, thuật ngữ “phần tử liên kết bản lề” không bị giới hạn ở các phần tử liên kết chứa vùng bản lề Ig hoặc dẫn xuất của nó, nhưng phần tử liên kết bất kỳ đủ dài để cho phép các vùng được gắn bởi phần tử liên kết bản lề để có sự củng cố hoạt tính sinh học.

Số các phân tử với cấu hình Fc mở trong mỗi protein chủ vận thụ thể TRAIL riêng phụ thuộc vào số các liên kết disulfit liên chuỗi có mặt trong vùng bản lề. Do đó, theo một phương án, xystein thứ ba được đưa vào vùng bản lề của các protein chủ vận thụ thể TRAIL theo sáng chế nhằm cải thiện hiệu quả của việc suy giảm các CH2-glycosit.

Ngoài ra, các protein chủ vận thụ thể TRAIL theo sáng chế còn chứa các đột biến của lysin hoặc glixin vùng bản lề phía trên để làm giảm quá trình phân giải protein ở vị trí này.

Cụ thể là, phần tử liên kết bản lề được ưu tiên chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 11 (Bảng 4).

Protein chủ vận thụ thể TRAIL có thể bao gồm thêm vùng peptit tín hiệu đầu N, điều này cho phép sự xử lý, ví dụ, sự tiết ngoại bào, trong tế bào chủ thích hợp. Tốt hơn là, vùng peptit tín hiệu đầu N chứa vị trí cắt bằng proteaza, ví dụ, vị trí cắt bằng peptidaza tín hiệu và do đó, có thể được loại bỏ sau khi hoặc trong khi biểu hiện để thu được protein trưởng thành. Cụ thể là vùng peptit tín hiệu đầu N được ưu tiên chứa trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 12 (bảng 4).

Ngoài ra, protein chủ vận thụ thể TRAIL có thể chứa thêm phần tử đầu C, có chiều dài gồm ví dụ, 1-50, tốt hơn là 10-30 axit amin, có thể bao gồm hoặc kết nối với vùng

nhận diện/tinh sạch, ví dụ, vùng FLAG, vùng Strep-tag hoặc Strep-tag II và/hoặc vùng poly-His. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, polypeptit dung hợp chứa Strep-tag được dung hợp vào đầu C thông qua phần tử liên kết serin ngắn như được nêu trong SEQ ID NO: 13 (bảng 4).

Phần tử liên kết bản lề, vùng peptit tín hiệu đầu N, và phần tử liên kết serin ngắn ví dụ được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4: Các vùng và các phần tử liên kết ví dụ

SEQ ID NO	Trình tự
11	GPGSSSSSSSGSCDKTHTCPPC
12	METDTLLVFVLLVWVPAGNG
13	SSSSSSAWSHQPQFEK
25	GPGSSSSSSSGSCDKTHTCPPC

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên của sáng chế, polypeptit dung hợp chứa ba vùng TRAIL hòa tan được dung hợp bởi các phần tử liên kết peptit của SEQ ID NO: 2. Vùng TRAIL hòa tan thứ nhất (i) bao gồm các axit amin 120-281 của TRAIL của người theo SEQ ID NO: 1 và các vùng TRAIL hòa tan (iii) và (v) bao gồm các axit amin 121-281 của TRAIL của người theo SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, polypeptit dung hợp chứa vùng đoạn FC của kháng thể theo SEQ ID NO: 10 mà được dung hợp phía đầu C vào vùng TRAIL hòa tan (v) thông qua phần tử liên kết bản lề theo SEQ ID NO: 11. Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng polypeptit dung hợp cụ thể này có hoạt tính sinh học được cải thiện và cụ thể là ổn định. Trình tự axit amin theo phương án ví dụ của protein chủ vận thụ thể TRAIL theo sáng chế được nêu trong SEQ ID NO: 19.

Ngoài ra, polypeptit dung hợp có thể chứa vùng peptit tín hiệu đầu N ví dụ, theo SEQ ID NO: 12. Ví dụ cụ thể về protein chủ vận thụ thể TRAIL theo sáng chế được nêu trong SEQ ID NO: 14.

Theo phương án được ưu tiên khác, polypeptit dung hợp có thể chứa thêm Strep-tag đầu C mà được dung hợp vào polypeptit theo sáng chế thông qua phần tử liên kết serin ngắn như được nêu trong SEQ ID NO: 13. Theo khía cạnh này của sáng chế, đoạn Fc tốt hơn là bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 10 hoặc 17. Ngoài ra, đoạn Fc có thể bao gồm đoạn Fc ngắn hơn, ví dụ bao gồm các axit amin 1-217

của SEQ ID NO: 10. Ví dụ được đặc biệt ưu tiên về các polypeptit dung hợp chứa Strep-tag đầu C được nêu trong SEQ ID NOs: 15 và 18.

Các protein chủ vận thụ thể TRAIL ví dụ như được nêu trong SEQ ID NOs: 14, 15 và 18, mỗi protein chứa vùng peptit tín hiệu đầu N. Vùng peptit tín hiệu bao gồm các axit amin 1-20. Trong mỗi trường hợp, protein trưởng thành bắt đầu với axit amin 21. Các protein chủ vận thụ thể TRAIL trưởng thành làm ví dụ theo sáng chế được nêu trong SEQ ID NO: 19, 20, 21, 26, 27, 28, 29, và 30. Các protein chủ vận thụ thể TRAIL làm ví dụ được mô tả trên đây được thể hiện trong bảng 5.

Chất chủ vận thụ thể TRAIL như nêu trong SEQ ID NO: 19 có tổng số vị trí glycosyl hóa giảm (đột biến N297S trong vùng CH2 tạo ra vùng CH2 được aglycosyl hóa), số liên kết disulfit liên chuỗi tăng trong vùng bản lề, và sự đột biến của lysin thành glixin ở vùng bản lề phía trên. Các thay thế này tạo ra sự giảm khả năng phân hủy và siêu kết tụ của thụ thể TRAIL (cùng với tính độc đồng phát) trong khi làm tăng thời gian bán hủy của phân tử. Trong một số phương án, glutamin đầu N được cải biến thành pyroglutamat (Liu et al. 2011, J. Biol. Chem. 286:11211-11217).

Bảng 5: Các protein chủ vận thụ thể TRAIL làm ví dụ

SEQ ID NO	Trình tự
14	METDTLLVFVLLVWVPAGNGQRVA AHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGR KINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTK NDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELK ENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVA AHITGTRGRS NTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIY SQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDA EYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGN GSRVA AHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHL RNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDP ILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHE ASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY

	TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	METDTLLVFVLLVWVPAGNGQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSSAWSHPPQFEK
18	METDTLLVFVLLVWVPAGNGQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

19	QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLR NGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILL MKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEAS FFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWE SSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQM VQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIF VSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSP NSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYF RFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLY SIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLR NGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILL MKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEAS FFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWE SSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQM VQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIF VSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSP NSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYF RFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLY SIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWSHPQFEK

21	QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLR NGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILL MKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEAS FFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWE SSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQM VQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIF VSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSP NSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYF RFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLY SIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGS CDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
26	QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLR NGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILL MKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEAS FFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWE SSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQM VQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIF VSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSP NSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYF RFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLY SIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGSD KTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWSHPQFEK

27	QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLR NGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILL MKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEAS FFGAFLVGGSGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWE SSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQM VQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIF VSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKN EKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEE IKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQG GIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKT HTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWSHPQFEK
28	QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLR NGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILL MKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEAS FFGAFLVGGSGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESS RSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSV TNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNE KALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEI KENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQG GIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKT HTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWSHPQFEK

29	QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLR NGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILL MKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEAS FFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWE SSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQM VQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIF VSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKN EKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEE IKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQG GIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKT HTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLR NGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILL MKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEAS FFGAFLVGGSGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESS RSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSV TNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNE KALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEI KENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQG GIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKT HTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Khía cạnh khác theo sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa protein chủ vận thụ thể TRAIL như được mô tả trong bản mô tả này. Phân tử axit nucleic có thể là phân tử ADN, ví dụ, phân tử ADN, hoặc phân tử ARN sợi kép hoặc sợi đơn. Phân tử axit nucleic có thể mã hóa protein chủ vận thụ thể TRAIL hoặc tiền chất của nó, ví dụ,

pro- hoặc pre-proform của protein chủ vận thụ thể TRAIL mà có thể chứa trình tự tín hiệu hoặc các phần axit amin khác loại khác cho việc tiết hoặc tinh sạch, mà tốt hơn là nằm ở đầu N và/hoặc đầu C của protein chủ vận thụ thể TRAIL. Các phần axit amin khác loại có thể được liên kết với vùng thứ nhất và/hoặc vùng thứ hai thông qua vị trí cắt bằng proteaza, ví dụ, Factor X3, thrombin hoặc IgA vị trí cắt bằng proteaza. Ví dụ cụ thể về trình tự axit nucleic theo sáng chế được thể hiện trong bảng 6 là SEQ ID NO: 16. Phân tử axit nucleic này mã hóa polypeptit dung hợp của SEQ ID NO: 14.

Bảng 6: Trình tự axit nucleic của protein chủ vận thụ thể TRAIL làm ví dụ

SEQ ID NO	Trình tự
16	gatatcgggtaccgccaccatggaaaccgacaccctgctggtgttcgtgctgctgctgtgggtgccagccggcaatg gacagagagtggccgctcatatcaccggcaccggggcagatctaaccctgtccagcccaactccaagaac gagaaggccctgggccggaagatcaactcctgggagtcctccagatccggccactcctttgtccaactgcacct gagaaacggcgagctggtcatccacgagaagggttctactacatctactcccagacctacttcaggtttcaggaag agatcaaagagaacacaaagaacgacaagcagatggtgcagtatatctacaagtacacctctaccccgaccccat cctgctgatgaagtcggcccggaactcctgctggtccaaggatgctgagtacggcctgtacagcatctaccagggc ggcatcttcgagctgaaagagaacgaccggatcttcgtgtccgtgaccaacgagcacctgatcgacatggaccacg aggccagcttttcggcgcccttctcgtggcggtatccggaagcggaaacggcagtagagtgggtgcccacattac cggaaccagaggccggtccaacacctgagcagccctaacagcaaaaatgagaaagtctcgggcgcaagatca acagctgggaatctagcagaagcggccacagcttctgagcaatctgcatctgcggaaacggcgaactcgtgattcat gagaaggggtttattatatctatagccagacatacttcgattccaggaggaaatcaaggaaaacacaaaaatgat aaacagatggtccagtagattataagtagtaccagctaccctgacatctcctcatgaagtgtccgaaactcttg ttggagcaaggacgccgagtagtgactgtactctatctatcagggggggtatcttgaactcaagaaaacgatcgca tctttgtcagcgtaccaatgagcatctcattgatatggatcatgaagctagtttctcggggcattcctcgtgggaggc tccggctcggcaacggatctagagtcggcgacacatcacagggaccagaggcagaagcaataacctgtcctcc ccaaatagtaaaacgaaaaggcactcggccgcaaaattaattcctgggagagcagcagatccgggcacagtttct tgtctaattcctctgaggaatggggagctggtgattcacgaaaaaggattttactacattacagtcagacttacttc gtttcaggaagagattaaggaaaataccaaaaacgacaagcagatggtccagtagatctataataacaccttctatc ctgacccaattctgctcatgaagagtggcgcaacagctgctggtctaaagacgccgaatacgggctgtattccatt accaggggggaattttgagctgaaggaaaatgatcggtttttgtctctgtcacaacgaacacctatcgatattga tcacgaagcctctttttggcgcccttctggtcggaggccctggtcaggtccagctcctcttctggtcctcgcgac aagaccacacctgtccccctgtcctgccccgaactgctggcgggaccttccgtgttctgttcccccaagccc aaggacacctgatgatctccggacccccgaagtgcacctgctggtggtggtgatgtgtctcacgaggacctgaag tgaagtcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtactcct

	ccacctaccgggtggtgtctgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgaagg tgtccaacaaggccctgcctgcccccatcgaaaagaccatctccaaggccaaggccagccccgggaaccccg gtgtacacactgccccctagccgggaagagatgaccaagaaccagggtgcctgacctgcctggtaagggtttt acccctccgacattgccgtggaatgggagtgccaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgc tggactccgacggctcattcttctgtactccaagctgacagtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttc tcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagccccggcaaatgat agaagcttgatatac
--	--

Phân tử axit nucleic có thể được liên kết hoạt động với trình tự kiểm soát biểu hiện, ví dụ, trình tự kiểm soát biểu hiện cho phép biểu hiện phân tử axit nucleic trong tế bào chủ mong muốn. Phân tử axit nucleic có thể nằm trên vectơ, ví dụ, plasmid, thể thực khuẩn, vectơ virus, vectơ tích hợp nhiễm sắc thể, v.v.. Các ví dụ về các trình tự và các vectơ kiểm soát biểu hiện thích hợp được mô tả, ví dụ bởi Sambrook và các đồng tác giả (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, và Ausubel và các đồng tác giả (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons hoặc các ấn phẩm gần đây hơn của họ.

Các vectơ biểu hiện/các hệ tế bào chủ khác nhau có thể được sử dụng để biểu hiện các trình tự axit nucleic mã hóa các protein chủ vận thụ thể TRAIL theo sáng chế. Các tế bào chủ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào có nhân nguyên thủy như vi khuẩn, ví dụ, *E. coli*, các tế bào chủ có nhân điển hình như nấm men, tế bào côn trùng, tế bào thực vật hoặc tế bào động vật, tốt hơn là tế bào động vật có vú và, tốt hơn nữa là, tế bào người. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến sinh vật không phải là người được biến nạp hoặc chuyển nhiễm với phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây. Các sinh vật chuyển gen này có thể được tạo bằng các phương pháp chuyển gen đã biết bao gồm tái tổ hợp tương đồng.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề cập đến được phẩm hoặc chế phẩm để chẩn đoán chứa, làm thành phần hoạt tính, ít nhất một protein chủ vận thụ thể TRAIL, axit nucleic tương ứng mã hóa nó, hoặc tế bào biến nạp hoặc chuyển nhiễm, tất cả như được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “bệnh hoặc chứng rối loạn liên quan đến TRAIL” theo sáng chế là bệnh hoặc chứng rối loạn bất kỳ có thể được cải thiện bằng cách thêm chất chủ vận thụ thể TRAIL. Ít nhất một protein chủ vận thụ thể TRAIL, axit nucleic tương ứng mã hóa nó,

hoặc tế bào được biến nạp hoặc chuyển nhiễm, tất cả như được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong liệu pháp này, ví dụ, trong việc phòng và/hoặc điều trị chứng rối loạn gây ra bởi, liên quan đến và/hoặc đi kèm với sự rối loạn chức năng của TRAIL, cụ thể là các chứng rối loạn tăng sinh, như khối u, ví dụ, khối u rắn hoặc u bạch huyết; bệnh nhiễm trùng; bệnh viêm; bệnh về trao đổi chất; chứng rối loạn tự miễn, ví dụ, bệnh thấp khớp và/hoặc bệnh viêm khớp; bệnh suy thoái, ví dụ, bệnh thoái hoá thần kinh như đa xơ cứng; bệnh liên quan đến sự chết tế bào theo chương trình hoặc thải loại mảnh ghép.

Thuật ngữ "sự rối loạn chức năng của TRAIL" như được sử dụng trong bản mô tả này được hiểu là chức năng hoặc biểu hiện của TRAIL bất kỳ mà khác với chức năng hoặc biểu hiện bình thường của TRAIL, ví dụ, sự biểu hiện quá mức của gen hoặc protein TRAIL, sự biểu hiện giảm hoặc không biểu hiện của gen hoặc protein TRAIL so với mức biểu hiện sinh lý bình thường của TRAIL, sự tăng hoạt động của TRAIL, sự giảm hoặc không hoạt động của TRAIL, sự tăng liên kết của TRAIL với phần tử liên kết bất kỳ, ví dụ, với thụ thể, cụ thể là thụ thể TRAIL hoặc phân tử xytokin khác, sự liên kết giảm hoặc không liên kết với phần tử liên kết bất kỳ, ví dụ, với thụ thể, cụ thể là thụ thể TRAIL hoặc phân tử xytokin khác, so với hoạt tính sinh lý hoặc liên kết bình thường của TRAIL.

Theo các phương án khác nhau, phương pháp được đề xuất để chẩn đoán và/hoặc điều trị cho đối tượng là người mắc chứng rối loạn mà có thể được chẩn đoán và/hoặc điều trị bằng cách hướng đích thụ thể TRAIL bao gồm cho đối tượng là người dùng protein chủ vận thụ thể TRAIL được bộc lộ trong bản mô tả này sao cho hiệu quả đối với hoạt tính của đích hoặc các đích ở người là chủ vận, một hoặc nhiều triệu chứng được làm thuyên giảm, và/hoặc việc xử lý là đạt được. Các protein chủ vận thụ thể TRAIL được đề xuất ở đây có thể được sử dụng để chẩn đoán và/hoặc điều trị cho người mắc bệnh ung thư từ nguyên phát đến di căn, bao gồm các canxinom vú, đại tràng, trực tràng, phổi (ví dụ, ung thư phổi tế bào nhỏ (Small Cell Lung Cancer -SCLC) và ung thư phổi tế bào không nhỏ (Non- Small Cell Lung Cancer -NSCLC), miệng hầu, hạ hầu, thực quản, dạ dày, tụy, gan, túi mật và ống mật, ruột non, đường tiểu (bao gồm thận, bàng quang và biểu mô chuyển tiếp), đường sinh dục nữ (bao gồm các bệnh về cổ tử cung, dạ con, và buồng trứng cũng như ung biểu mô rau và bệnh nguyên bào nuôi do thai nghén), đường sinh dục nam (bao gồm khối u tuyến tiền liệt, túi tinh, tinh hoàn và

tế bào mầm), các tuyến nội tiết (bao gồm tuyến giáp, tuyến thượng thận, và tuyến yên), và da, cũng như các u mạch, u hắc tố ác tính, các sacom (bao gồm các sacom từ xương và mô mềm cũng như sacom Kaposi), khối u não, thần kinh, mắt, và màng não (bao gồm u não tế bào hình sao, u thần kinh đệm, u nguyên bào đệm, u nguyên bào võng mạc, u thần kinh, u nguyên bào thần kinh, u bao sợi thần kinh, và u màng não), khối u từ ác tính tế bào sinh máu, bệnh bạch cầu cấp tính, bệnh bạch cầu tạo lympho bào cấp tính, bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, u lympho tế bào B, u lympho Burkitt, bệnh bạch cầu tủy bào mạn tính, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, bệnh bạch cầu tế bào lông, u lympho Hodgkin và không Hodgkin, DLBCL, u lympho nang, ác tính tế bào sinh máu, sacom Kaposi, u lympho ác tính, mô bào huyết ác tính, u hắc sắc tố ác tính, u đa tủy, hội chứng cận thận sinh/tăng canxi huyết ác tính, hoặc khối u rắn.

Được phẩm chứa protein chủ vận thụ thể TRAIL bộc lộ trong bản mô tả này và chất mang được dụng được đề xuất. Trong một số phương án, được phẩm chứa ít nhất một tác nhân điều trị bổ sung để điều trị chứng rối loạn. Ví dụ, tác nhân bổ sung có thể là tác nhân điều trị, tác nhân hóa trị; tác nhân tạo hình ảnh, tác nhân độc với tế bào, chất ức chế tạo mạch, chất ức chế kinaza (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chất ức chế KDR và TIE-2), chất điều biến phân tử đồng kích thích hoặc chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch (bao gồm nhưng không giới hạn ở, kháng B7.1, kháng B7.2, kháng B7.3, kháng B7.4, kháng CD28, kháng B7RP1, CTLA4-Ig, kháng CTLA-4, kháng PD-1, kháng PD-L1, kháng PD-L2, kháng ICOS, kháng LAG-3, kháng Tim3, kháng VISTA, kháng HVEM, kháng BTLA, protein dung hợp LIGHT, kháng CD137, kháng CD137L, kháng OX40, kháng OX40L, kháng CD70, kháng CD27, kháng GAL9, kháng A2AR, kháng KIR, kháng IDO-1, kháng CD20), chất điều biến tế bào tua/ chất điều biến tế bào trình diện kháng nguyên (bao gồm nhưng không giới hạn ở, kháng thể kháng CD40, kháng CD40 L, kháng DC-SIGN, kháng Dectin-1, kháng CD301, kháng CD303, kháng CD123, kháng CD207, kháng DNCR1, kháng CD205, kháng DCIR, kháng CD206, kháng ILT7), chất điều biến cho thụ thể như Toll (bao gồm nhưng không giới hạn ở, kháng TLR-1, kháng TLR-2, kháng TLR-3, kháng TLR-4, kháng TLR-4, kháng TLR-5, kháng TLR-6, kháng TLR-7, kháng TLR-8, kháng TLR-9), phân tử phong bế phân tử kết dính (bao gồm nhưng không giới hạn ở, kháng thể kháng LFA-1, kháng thể chọn lọc kháng E/L, chất ức chế phân tử nhỏ), kháng thể kháng xytokin hoặc đoạn chức năng của nó (bao gồm nhưng không giới hạn ở, kháng thể kháng IL-18, kháng thể kháng TNF,

hoặc kháng thể kháng Il-6/kháng thể thụ thể xytokin), tính độc với tế bào NK hoặc tế bào T được định hướng đặc hiệu kép (bao gồm nhưng không giới hạn ở, BiTE®), liệu pháp dựa trên thụ thể khả năng tế bào T (Chimeric T Cell Receptor -CAR-T), liệu pháp dựa trên thụ thể tế bào T (T Cell Receptor -TCR), vaccin điều trị ung thư, methotrexate, cyclosporin, rapamycin, FK506, nhãn hoặc chất thông báo có thể phát hiện, chất đối kháng TNF, thuốc chống thấp khớp, thuốc làm giãn cơ, thuốc gây mê, thuốc kháng viêm không steroid (Non-Steroid Anti-Inflammatory Drug - NSAID), chất giảm đau, chất gây mê, chất làm dịu, chất gây tê cục bộ, chất phong bế thần kinh cơ, chất kháng khuẩn, chất chống vảy nến, corticosteriot, steroid đồng hóa, erythropoietin, chất tạo miễn dịch, globulin miễn dịch, chất làm suy giảm miễn dịch, hormon tăng trưởng, thuốc thay thế hormon, được phẩm xạ trị, chất chống trầm cảm, chất chống loạn thần kinh, chất kích thích, thuốc hen, chất chủ vận beta, steroid để hít, epinephrine hoặc chất tương tự, xytokin, hoặc chất đối kháng xytokin.

Theo một phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư hoặc phòng ngừa hoặc ức chế các di căn từ khối u được mô tả trong bản mô tả này, protein chủ vận thụ thể TRAIL có thể được sử dụng một mình hoặc phối hợp với một hoặc nhiều tác nhân bổ sung, ví dụ, tác nhân hóa trị, tác nhân xạ trị hoặc tác nhân sinh học. Theo một số phương án, tác nhân có thể bao gồm các chất sau: axit 13-cis-Retinoic; 2-CdA; 2-Chlorodeoxyadenosine; 5-Azacidine; 5-Fluorouracil; 5-FU; 6-Mercaptopurine; 6-MP; 6-TG; 6-Thioguanine; Abraxane; Accutane®; Actinomycin-D; Adriamycin®; Aducanumab; Afatinib®; Agrylin®; Ala-Cort®; Aldesleukin; Alemtuzumab; ALIMTA; Alitretinoin; Alkaban-AQ®; Alkeran®; axit All-transretinoic; Alpha Interferon; Altretamine; Amethopterin; Amifostine; Aminoglutethimide; Anagrelide; Anandron®; Anastrozole; Arabinosylcytosine; Ara-C Aranesp®; Aredia®; Arimidex®; Aromasin®; Arranon®; Arsenic Trioxide; Arzerra™; Asparaginase; ATRA; Avastin®; Azacitidine; BCG; BCNU; Bendamustine; Bevacizumab; Bexarotene; BEXXAR®; Bicalutamide; BiCNU; Blenoxane®; Bleomycin; Bortezomib; Busulfan; Busulfex®; C225; Calcium Leucovorin; Campath®; Camptosar®; Camptothecin-11; Capecitabine Carac™; Carboplatin; Carmustine; Carmustine Wafer; Casodex®; CC-5013; CCI-779; CCNU; CDDP; CeeNU; Cerubidine®; Cetuximab; Chlorambucil; Cisplatin; Citrovorum Factor; Cladribine; Cortisone; Cosmegen®; CPT-11; Cyclophosphamide; Cytadren®; Cytarabine; Cytarabine Liposomal; Cytosar-U®; Cytoxan®; Dacarbazine; Dacogen;

Dactinomycin; Darbepoetin Alfa; Dasatinib; Daunomycin; Daunorubicin; Daunorubicin Hydrochloride; Daunorubicin Liposomal; DaunoXome®; Decadron; Decitabine; Delta-Cortef®; Deltasone®; Denileukin; Diftitox; DepoCyt™; Dexamethasone; Dexamethasone Acetate; Dexamethasone Sodium Phosphate; Dexasone; Dexrazoxane; DHAD; DIC; Diodex; Docetaxel; Doxil®; Doxorubicin; Doxorubicin Liposomal; Droxia™; DTIC; DTIC-Dome®; Duralone®; Duvelisib; Efudex®; Eligard™; Ellence™; Eloxatin™; Elspar®; Emcyt®; Epirubicin; Epoetin Alfa; Erbitux; Erlotinib; Erwinia L-asparaginase; Estramustine; Ethyol Etopophos®; Etoposide; Etoposide Phosphate; Eulexin®; Everolimus; Evista®; Exemestane; Fareston®; Faslodex®; Femara®; Filgrastim; Floxuridine; Fludara®; Fludarabine; Fluoroplex®; Fluorouracil; Fluorouracil (cream); Fluoxymesterone; Flutamide; axit Folinic; FUDR®; Fulvestrant; Gefitinib; Gemcitabine; Gemtuzumab ozogamicin; Gemzar; Gleevec™; Gliadel® Wafer; GM-CSF; Goserelin; Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF); Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (G-MCSF); Halotestin®; Herceptin®; Hexadrol; Hexalen®; Hexamethylmelamine; HMM; Hycamtin®; Hydrea®; Hydrocort Acetate®; Hydrocortisone; Hydrocortisone Sodium Phosphate; Hydrocortisone Sodium Succinate; Hydrocortone Phosphate; Hydroxyurea; Ibrutinib; Ibritumomab; Ibritumomab Tiuxetan; Idamycin®; Idarubicin Ifex®; Interferon-alpha; Interferon-alpha-2b (PEG Conjugate); Ifosfamide; Interleukin-11 (IL-11); Interleukin-2 (IL-2); Imatinib mesylate; Imidazole Carboxamide; Intron A®; ipilimumab, Iressa®; Irinotecan; Isotretinoin; Ixabepilone; Ixempra™; KADCYCLA®; Kidrolase (t) Lanacort®; Lapatinib; L-asparaginase; LCR; Lenalidomide; Letrozole; Leucovorin; Leukeran; Leukine™; Leuprolide; Leurocristine; Leustatin™; Lirilumab; Liposomal Ara-C; Liquid Pred®; Lomustine; L-PAM; L-Sarcolysin; Lupron®; Lupron Depot®; Matulane®; Maxidex; Mechlorethamine; Mechlorethamine Hydrochloride; Medralone®; Medrol®; Megace®; Megestrol; Megestrol Acetate; các chất ức chế MEK; Melphalan; Mercaptopurine; Mesna; Mesnex™; Methotrexate; Methotrexate Sodium; Methylprednisolone; Meticorten®; Mitomycin; Mitomycin-C; Mitoxantrone M-Prednisol®; MTC; MTX; Mustargen®; Mustine; Mutamycin®; Myleran®; Mylocel™; Mylotarg®; Navitoclax; Navelbine®; Nelarabine; Neosar®; Neulasta™; Neumega®; Neupogen®; Nexavar®; Nilandron®; Nilotinib; Nilutamide; Nipent®; Nitrogen Mustard Novaldex®; Nivolumab; Novantrone®; Nplate; Octreotide;

Octreotide acetate; Ofatumumab; Oncospar®; Oncovin®; Ontak®; Onxal™; Oprelvekin; Orapred®; Orasone®; Oxaliplatin; Paclitaxel; Paclitaxel Protein-bound; Pamidronate; Panitumumab; Panretin®; Paraplatin®; Pazopanib; Pediapred®; PEG Interferon; Pegaspargase; Pegfilgrastim; PEG-INTRON™; PEG-L-asparaginase; PEMETREXED; Pembrolizumab; Pentostatin; Pertuzumab; Phenylalanine Mustard; Pidilizumab; Platinol®; Platinol-AQ®; Prednisolone; Prednisone; Prelone®; Procarbazine; PROCrit®; Proleukin®; Prolifeprospan 20 với Carmustine Implant; Purinethol®; các chất ức chế BRAF; Raloxifene; Revlimid®; Rheumatrex®; Rituxan®; Rituximab; Roferon-A®; Romiplostim; Rubex®; Rubidomycin hydrochloride; Sandostatin®; Sandostatin LAR®; Sargramostim; Solu-Cortef®; Solu-Medrol®; Sorafenib; SPRYCEL™; STI-571; STIVAGRA™, Streptozocin; SU11248; Sunitinib; Sutent®; Tamoxifen Tarceva®; Targretin®; Tassigna®; Taxol®; Taxotere®; Temodar®; Temozolomide; Temsirolimus; Teniposide; TESPAs; Thalidomide; Thalomid®; TheraCys®; Thioguanine; Thioguanine Tabloid®; Thiophosphoamide; Thioplex®; Thiotepa; TICE®; Toposar®; Topotecan; Toremifene; Torisel®; Tositumomab; Trastuzumab; Treanda®; Tremelimumab; Tretinoin; Trexall™; Trisenox®; TSPA; TYKERB®; Urelumab; VCR; Vectibix™; Velban®; Velcade®; Venetoclax; VePesid®; Vesanoid®; Viadur™; Vidaza®; Vinblastine; Vinblastine Sulfate; Vincasar Pfs®; Vincristine; Vinorelbine; Vinorelbine tartrate; VLB; VM-26; Vorinostat; Votrient; VP-16; Vumon®; Xeloda®; Zanosar®; Zevalin™; Zinecard®; Zoladex®; axitinib; Zoledronic; Zolanza; hoặc Zometa®, và/hoặc tác nhân bất kỳ mà không được liệt kê cụ thể ở đây mà hướng đích theo cách tương tự.

Khi hai hoặc nhiều chất hoặc nguyên tắc được sử dụng là một phần của chế độ điều trị kết hợp, chúng có thể được dùng thông qua cùng con đường dùng hoặc qua các đường dùng khác nhau, ở thời điểm về cơ bản giống nhau hoặc khác nhau (ví dụ, về cơ bản là đồng thời, liên tiếp, hoặc theo chế độ thay đổi). Khi các chất hoặc các nguyên tắc được dùng một cách đồng thời thông qua cùng đường dùng, chúng có thể được dùng ở các dạng bào chế được phẩm khác nhau hoặc các chế phẩm khác nhau hoặc một phần của dạng bào chế hoặc được phẩm kết hợp, là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Tương tự, khi hai hoặc nhiều hoạt chất hoặc nguyên tắc được sử dụng là một phần của chế độ điều trị kết hợp, mỗi chất hoặc nguyên tắc có thể được dùng với cùng lượng

và theo cùng chế độ như được sử dụng khi chính hợp chất hoặc nguyên tắc được sử dụng, và sự sử dụng kết hợp như vậy có thể hoặc không thể dẫn đến tác dụng hiệp đồng. Tuy nhiên, khi sự sử dụng kết hợp của hai hoặc nhiều hoạt chất hoặc nguyên tắc dẫn đến hiệu quả hiệp đồng, nó cũng có thể làm giảm lượng của một, nhiều hơn một, hoặc tất cả các chất hoặc nguyên tắc được sử dụng, trong khi vẫn đang được tác dụng điều trị mong muốn. Điều này có thể, ví dụ, hữu dụng để tránh, hạn chế hoặc làm giảm tác dụng phụ bất kỳ không mong muốn nào mà liên quan đến việc dùng một hoặc nhiều chất hoặc nguyên tắc khi chúng được sử dụng với lượng thông thường của chúng, trong khi vẫn đạt được hiệu quả được hoặc điều trị mong muốn.

Sự hiệu quả của chế độ điều trị được sử dụng theo sáng chế có thể được xác định và/hoặc theo cách đã biết bất kỳ cho bệnh hoặc chứng rối loạn liên quan, như rõ ràng đối với bác sĩ lâm sàng. Bác sĩ lâm sàng cũng có khả năng, khi thích hợp và trong từng trường hợp, thay đổi hoặc điều chỉnh chế độ điều trị, sao cho đạt được hiệu quả điều trị mong muốn, để tránh, giới hạn hoặc làm giảm các tác dụng phụ không mong muốn, và/hoặc để đạt được sự cân bằng thích hợp giữa việc đạt được hiệu quả điều trị mong muốn và mặt khác tránh, giới hạn hoặc làm giảm các tác dụng phụ không mong muốn.

Thông thường, chế độ điều trị có thể được tiếp tục đến khi hiệu quả điều trị mong muốn đạt được và/hoặc trong thời gian đến khi hiệu quả điều trị mong muốn được duy trì. Một lần nữa, điều này có thể được xác định bởi bác sĩ lâm sàng.

Theo các phương án khác nhau, các dược phẩm chứa một hoặc nhiều các protein chủ vận thụ thể TRAIL, ở dạng một mình hoặc phối hợp với các tác nhân phòng bệnh, các tác nhân điều trị, và/hoặc các chất mang dược dụng được đề xuất ở đây. Theo các phương án khác nhau, các ví dụ không mang tính giới hạn về việc sử dụng của các dược phẩm được bộc lộ ở đây bao gồm chẩn đoán, phát hiện và/hoặc theo dõi chứng rối loạn, phòng ngừa, điều trị, kiểm soát và/hoặc làm thuyên giảm hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó và/hoặc trong nghiên cứu. Dạng bào chế của các dược phẩm, ở dạng một mình hoặc phối hợp với các tác nhân phòng bệnh, các tác nhân điều trị, và/hoặc các chất mang dược dụng, là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (US 20090311253 A1).

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm bào chế có thể chứa một hoặc nhiều axit amin, một hoặc nhiều polysacarit và/hoặc polysorbat, và protein chủ vận thụ thể

TRAIL có mặt với nồng độ trong khoảng khoảng 0,1 và 100 mg/ml, kể cả các điểm tới hạn (ví dụ, 0,1-10, 1-10, 0,1-50, 1-50, 1-100, 10-100, 25-100, 25-50, hoặc 50-100 mg/ml), trong đó được phẩm là ở độ pH trong khoảng 5,0 và 7,0, bao gồm cả các điểm tới hạn (ví dụ, pH khoảng 5,0-6,0, 5,5-6,0, 5,0-6,5, 5,5-6,5, hoặc 6,0-7,0). Theo một phương án, ít nhất một axit amin trong dạng bào chế là histidin và có mặt với nồng độ là khoảng 10-20 mM, 10-15mM, 15-20mM, hoặc khoảng 15mM. Theo một phương án, ít nhất một polysacarit trong dạng bào chế là sucroza và có mặt với nồng độ là khoảng 0-8,0% khối lượng/thể tích (w/v). Theo một phương án, polysorbat trong dạng bào chế là polysorbat 80 và có mặt với nồng độ là khoảng 0-0,06% w/v. Theo một phương án, ít nhất một axit amin trong dạng bào chế là arginin và có mặt với nồng độ là khoảng 0-1,5% w/v (ví dụ, 0,5-1,5, 1,0-1,5, hoặc 0,5-1,0 w/v). Theo một phương án, protein chủ vận thụ thể TRAIL có mặt trong dạng bào chế với nồng độ là khoảng 0,1-100 mg/ml, (ví dụ, khoảng 1-100 mg/ml, hoặc khoảng 1-15 mg/ml, hoặc khoảng 1-7,5 mg/ml, hoặc khoảng 2,5-7,5 mg/ml, hoặc khoảng 5-7,5 mg/ml, hoặc khoảng 25-100 mg/ml, hoặc khoảng 20-60 mg/ml, hoặc khoảng 25-50 mg/ml, hoặc khoảng 25 mg/ml, hoặc khoảng 50 mg/ml, hoặc khoảng 0,1-60 mg/ml, hoặc khoảng khoảng 0,1-25 mg/ml, hoặc khoảng 1,0-60 mg/ml, hoặc khoảng 0,5-60 mg/ml, hoặc khoảng 0,1-2,0 mg/ml, hoặc khoảng 0,5-2,0 mg/ml, hoặc khoảng 1-5 mg/ml, hoặc khoảng 1-7,5 mg/ml, hoặc khoảng 1-15 mg/ml, hoặc khoảng 0,5 mg/ml, hoặc khoảng 1,0 mg/ml).

Theo sáng chế, cụm từ "lượng hữu hiệu" có nghĩa là lượng của protein chủ vận TRAIL dẫn đến sự cải thiện có thể thấy được (ví dụ, ít nhất khoảng 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, hoặc nhiều hơn từ đường gốc) trong một hoặc nhiều thông số liên quan đến sự loạn chức năng của TRAIL hoặc với bệnh hoặc chứng rối loạn liên quan đến TRAIL.

Theo các phương án khác nhau, được phẩm bào chế ở dạng nước, dạng đông khô, hoặc dạng đông khô và bù nước. Theo một phương án, dung dịch hydrat hóa là dextroza và/hoặc nước muối (ví dụ, dextroza ở nồng độ là khoảng 5% w/v và/hoặc nước muối ở nồng độ là khoảng 0,9% w/v). Theo một phương án, được phẩm bào chế chứa khoảng 15 mM histidin, khoảng 0,03% (w/v) polysorbat 80, khoảng 4% (w/v) sucroza, và khoảng 0,1-25 mg/ml protein chủ vận thụ thể TRAIL, hoặc khoảng 1-15 mg/ml protein chủ vận thụ thể TRAIL, và ở pH khoảng 6. Theo một phương án, dạng bào chế còn chứa ít nhất một tác nhân bổ sung.

Theo các phương án khác nhau, dạng bào chế được sử dụng chứa khoảng 25 mg/ml protein chủ vận thụ thể TRAIL, khoảng 15 mM histidin, 0,03% polysorbat 80 (khối lượng/thể tích, w/v), 4,0% sucroza (w/v), và pH khoảng 6,0. Theo một số phương án, dạng bào chế không chứa arginin. Theo một số phương án, dạng bào chế thể hiện sự ổn định kết đông-tan đông, sự ổn định dạng bào chế lỏng và/hoặc sự ổn định của dạng bào chế đông khô được cải thiện không ngờ, khi so với các dạng bào chế khác chứa các thành phần hoặc nồng độ khác.

Các phương pháp dùng tác nhân điều trị được đề xuất ở trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dùng qua đường miệng, dùng ngoài ruột (ví dụ, trong da, trong cơ, trong bụng, trong tĩnh mạch và dưới da), dùng ngoài màng cứng, dùng trong khối u, dùng trong niêm mạc (ví dụ, trong mũi và qua miệng) và dùng trong phổi (ví dụ, các hợp chất được sol khí được dùng với máy xông hít hoặc máy khí dung). Dạng bào chế của các dược phẩm cho các đường dùng cụ thể, và các vật liệu và các kỹ thuật cần cho các phương pháp dùng khác nhau đã có và đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (US 20090311253 A1).

Theo các phương án khác nhau, các chế độ liều có thể được điều chỉnh để mang lại đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng điều trị hoặc phòng ngừa). Ví dụ, liều bolus đơn có thể được sử dụng, một số liều chia nhỏ có thể được sử dụng theo thời gian hoặc liều có thể được giảm hoặc tăng từng phần khi được chỉ định trong tình huống điều trị khẩn cấp. Theo một số phương án, các dược phẩm ngoài đường tiêu hóa được bào chế ở dạng đơn vị liều để dễ sử dụng và đồng nhất liều dùng. Thuật ngữ “dạng đơn vị liều” đề cập đến các đơn vị riêng biệt theo cách tự nhiên thích hợp ở dạng liều lượng đơn vị cho đối tượng động vật có vú cần được điều trị; mỗi một đơn vị chứa một lượng xác định trước hoạt chất được tính toán để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn kết hợp với chất mang được dùng cần thiết.

Khoảng ví dụ không giới hạn về lượng hữu hiệu điều trị hoặc phòng ngừa của protein chủ vận thụ thể TRAIL được đề xuất ở đây là khoảng 0,1-100 mg/kg, (ví dụ, khoảng 0,1-0,5, 0,1-1, 0,1-10, 0,1-20, 0,1-50, 0,1-75, 1-10, 1-15, 1-7,5, 1,25-15, 1,25-7,5, 2,5-7,5, 2,5-15, 5-15, 5-7,5, 1-20, 1-50, 7-75, 1-100, 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-50, 5-75, 10-20, 10-50, 10-75, hoặc 10-100 mg/kg, hoặc nồng độ bất kỳ nào trong khoảng giữa đó). Theo một số phương án, protein chủ vận thụ thể TRAIL có mặt trong dược phẩm với nồng độ hữu hiệu điều trị, ví dụ, với nồng độ khoảng 0,1-100 mg/ml (ví dụ,

khoảng 0,1-0,5, 0,1-1, 0,1-10, 0,1-20, 0,1-50, 0,1-75, 1-10, 1-20, 1-50, 1-75, 1-100, 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-50, 5-75, 10-20, 10-50, 10-75, hoặc 10-100 mg/ml, hoặc nồng độ bất kỳ trong khoảng đó). Lưu ý rằng các giá trị liều lượng có thể thay đổi theo loại và mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh cần làm thuyên giảm. Cũng cần phải hiểu rằng đối với mỗi đối tượng cụ thể, chế độ liều đặc trưng có thể được điều chỉnh theo thời gian tùy thuộc vào nhu cầu cá nhân và quyết định chuyên môn của người cho sử dụng hoặc giám sát việc sử dụng chế phẩm, và khoảng liều lượng nêu trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích ví dụ và không nhằm giới hạn phạm vi hoặc thực tiễn của chế phẩm được bảo hộ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

1. Sản xuất protein chủ vận thụ thể TRAIL (sc TRAIL wt)

1.1 Cấu trúc polypeptit

A) Các axit amin Met1 – Gly20

Peptit tín hiệu Ig-Kappa, điểm cắt bằng peptidaza tín hiệu giả định sau axit amin GIy 20.

B) Các axit amin Gln21 – Gly182

Vùng xytoxin hòa tan thứ nhất của phối tử TRAIL của người (TRAIL, axit amin 120 - 281 của SEQ ID NO: 1).

C) Các axit amin GIy 183 – Ser 190

Phần tử liên kết peptit thứ nhất của SEQ ID NO: 2.

D) Các axit amin Arg191 – Gly351

Vùng xytoxin hòa tan thứ hai của phối tử TRAIL của người (TRAIL, các axit amin 121 - 281 của SEQ ID NO: 1).

E) Các axit amin GIy352 – Ser359.

Phần tử liên kết peptit thứ hai của SEQ ID NO: 2.

F) Các axit amin Arg360 – Gly520

Vùng xytoxin hòa tan thứ ba của phối tử TRAIL của người (TRAIL, các axit amin 121-281 của SEQ ID NO: 1).

G) Các axit amin Gly521 – Cys542

Phần tử liên kết bản lề của SEQ ID NO: 11.

H) Các axit amin Pro543 - Lys760

Vùng đoạn Fc của kháng thể của SEQ ID NO: 10.

Protein chủ vận thụ thể TRAIL trên đây được nêu trong SEQ ID NO: 14.

Các phần tử liên kết đã chỉ ra có thể được thay thế bởi các phần tử liên kết được ưu tiên khác, ví dụ, như được thể hiện trong các SEQ ID NO: 3-9.

Nên chú ý rằng phần tử liên kết peptit thứ nhất và phần tử liên kết peptit thứ hai không cần phải giống nhau.

Trình tự peptit tín hiệu (A) có thể được thay thế bởi bất kì trình tự khác thích hợp, ví dụ, trình tự peptit tín hiệu của động vật có vú.

1.2 Catxet gen mã hóa polypeptit

Gen tổng hợp có thể được tối ưu về mặt sử dụng codon của nó để biểu hiện trong các tế bào chủ thích hợp, ví dụ, các tế bào côn trùng hoặc tế bào động vật có vú. Trình tự axit nucleic ưu tiên được nêu trong SEQ ID NO: 16.

2. Biểu hiện và tinh sạch

Tách dòng, biểu hiện và tinh sạch các polypeptit dung hợp

Các protein dung hợp nêu trên được biểu hiện tái tổ hợp trong hai tế bào chủ nhân chuẩn khác nhau:

Để phân tích sơ bộ các protein dung hợp chủ vận thụ thể TRAIL nêu trên, các tế bào Hek293T phát triển trong DMEM + GlutaMAX (GibCo) được bổ sung với FBS 10%, 100 đơn vị/ml Penicillin và 100 [mu]g/ml Streptomycin được chuyển nhiễm một cách nhanh chóng với plasmit chứa catxet biểu hiện cho polypeptit dung hợp và dầu chuẩn chọn lọc thích hợp, ví dụ, catxet biểu hiện chức năng chứa gen kháng blasticidine, puromycin hoặc hygromycin. Trong các trường hợp này, khi nhiều chuỗi polypeptit là cần thiết để thu được sản phẩm cuối cùng, các catxet biểu hiện được kết hợp trên một plasmit hoặc nằm trên các plasmit khác nhau trong quá trình chuyển nhiễm. Dịch nuôi cấy tế bào chứa polypeptit dung hợp tái tổ hợp được thu ba ngày sau khi chuyển nhiễm và được gạn lọc bằng ly tâm ở 300 x g sau đó lọc qua lọc vô trùng kích thước 0,22 μ m.

Để biểu hiện các protein dung hợp chủ vận thụ thể TRAIL ở quy mô lớn hơn để dùng *in vivo*, các catxet ADN tổng hợp mã hóa các protein nêu trên được chèn vào các vector biểu hiện nhân chuẩn chứa dấu chuẩn chọn lọc thích hợp (ví dụ, catxet biểu hiện chức năng chứa gen kháng blasticidin, puromycin hoặc hygromycin) và các nhân tố di truyền thích hợp để tăng cường số các vị trí chèn về mặt phiên mã trong hệ gen của tế bào chủ. Các vector biểu hiện được thẩm định trình tự được đưa vào bằng cách điện chuyển vào các tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc được tạo huyền phù (CHO-S, Invitrogen). Áp suất lựa chọn phù hợp được áp dụng ba ngày sau khi chuyển nhiễm vào các tế bào chuyển nhiễm. Các tế bào sống sót mang (các) gen kháng dẫn xuất từ được phục hồi bằng cách nuôi cấy sau đó trong áp suất lựa chọn. Trên cơ sở sự phát triển ổn định của các bể tế bào chọn lọc trong môi trường được xác định về mặt hóa học (PowerCHO2-CD, Lonza) ở 37°C và 7% CO₂ trong máy ủ lắc theo quỹ đạo (100 vòng/phút, khoảng lắc 50mm), dịch nổi riêng được phân tích bằng các thử nghiệm ELISA phát hiện các protein nêu trên và các bể tế bào với hiệu suất đặc hiệu cao nhất được mở rộng trong bình lắc trước khi sản xuất protein (máy lắc theo quỹ đạo, 100 vòng/phút, khoảng lắc 50mm).

Để sản xuất protein quy mô phòng thí nghiệm, các bể tế bào riêng được nuôi cấy trong 7-12 ngày trong môi trường được xác định về mặt hóa học (PowerCHO2-CD, Lonza) ở 37°C và 7% CO₂ trong lò phản ứng sinh học Wave 20/50 EHT (GE-Healthcare). Môi trường cơ bản là PowerCHO2-CD được bổ sung 4mM Glutamax. Môi trường Wave được bắt đầu với nồng độ tế bào sống là 0,3 đến 0,4 x 10⁶ tế bào/ml và các điều kiện sau đây (cho 5 hoặc 10 túi đựng theo lít): tốc độ lắc 18 vòng/phút, góc lắc 7°, dòng khí 0,2-0,3 L/phút, 7% CO₂, 36,5°C. Trong khi Wave chạy, môi trường nuôi cấy tế bào được bổ sung hai lần PowerFeed A (Lonza), thông thường vào ngày thứ 2 (20% lượng bổ sung) và ngày 5 (30% lượng bổ sung). Sau lần bổ sung thứ hai, tốc độ lắc tăng lên 22 vòng/phút, cũng như góc lắc tăng lên là 8°.

Lò phản ứng sinh học thường được thu ở khoảng giữa ngày thứ 7 đến ngày thứ 12 khi khả năng sống của tế bào giảm dưới 80%. Đầu tiên, dịch nổi nuôi cấy được lọc gạn sử dụng hệ lọc theo chiều sâu thủ công (Millipore Millistak Pod, MC0HC 0,054m²). Các protein được gắn Strep-tag, Avidin được thêm vào nồng độ cuối là 0,5mg/L. Cuối cùng, dịch nổi nuôi cấy chứa protein dung hợp chủ vận thụ thể TRAIL được lọc vô trùng sử

dụng bộ lọc trên nắp chai (0,22 μ m, PES, Corning) và được lưu ở 2-8°C cho đến khi xử lý tiếp theo.

Để tinh sạch về mặt ái lực, Streptactin Sepharosa được đưa vào cột (nền gel 1 ml), được làm cân bằng với 15 ml đệm W (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) hoặc PBS pH 7,4 và dịch nuôi cấy tế bào được đưa vào cột với tốc độ dòng là 4 ml/phút. Sau đó, cột được rửa bằng 15 ml đệm W và polypeptit liên kết được rửa giải từng bước bằng cách thêm 7 x 1 ml đệm E (Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM, Desthiobiotin 2,5 mM, pH 8,0). Theo cách khác, PBS pH 7,4 chứa 2,5 mM Desthiobiotin có thể được sử dụng cho bước này.

Theo cách khác đối với phương pháp dựa trên Streptactin Sepharosa, sự tinh sạch về mặt ái lực được thực hiện sử dụng cột với protein-A được cố định làm phối tử ái lực và hệ sắc ký Akta (GE-Healthcare). Vật liệu pha rắn với ái lực cao đối với vùng FC của protein dung hợp được lựa chọn: MABSelect Sure™ (GE Healthcare). Tóm lại, dịch nuôi cấy tế bào được gạn lọc được tải lên cột HiTrap MabSelectSure (CV=5ml) được làm cân bằng trong đệm rửa 1 (Pi 20 mM, NaCl 95 mM, pH 7,2) không vượt quá tải là 10mg protein dung hợp trên ml nền của cột. Cột được rửa bằng mười thể tích cột (10CV) của đệm được cân bằng nêu trên sau đó là bốn lần thể tích cột (4CV) của đệm rửa 2 (Pi 20mM, NaCl 95mM, pH 8,0) thành protein tế bào chủ và ADN tế bào chủ tiêu dịch. Cột sau đó được rửa giải bằng đệm rửa giải (Pi 20mM, NaCl 95mM, pH 3,5) và dịch rửa giải được thu lại đến mười phần với mỗi phần có thể tích bằng thể tích nền của cột (5ml). Mỗi phần được trung hòa với thể tích bằng với thể tích đệm rửa 2 nêu trên. Vận tốc tuyến tính được đặt đến 150cm/giờ và giữ không đổi trong suốt phương pháp sắc ký ái lực nêu trên.

Lượng protein của các phần rửa giải được định lượng và các phần nhiều nhất được cô đặc bằng siêu lọc và sau đó được tinh sạch bằng sắc ký loại kích thước (Size Exclusion Chromatography -SEC).

SEC được thực hiện trên cột Superdex 200 10/300 GL hoặc HiLoad 26/60 sử dụng hệ sắc ký Akta (GE-Healthcare). Các cột được làm cân bằng với nước muối được đệm phosphat và polypeptit được tinh sạch về mặt ái lực, được cô đặc được tải lên cột SEC với thể tích mẫu không vượt quá 2 % (thể tích/thể tích) thể tích cột. Trong trường hợp các cột Superdex200 10/300 GL (GE Healthcare), tỷ lệ dòng là 0,5ml trên phút được áp

dụng. Trong trường hợp cột HiLoad 26/60 Superdex200, tỷ lệ dòng là 2,5 ml trên phút được áp dụng. Profin rửa giải của polypeptit được theo dõi bằng sự hấp thụ ở 280 nm

Để xác định khối lượng phân tử biểu kiến của polypeptit dung hợp được tinh sạch trong các điều kiện tự nhiên, cột Superdex 200 được tải lên các protein tiêu chuẩn của khối lượng phân tử đã biết. Dựa trên thể tích rửa giải của protein tiêu chuẩn, đường cong tính toán được dựng sơ đồ và khối lượng phân tử biểu kiến của polypeptit dung hợp tinh sạch được xác định. Vùng FC chứa các protein dung hợp chủ vận thụ thể TRAIL thường được rửa giải từ cột Supoerdex200 với khối lượng phân tử biểu kiến cho homodime xấp xỉ là 160-180 kDa.

3. Thử nghiệm chết theo chương trình

Thử nghiệm tế bào với dòng tế bào T Jurkat A3 thường trực được sử dụng để xác định hoạt tính gây chết theo chương trình của protein dung hợp chủ vận thụ thể TRAIL. Các tế bào Jurkat được phát triển trong bình với môi trường RPMI 1640- + GlutaMAX (GibCo) được bổ sung FBS 10%, 100 đơn vị/ml Penicillin và 100 µg/ml Streptomycin. Trước thử nghiệm, 100,000 tế bào được cấy trên mỗi giếng vào đĩa vi chuẩn độ 96 giếng. Việc thêm các nồng độ khác nhau của các peptit dung hợp vào các giếng được thực hiện sau 3 giờ ử ở 37°C. Các tế bào được dung giải bằng cách thêm đệm dung giải (HEPES 250 mM, MgCl₂ 50 mM, EGTA 10 mM, Triton-X-100 5%, DTT 100 mM, AEBSF 10 mM, pH 7,5) và các đĩa được đặt trên nước đá trong 30 phút đến 2 giờ. Sự chết theo chương trình được so sánh bởi hoạt tính của các caspaza tăng, ví dụ, Caspaza-3. Do đó, sự tách nền caspaza cụ thể Ac-DEVD-AFC (Biomol) được sử dụng để xác định mức độ chết theo chương trình. Thực tế, hoạt tính caspaza tương quan với phần trăm tế bào chết theo chương trình được xác định về mặt hình thái sau khi nhuộm tế bào với propidi iodua và Hoechst-33342. Để cho thử nghiệm hoạt tính caspaza, 20 µl dịch dung giải tế bào được đưa vào đĩa vi chuẩn độ 96 giếng. Sau khi thêm 80 µl đệm chứa HEPES 50 mM, sucroza 1%, CHAPS 0,1%, Ac-DEVD-AFC 50 µM, và DTT 25 mM, pH 7,5, đĩa được đưa vào đầu đọc đĩa vi chuẩn độ Tecan Infinite 500 và sự tăng mật độ phát huỳnh quang được theo dõi (bước sóng kích thích 400 nm, bước sóng phát xạ 505 nm).

3.1 Thử nghiệm chết tế bào

Để xác định sự chết tế bào trong các tế bào sacom sợi HT1080, 15,000 tế bào được cấy vào đĩa 96 giếng qua đêm trong môi trường RPMI 1640 + GlutaMAX (GibCo) được

bổ sung FBS 10 % (Biochrom). Các tế bào được ủ đồng thời với cycloheximide (Sigma) ở nồng độ cuối là 2,5 g/ml. Sự chết tế bào được định lượng bằng cách nhuộm với đậm KV (tím tinh thể 0,5%, metanol 20%). Sau khi nhuộm, các giếng được rửa bằng nước và được làm khô bằng không khí. Thuốc nhuộm được rửa giải bằng metanol và mật độ quang ở 595 nm được đo bằng đầu đọc ELISA.

4. Thử nghiệm ổn định/kết tụ

4.1 Nguyên tắc phân tích kết tụ (Định nghĩa cho protein hòa tan)

Hàm lượng của các monome (tập hợp trime xác định của các modun liên kết thụ thể TRAIL) và sự kết tụ được xác định bằng SEC phân tích như được mô tả trong ví dụ 2. Cho mục đích cụ thể này, sự phân tích được thực hiện trong đệm chứa các nồng độ muối sinh lý ở pH sinh lý (ví dụ, NaCl 0,9%, pH 7,4; PBS pH 7,4). Sự phân tích kết tụ điển hình được thực hiện trên cột Superdex200 (GE Healthcare). Cột này phân tách các protein trong khoảng giữa 10 đến 800 kDa.

Để xác định khối lượng phân tử biểu kiến của polypeptit dung hợp được tinh sạch trong các điều kiện tự nhiên, cột Superdex 200 được tải lên các protein tiêu chuẩn của khối lượng phân tử đã biết. Dựa trên thể tích rửa giải của protein tiêu chuẩn, đường cong tính toán được vẽ sơ đồ và khối lượng phân tử biểu kiến của polypeptit dung hợp tinh sạch được tính toán dựa trên thể tích rửa giải.

Sự phân tích SEC của các protein tan, không kết tụ, ví dụ, TRAIL trime, thường thể hiện đỉnh protein đơn khác biệt ở thể tích rửa giải xác định. Thể tích rửa giải này tương ứng với khối lượng phân tử tự nhiên biểu kiến của protein cụ thể và xấp xỉ bằng khối lượng phân tử lý thuyết được tính trên cơ sở trình tự axit amin ban đầu.

Nếu sự kết tụ protein xảy ra, sự phân tích SEC thể hiện các đỉnh protein bổ sung với thể tích lưu thấp hơn. Đối với TRAIL, sự kết tụ các protein hòa tan xảy ra theo cách đặc trưng. Các protein có xu hướng tạo thành các oligome của "các trime", tạo thành các noname (3 x 3) và 27me (3 x 9). Các oligome này đóng vai trò làm mầm kết tụ và hàm lượng các oligome cao có thể dẫn đến sự kết tụ của protein. Các oligome có khối lượng phân tử và kết tụ rửa giải trong thể tích của cột Superdex200 column và không thể được phân tích bởi SEC về khối lượng phân tử tự nhiên của chúng.

Do sự gây ra kết tụ (hoàn toàn), các dạng điều chế được tinh sạch của các protein dung hợp TRAIL-SF tốt hơn là nên chỉ chứa các protein trime xác định và chỉ chứa

lượng rất thấp protein được oligome hóa. Mức kết tụ/oligome hóa của dạng điều chế protein TRAIL-SF cụ thể được xác định trên cơ sở phân tích SEC bằng cách tính toán vùng đỉnh của sơ đồ OD280 cho phân trime và phân oligome/kết tụ xác định một cách tương ứng. Dựa trên vùng đỉnh tổng, phần trăm của protein trime xác định được tính toán như sau:

$$(\% \text{ Hàm lượng trime} = [\text{trime vùng đỉnh}] / [\text{Tổng vùng đỉnh}] \times 100)$$

Định nghĩa về protein hòa tan như được sử dụng trong bản mô tả này, mô tả dạng điều chế protein của protein TRAIL tinh sạch trong đệm với các nồng độ muối sinh lý ở pH sinh lý mà chứa hàm lượng protein hòa tan xác định (tập hợp trime của các vùng TRAIL) > 90% trong dải nồng độ protein điển hình từ 0,2 đến 10,0 mg/ml.

5. Xác định thời gian bán hủy

Mỗi phân tử A-D được tạo thành từ hai polypeptit được liên kết đồng hóa trị bởi các liên kết disulfit liên chuỗi. Số các glycosit và xystein bản lẻ (tạo ra các liên kết disulfit liên chuỗi giữa các protein) được kiểm tra nhằm xác định hiệu quả rằng sự thay thế các đặc tính này có trên thời gian bán hủy của các hợp chất này.

Chuột NMRI cái được điều trị bằng 1,2 mg/kg bw và/hoặc với 4 mg/kg bw hợp chất cụ thể dưới dạng tiêm liều bolus đơn theo đường trong tĩnh mạch. Máu toàn phần được thu lại trước khi áp dụng (trước phân liều), và tới 168 giờ sau khi dùng hợp chất kiểm tra. Huyết thanh được chuẩn bị và các mẫu được lưu ở -80 °C đến khi xác định nồng độ huyết thanh. Các thông số được động được tính toán sử dụng các nồng độ huyết thanh trung bình và chương trình đánh giá được động PK Solutions Version 2.0 để phân tích dữ liệu được động không ngăn (Summit Research Services, Montrose, CO). PK Solutions là ứng dụng tự động trên cơ sở phần mềm Excel, ứng dụng này tính toán các thông số được động từ dữ liệu nồng độ-thời gian thu được từ việc phân tích ví dụ, các mẫu sinh học sau khi dùng trong tĩnh mạch hoặc ngoài mạch. PK Solutions tính toán các kết quả mà không ước đoán bất kì mô hình ngăn cụ thể nào.

Sự định lượng các phân tử thử nghiệm trong huyết thanh được thực hiện với thử nghiệm ELISA phát hiện các chủ vận thụ thể TRAIL riêng được thể hiện trong bảng 7, độc lập với Strep-Tag, là một phần của các phân tử. Sơ đồ chung được thể hiện trên Fig. 18. Các kết quả được tóm tắt trong bảng 7.

Phân tử A (tạo bởi hai polypeptit của SEQ ID NO:26) có hai xystein bản lẻ (tạo thành hai liên kết disulfit liên chuỗi) và gốc N ở vị trí 297 của vùng Fc (theo chỉ số EU), dẫn đến sự glycosyl hóa CH2 kiểu đại. Phân tử A cũng có các glycosit ở vị trí 168 và 337. Phân tử B (được tạo bởi hai polypeptit của SEQ ID NO: 19) có ba xystein bản lẻ (tạo thành ba các liên kết disulfit liên chuỗi) (ở các vị trí 513, 519, và 522) và đột biến N297S ở vị trí 297 của vùng Fc (theo chỉ số EU), dẫn đến sự glycosyl hóa của vùng CH2. Phân tử B cũng có các glycosit ở các vị trí 168 và 337. Phân tử C (được tạo bởi hai polypeptit của SEQ ID NO: 27) có ba xystein bản lẻ (tạo thành ba liên kết disulfit liên chuỗi) và đột biến N297S ở vị trí 297 của vùng Fc (theo chỉ số EU), dẫn đến sự glycosyl hóa của vùng CH2. Ngoài ra, có glycosit ở vị trí 168 (phần tử liên kết 1), nhưng không ở vị trí 337 (phần tử liên kết 2). Phân tử D (được tạo bởi hai polypeptit của SEQ ID NO:28) có ba xystein bản lẻ (tạo thành ba liên kết disulfit liên chuỗi) và đột biến N297S ở vị trí 297 của vùng Fc (theo chỉ số EU), dẫn đến sự glycosyl hóa của vùng CH2. Ngoài ra, các glycosit trên cả phần tử liên kết 1 và phần tử liên kết 2 (các vị trí 168 và 337, một cách tương ứng) đã được triệt tiêu trong phân tử D.

Độ ổn định *in vivo* (như được đánh giá bởi thời gian bán hủy của hợp chất) của phân tử B (cả các phần tử liên kết được glycosyl hóa, các CH2 glycosit bị triệt tiêu, và việc thêm systein bản lẻ thứ ba) được tăng cường khi so sánh với phân tử A. Ngoài ra, sự triệt tiêu tất cả các glycosit từ hợp chất (phân tử D) dẫn đến độ ổn định *in vivo* giảm và hiệu suất thấp trong quá trình biểu hiện tạm thời. Phân tử C (phần tử liên kết thứ nhất được glycosyl hóa, phần tử liên kết được glycosyl hóa, các CH2 glycosit bị triệt tiêu) đã chứng minh sự ổn định trung bình *in vivo* khi so sánh với các phân tử B và D (xem kết quả trong bảng 7).

Bảng 7: Các kết quả của thử nghiệm thời gian bán hủy của hợp chất ở chuột NMRI

Phân tử	Số vị trí glycosyl hóa	Số các xystein bản lẻ	Thời gian bán hủy cuối 4mg/kg, trong tĩnh mạch (giờ)	Thời gian bán hủy cuối 1,2 mg/kg, trong tĩnh mạch (giờ)
A	6	2	23,1	17,7
B	4	3	33,94	28,28
C	2	3	21,03	-
D	0	3	8,81	-

Các kết quả thử nghiệm này chứng minh rằng sự kết hợp việc glycosyl hóa phân tử liên kết (trong cả các phân tử liên kết 1 và 2) với liên kết disulfit liên chuỗi thứ ba (thông qua sự bổ sung xystein bản lề) và sự deglycosyl hóa của vùng CH₂ trong vùng Fc dẫn đến độ ổn định lớn hơn *in vivo* trong các phân tử theo sáng chế.

6. Chứng minh hiệu lực *in vitro*

6.1 Protein chủ vận thụ thể TRAIL của SEQ ID NO: 19 ức chế sự sống sót tế bào khối u rắn và tế bào máu người *in vitro*

Các tế bào khối u được cấy ở mật độ 10,000 tế bào/giếng trong các đĩa 96 giếng trong môi trường khuyến nghị chứa FBS 10% và được xử lý bằng protein chủ vận thụ thể TRAIL được tạo bởi hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 trong 24 giờ ở 37°C trong môi trường 5% CO₂, được làm ẩm. Khả năng sống của tế bào sau đó được đánh giá sử dụng thuốc thử CellTiter-Glo® như mô tả theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Promega; Madison, WI). Các trị số IC₅₀ được xác định bằng phân tích hồi quy không tuyến tính dữ liệu đáp ứng nồng độ được chuẩn hóa đến các tế bào đối chứng không xử lý. Các ví dụ về các đường cong đáp ứng nồng độ cho các tế bào Colo205, Jurkat và SKM-1 đã chứng minh sự mất khả năng sống của tế bào để đáp ứng với protein chủ vận thụ thể TRAIL được tạo bởi hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 xử lý được thể hiện trong Fig. 19. Bảng 8 thể hiện các kết quả của các dòng tế bào máu (A; (n=40; u lympho không Hodgkin, NHL; bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, AML; bệnh bạch cầu tạo lympho bào cấp tính, ALL) và các dòng tế bào khối u rắn (B; (n=44; caxinom phổi tế bào không nhỏ, NSCLC; tụy; ung thư trực tràng, CRC; ung thư vú, BrCa; buồng trứng, sacom sợi; đầu và cổ, H&N; ung thư phổi tế bào nhỏ, SCLC) được xử lý bằng protein chủ vận thụ thể TRAIL được tạo bởi hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 trong 24 giờ và khả năng sống được đánh giá bởi CellTiter-Glo®. Các trị số IC₅₀ thu được cho protein chủ vận thụ thể TRAIL được tạo bởi hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 hiệu quả trung gian đối với khả năng sống của tế bào khối u được thể hiện.

Bảng 8

Hiệu lực của protein chủ vận thụ thể TRAIL của SEQ ID NO: 19 đối với các dòng tế bào ung thư khối u người *in vitro*

Dòng tế bào khối u	Loại khối u	SEQ ID NO:19 IC ₅₀ (ng/ml)	
A			
SU-DHL-8	NHL	1,36	
NUDHL-1	NHL	6,50	
OCI-Ly8	NHL	7,49	
ULA	NHL	8,44	
OCI-Ly2	NHL	18,98	
OCI-LY19	NHL	26,34	
WSU-NHL	NHL	31,60	
OCI-Ly7	NHL	63,76	
SU-DHL-5	NHL	82,07	
OCI-Ly18	NHL	196,20	
OCI-Ly1	NHL	416,95	
SU-DHL-16	NHL	545,55	
SU-DHL-2	NHL	1000,00	
WSU-DLCL2	NHL	1000,00	
Toledo	NHL	1000,00	
OCI-LY3	NHL	1000,00	
RL	NHL	1000,00	
SU-DHL-4	NHL	1000,00	
U2932	NHL	1000,00	
HT	NHL	1000,00	
RC-K8	NHL	1000,00	
SKM-1	AML	0,95	
PL-21	AML	10,67	
EOL-1	AML	18,31	
HL-60	AML	76,62	
OCI-AML2	AML	124,32	
UKE-1	AML	205,35	
MV4-11	AML	312,55	

SET-2	AML	384,80	
MOLM-13	AML	722,10	
OCI-AML5	AML	1032,60	
Kasumi-1	AML	1000,00	
KG-1	AML	1000,00	
OCI-AML3	AML	1000,00	
SHI-1	AML	1000,00	
SKNO-1	AML	1000,00	
TF-1	AML	1000,00	
THP-1	AML	1000,00	
HEL	AML	1000,00	
Jurkat	ALL	3,08	
B			
NCI-H847	NSCLC	14,53	
NCI-H647	NSCLC	24,75	
NCI-H2444	NSCLC	27,75	
NCI-H2170	NSCLC	30,16	
NCI-H460	NSCLC	36,85	
NCI-H838	NSCLC	44,48	
NCI-H1792	NSCLC	61,09	
NCI-H2347	NSCLC	81,06	
NCI-H1373	NSCLC	125,15	
NCI-H522	NSCLC	259,87	
NCI-H2110	NSCLC	314,20	
NCI-H596	NSCLC	397,80	
HCC4006	NSCLC	407,24	
NCI-H2122	NSCLC	480,55	
NCI-H1299	NSCLC	716,00	
NCI-H1975	NSCLC	741,50	
HCC827	NSCLC	2824,50	
NCI-H727	NSCLC	3178,00	
NCI-H1944	NSCLC	4068,75	
NCI-H1299	NSCLC	4214,87	

Calu-6	NSCLC	4757,00	
NCI-H1693	NSCLC	5000,00	
HCC2935	NSCLC	5000,00	
A549	NSCLC	5000,00	
NCI-H1395	NSCLC	5000,00	
NCI-H2172	NSCLC	5000,00	
Calu-1	NSCLC	5000,00	
NCI-H441	NSCLC	5000,00	
NCI-H23	NSCLC	5000,00	
NCI-H661	NSCLC	5000,00	
NCI-H1650-GFP	NSCLC	>3	
BxPC3	Tuyến tụy	16,00	
Capan-1	Tuyến tụy	393,00	
MIA PaCa-2	Tuyến tụy	158,00	
PANC-1	Tuyến tụy	>1000	
SW48	CRC	6,10	
Colo205	CRC	1,30	
SW480	CRC	132,00	
HCT 116-GFP	CRC	337,00	
HCC38	BrCa	3,00	
HCC1569	BrCa	219,00	
MCF7	BrCa	>3000	
MDA-MB-231	BRCa	235,00	
HeyA8-GFP	Buồng trứng	141,00	
Fadu-GFP	H&N	>3	
HT-1080	Sacom sợi	377,00	
NCI-H211	SCLC	72,58	

6.2 Protein chủ vận thụ thể TRAIL của SEQ ID NO: 19 hiệp đồng với các chất chống khối u để gây chết tế bào

Các tế bào khối u được cấy ở mật độ 10,000 tế bào/giếng trong các đĩa 96 giếng trong môi trường khuyến nghị chứa FBS 10% và cùng được xử lý bằng protein chủ vận thụ thể TRAIL được tạo bởi hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 và venetoclax (ABT-199), navitoclax (ABT-263) hoặc docetaxel (DTX) trong 24 giờ

ở 37°C trong môi trường 5% CO₂, được làm ẩm. Khả năng sống của tế bào sau đó được đánh giá sử dụng thuốc thử CellTiter-Glo® như mô tả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu độc lập Bliss (Wong *et al.*, 2012; Mol. Cancer Ther. 11:1026-1035; Bernebaum, 1981 Adv. Cancer Res. 35:269-335; Borisy *et al.*, 2003 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:7977-7982) được sử dụng để đánh giá hoạt tính kết hợp, với các số nguyên âm chỉ sự đối kháng, giá trị bằng không chỉ hoạt tính bổ sung, và các số nguyên dương chỉ sự hiệp đồng. Các điểm số Bliss được tính toán cho mỗi sự kết hợp về bảng liều và được dung nạp để đưa ra giá trị “tổng Bliss”. Ví dụ về sự chết tế bào khối u hiệp đồng gây ra bởi việc đồng điều trị các tế bào khối u người với protein chủ vận thụ thể TRAIL được tạo bởi hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19 và venetoclax, navitoclax hoặc DTX, với tổng Bliss liên quan được thể hiện trong các Fig. 20(A-C). Các tổng Bliss được xác định cho các dạng phối hợp của nhiều dòng tế bào khối u được minh họa trong bảng 9.

Bảng 9. Sự đánh giá sự hiệp đồng Bliss của việc tiêu diệt tế bào bởi protein chủ vận thụ thể TRAIL của SEQ ID NO:19 phối hợp với DTX ở các dòng tế bào NSCLC (A) và venetoclax hoặc navitoclax ở các dòng tế bào NHL & AML (B) *in vitro*

Dòng tế bào khối u	Tổng Bliss (SEQ ID NO:19 + DTX)	Dòng tế bào khối u	Tổng Bliss (SEQ ID NO:19+ venetoclax)	Tổng Bliss (SEQ ID NO:19 + navitoclax)
LG0552	748,2	WSU-DLCL2	1292	560
NCI-H522	549,1	SU-DHL-4	898	617
NCI-H647	452	OCI-AML3	831,9	456,4
NCI-H727	429,4	OCI-AML5	777,8	174,5
NCI-H1373	387,1	U2932	736,2	636,1
NCI-H596	261	PL-21	600,8	244,9
HCC2935	224,2	ULA	343,8	79,4
NCI-H2347	154	OCI-Ly18	309,8	8,3
NCI-H2444	135	MV4;11	301,1	351
A549	118,1	RL	286,1	446,7
NCI-H23	70,6	MOLM-13	270,6	264,8
NCI-H847	64,2	SKM-1	222,9	88,1
HCC4006	15,75	OCI-Ly1	218,8	69,1
NCI-H2170	-97,1	SU-DHL-16	217,5	142,5

LG0567	-105,2
HCC2935	-183
HCC827	-292,8
NCI-H661	-344,5
NCI-H441	-362
NCI-H1395	-512
NCI-H1944	-565
NCI-H1693	-584
Calu-6	-628,7
LG0481	-803
NCI-H2172	-1404

OCI-AMI2	160,2	145,5
OCI-Ly8	154,9	177
THP-1	152,7	43,1
OCI-Ly3	146,5	-242,2
OCI-Ly2	145	127,2
OCI-Ly19	114,9	37,3
SKNO-1	104,7	-138,9
UKE-1	80,5	28,9
WSU-NHK	79,8	84
EOL-1	69,7	-6,3
SU-DHL-2	53,5	-31,8
Toledo	51,4	-68,2
HEL	21,5	-92,4
NuDHL-1	-28,4	18,7
TF-1	-100,6	-50,2
RC-K8	-131	-68
HT	-173	12,1
HL-60	-176	-112,7
SHI-1	-208,4	-122,6
SU-DHL-8	-210,6	-37
SU-DHL-5	-233,8	-280,6
SET-2	-248,4	71,2
KG-1	-260	-20,3
Kasumi-1	-356,4	-241,2

7. Xử lý với protein chủ vận thụ thể TRAIL của SEQ ID NO:19 ức chế sự phát triển của khối u in vivo

Hiệu quả của protein chủ vận thụ thể TRAIL được tạo bởi hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19 đối với sự phát triển của khối u được đánh giá ở khối u ghép khác loại dưới da Colo205 (trực tràng), SKM-1 (bệnh bạch cầu cấp dòng tủy), và H460LM (phổi tế bào không nhỏ) được cấy ở chuột cái SCID (Charles Rivers Laboratories; Wilmington, MA). Một cách vắn tắt, các tế bào ung thư người được chủng dưới da vào sườn phía sau bên phải của chuột cái SCID vào ngày thử nghiệm thứ 0. Việc dùng protein chủ vận thụ thể TRAIL của SEQ ID NO:19 (0,3, 1, hoặc 3 mkd được phân liều IV, QDx5 hoặc IP, Q2Dx5 như đã nêu) được bắt đầu ở thời điểm khớp kích thước. Thể tích khối u được đo trong thời gian thử nghiệm đến khi thể tích khối u trung

bình trong mỗi nhóm đạt được điểm tới hạn $>2000 \text{ mm}^3$ cho Colo205 và SKM-1 hoặc $>2500 \text{ mm}^3$ cho H460LM. Các kết quả được thể hiện trong các Fig. 21-23. Việc dùng protein chủ vận thụ thể TRAIL được tạo bởi hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19 gây ra sự ức chế phát triển khối u đáng kể ở các mẫu khối u ghép khác loại Colo205, SKM-1, và H460LM.

Hiệu quả của protein chủ vận thụ thể TRAIL được tạo bởi hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19 đối với sự phát triển khối u cũng được đánh giá ở các mẫu ghép khác loại lấy từ bệnh nhân CTG-0069 (trực tràng), CTG-0167 (NSCLC), CTG-0293 (tụy), CTG-0714 (sacom), CTG-0136 (thực quản), CTG-485 (dạ dày), và CTG-0785 (sacom Ewing) được cấy ở chuột cái NSG (Champions Oncology; Hackensack, NJ). Một cách vắn tắt, các đoạn khối u được truyền dưới da đến vùng sườn sau bên phải của chuột cái NSG vào ngày thử nghiệm thứ 0. Việc dùng protein chủ vận thụ thể TRAIL được tạo bởi hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 (3 mkd được phân liều IP, Q2Dx5) được bắt đầu ở thời điểm khớp kích thước. Thể tích khối u được đo trong thời gian thử nghiệm đến khi thể tích khối u trung bình trong mỗi nhóm đạt được điểm tới hạn $>2000 \text{ mm}^3$ hoặc 60 ngày. Các kết quả được thể hiện trong các Fig. 24(A-G). Việc dùng protein chủ vận thụ thể TRAIL được tạo bởi hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 gây ra sự ức chế phát triển khối u đáng kể ở các mẫu PDX CTG-0069 (trực tràng), CTG-0167 (NSCLC), CTG-0293 (tuyến tụy), CTG-0714 (sacom), CTG-0136 (thực quản), CTG-485 (dạ dày), và CTG-0785 (sacom Ewing).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19.
2. Protein chủ vận thụ thể TRAIL chứa dime của hai polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19.
3. Protein chủ vận thụ thể TRAIL theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều gốc asparagin ở các vị trí 168 và 337 của polypeptit này được N-glycosyl hóa.
4. Protein chủ vận thụ thể TRAIL theo điểm 1, trong đó các gốc asparagin ở các vị trí 168 và 337 của polypeptit này đều được N-glycosyl hóa.
5. Protein chủ vận thụ thể TRAIL theo điểm 1, trong đó polypeptit này còn được biến đổi tiếp sau khi dịch mã.
6. Protein chủ vận thụ thể TRAIL theo điểm 5, trong đó sự biến đổi sau dịch mã bao gồm sự biến đổi của glutamin đầu N thành pyroglutamat.
7. Dược phẩm chứa protein chủ vận thụ thể TRAIL theo điểm 1 và một hoặc nhiều các chất mang, chất pha loãng, tá dược và/hoặc chất bổ trợ dược dụng.
8. Phân tử axit nucleic mã hóa protein chủ vận thụ thể TRAIL theo điểm 1.
9. Vectors biểu hiện chứa phân tử axit nucleic theo điểm 8.
10. Tế bào phân lập chứa phân tử axit nucleic theo điểm 8.
11. Tế bào theo điểm 10, trong đó tế bào này là tế bào nhân chuẩn.
12. Tế bào theo điểm 10, trong đó tế bào này là tế bào động vật có vú.
13. Tế bào theo điểm 10, trong đó tế bào này là tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc.
14. Protein chủ vận thụ thể TRAIL theo điểm 2, trong đó hai polypeptit này được liên kết đồng hóa trị thông qua ba liên kết disulfit liên chuỗi được tạo thành giữa các gốc xystein số 513, 519 và 522 của mỗi polypeptit.

15. Protein chủ vận thụ thể TRAIL theo điểm 14, trong đó một hoặc nhiều gốc asparagin ở các vị trí 168 và 337 của polypeptit này được N-glycosyl hóa.
16. Protein chủ vận thụ thể TRAIL theo điểm 15, trong đó các gốc asparagin ở các vị trí 168 và 337 của polypeptit này đều được N-glycosyl hóa.
17. Protein chủ vận thụ thể TRAIL theo điểm 15, trong đó một hoặc nhiều polypeptit này được biến đổi tiếp sau khi dịch mã.
18. Protein chủ vận thụ thể TRAIL theo điểm 17, trong đó sự biến đổi sau dịch mã bao gồm sự biến đổi của glutamin đầu N thành pyroglutamat.
19. Dược phẩm, trong đó dược phẩm này chứa protein chủ vận thụ thể TRAIL theo điểm 14 và một hoặc nhiều các chất mang, chất pha loãng, tá dược và/hoặc chất bổ trợ dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ABBVIE INC.

APOGENIX AG

<120> PROTEIN CHỦ VẬN THỤ THỂ TRAIL VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY

<130> 566215: BBI-999PC

<140> PCT/US2015/27270

<141> 2015-04-23

<150> 61/983,152

<151> 2014-04-23

<160> 31

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 281

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="TRAIL của người"

<400> 1

Met Ala Met Met Glu Val Gln Gly Gly Pro Ser Leu Gly Gln Thr Cys

1 5 10 15

Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala

20 25 30

Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys

35 40 45

Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr

50 55 60

Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val
 65 70 75 80
 Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser
 85 90 95
 Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
 100 105 110
 Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
 115 120 125
 Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
 130 135 140
 Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
 145 150 155 160
 His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
 165 170 175
 His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
 180 185 190
 Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
 195 200 205
 Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
 210 215 220
 Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
 225 230 235 240
 Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
 245 250 255
 Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
 260 265 270
 Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 275 280

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit liên kết tổng hợp"

<400> 2

Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser

1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit liên kết tổng hợp"

<400> 3

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit liên kết tổng hợp"

<400> 4

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit liên kết tổng hợp"

<400> 5

Gly Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit liên kết tổng hợp"

<400> 6

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit liên kết tổng hợp"

<400> 7

Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit liên kết tổng hợp"

<400> 8

Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit liên kết tổng hợp"

<400> 9

Gly Gly Asn Gly Ser Gly

1 5

<210> 10

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit khung Fc tổng hợp"

<400> 10

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

50 55 60

Glu Gln Tyr Ser Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

85 90 95

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

100 105 110

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

115 120 125

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

130 135 140

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

145 150 155 160

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

165 170 175
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 180 185 190
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 195 200 205
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215
 <210> 11
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit bản lẻ tổng hợp"
 <400> 11

Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Cys Asp Lys Thr
 1 5 10 15
 His Thr Cys Pro Pro Cys
 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tín hiệu tổng hợp"
 <400> 12
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Val Phe Val Leu Leu Val Trp Val Pro

1 5 10 15

Ala Gly Asn Gly

20

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit liên kết cầu nối strep-tag + serine"

<400> 13

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5 10 15

<210> 14

<211> 760

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit dung hợp chuỗi đơn tổng hợp"

<400> 14

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Val Phe Val Leu Leu Val Trp Val Pro

1 5 10 15

Ala Gly Asn Gly Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly

20 25 30

Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu

35 40 45

Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe
 50 55 60
 Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys
 65 70 75 80
 Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu
 85 90 95
 Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr
 100 105 110
 Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg
 115 120 125
 Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr
 130 135 140
 Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser
 145 150 155 160
 Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe
 165 170 175
 Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Val
 180 185 190
 Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp
 210 215 220
 Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg
 225 230 235 240
 Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser
 245 250 255
 Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn
 260 265 270

Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp
 275 280 285
 Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp
 290 295 300
 Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu
 305 310 315 320
 Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile
 325 330 335
 Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly
 340 345 350
 Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr
 355 360 365
 Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys
 370 375 380
 Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His
 385 390 395 400
 Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His
 405 410 415
 Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln
 420 425 430
 Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr
 435 440 445
 Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
 450 455 460
 Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser
 465 470 475 480
 Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe
 485 490 495

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

725

730

735

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

740

745

750

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

755

760

<210> 15

<211> 774

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit dung hợp chuỗi đơn tổng hợp"

<400> 15

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Val Phe Val Leu Leu Val Trp Val Pro

1

5

10

15

Ala Gly Asn Gly Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly

20

25

30

Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu

35

40

45

Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe

50

55

60

Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys

65

70

75

80

Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu

85

90

95

Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr

100

105

110

Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg
 115 120 125
 Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr
 130 135 140
 Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser
 145 150 155 160
 Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe
 165 170 175
 Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Val
 180 185 190
 Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp
 210 215 220
 Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg
 225 230 235 240
 Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser
 245 250 255
 Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn
 260 265 270
 Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp
 275 280 285
 Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp
 290 295 300
 Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu
 305 310 315 320
 Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile
 325 330 335

Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly
 340 345 350
 Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr
 355 360 365
 Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys
 370 375 380
 Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His
 385 390 395 400
 Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His
 405 410 415
 Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln
 420 425 430
 Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr
 435 440 445
 Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
 450 455 460
 Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser
 465 470 475 480
 Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe
 485 490 495
 Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser
 500 505 510
 Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser
 515 520 525
 Ser Ser Gly Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 530 535 540
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 545 550 555 560

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 565 570 575
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 580 585 590
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 595 600 605
 Tyr Ser Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 610 615 620
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 625 630 635 640
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 645 650 655
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 660 665 670
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 675 680 685
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 690 695 700
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 705 710 715 720
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 725 730 735
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 740 745 750
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser
 755 760 765
 His Pro Gln Phe Glu Lys
 770

<210> 16

<211> 2316

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: trình tự ADN polynucleotit tổng hợp mã hóa polypeptit dung hợp chuỗi đơn "

<400> 16

gatatcggta ccgccaccat ggaaaccgac accctgctgg tgttcgtgct gctcgtgtgg	60
gtgccagccg gcaatggaca gagagtggcc gctcatatca ccggcaccgc gggcagatct	120
aacaccctgt ccagcccca ctccaagaac gagaaggccc tgggccggaa gatcaactcc	180
tgggagtcct ccagatccgc cactccttt ctgtccaacc tgcacctgag aaacggcgag	240
ctgggtcatcc acgagaaggg cttctactac atctactccc agacctactt caggtttcag	300
gaagagatca aagagaacac aaagaacgac aagcagatgg tgcagtatat ctacaagtac	360
acctcctacc ccgaccccat cctgctgatg aagtccgccc ggaactcctg ctgggtccaag	420
gatgctgagt acggcctgta cagcatctac cagggcggca tcttcgagct gaaagagaac	480
gaccggatct tcgtgtccgt gaccaacgag cacctgatcg acatggacca cgaggccagc	540
tttttcggcg cttttctcgt gggcggtacc ggaagcggaa acggcagtag agtggctgcc	600
cacattaccg gaaccagagg ccggtccaac accctgagca gccctaacag caaaaatgag	660
aaagctctcg ggcgcaagat caacagctgg gaatctagca gaagcggcca cagctttctg	720
agcaatctgc atctgcggaa cggcgaactc gtgattcatg agaaggggtt ttattatatc	780
tatagccaga catactttcg attccaggag gaaatcaagg aaaacaccaa aaatgataaa	840
cagatgggac agtacattta taagtatacc agctaccctg atcctatcct cctcatgaag	900
tctgccagaa actcttggtg gagcaaggac gccgagtatg gactgtactc tatctatcag	960
gggggggatct ttgaactcaa agaaaacgat cgcattcttg tcagcgtcac caatgagcat	1020
ctcattgata tggatcatga agctagtttc ttcggggcat tcctcgtggg aggtccggc	1080
tctggcaacg gatctagagt cggcgacac atcacaggga ccagaggcag aagcaatacc	1140
ctgtcctccc caaatagtaa aaacgaaaag gcaactcggc gcaaaattaa ttcctgggag	1200

agcagcagat ccgggcacag ttttctgtct aatctccatc tgaggaatgg ggagctggtg 1260
 attcacgaaa aaggatttta ctacatttac agtcagactt acttttcgttt tcaggaagag 1320
 attaaggaaa ataccaaaaa cgacaagcag atggtccagt acatctataa atacacctct 1380
 tatcctgacc caattctgct catgaagagt gcccgcaaca gctgctggtc taaagacgcc 1440
 gaatacgggc tgtattccat ttaccagggg ggaatttttg agctgaagga aaatgatcgg 1500
 atttttgtct ctgtcacaaa cgaacacctc atcgatatgg atcacgaagc ctctttcttt 1560
 ggcgccttcc tggtcggagg cctgggctcg agttccagct cctcttcttg ctctgcgac 1620
 aagaccacaca cctgtcccc ttgtcctgcc cctgaactgc tgggcggacc ttccgtgttc 1680
 ctgttcccc caaagcccaa ggacaccctg atgatctccc ggacccccga agtgacctgc 1740
 gtggtggtgg atgtgtctca cgaggaccct gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc 1800
 gtggaagtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggaac agtactcctc cacctaccgg 1860
 gtggtgtctg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaaaga gtacaagtgc 1920
 aaggtgtcca acaaggccct gcctgcccc atcgaaaaga ccatctcaa ggccaagggc 1980
 cagccccggg aaccccaggt gtacacactg cccctagcc gggaagagat gaccaagaac 2040
 caggtgtccc tgacctgcct ggtcaagggc ttttaccct ccgacattgc cgtggaatgg 2100
 gagtccaacg gccagcctga gaacaactac aagaccaccc cccctgtgct ggactccgac 2160
 ggctcattct tcctgtactc caagctgaca gtggacaagt cccggtggca gcagggaac 2220
 gtgttctcct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccttg 2280
 tccctgagcc ccggcaaatg atagaagctt gatatc 2316

<210> 17

<211> 217

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit mutein Fc người tổng hợp "

<400> 17

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 18

<211> 759

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 18

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Val Phe Val Leu Leu Val Trp Val Pro

1 5 10 15

Ala Gly Asn Gly Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly

20 25 30

Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu

35 40 45

Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe

50 55 60

Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys

65 70 75 80

Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu

85 90 95

Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr

100 105 110

Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg

115 120 125

Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr

130 135 140

Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser

145 150 155 160

Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe

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

```

370              375              380
Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His
385              390              395              400
Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His
              405              410              415
Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln
              420              425              430
Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr
              435              440              445
Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
              450              455              460
Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser
465              470              475              480
Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe
              485              490              495
Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser
              500              505              510
Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser
              515              520              525
Ser Ser Gly Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
              530              535              540
Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
545              550              555              560
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
              565              570              575
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
              580              585              590
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

```

595 600 605
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 610 615 620
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 625 630 635 640
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 645 650 655
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 660 665 670
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 675 680 685
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 690 695 700
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 705 710 715 720
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 725 730 735
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 740 745 750
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

755

<210> 19

<211> 740

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 19

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

210	215	220	
Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe			
225	230	235	240
Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met			
	245	250	255
Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu			
	260	265	270
Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly			
	275	280	285
Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp			
	290	295	300
Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His			
305	310	315	320
Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Ser Gly			
	325	330	335
Asn Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser			
	340	345	350
Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg			
	355	360	365
Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser			
	370	375	380
Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe			
385	390	395	400
Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys			
	405	410	415
Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr			
	420	425	430
Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser			

435	440	445
Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly		
450	455	460
Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr		
465	470	475
Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala		
485	490	495
Phe Leu Val Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser		
500	505	510
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
515	520	525
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
530	535	540
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
545	550	555
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
565	570	575
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Thr		
580	585	590
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
595	600	605
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
610	615	620
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
625	630	635
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
645	650	655
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		

660 665 670
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 675 680 685
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 690 695 700
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 705 710 715 720
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 725 730 735
 Ser Pro Gly Lys
 740
 <210> 20
 <211> 754
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"
 <400> 20
 Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile
 20 25 30
 Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu
 35 40 45
 His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr
 50 55 60
 Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn

65		70		75		80									
Thr	Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Met	Val	Gln	Tyr	Ile	Tyr	Lys	Tyr	Thr	Ser
		85				90							95		
Tyr	Pro	Asp	Pro	Ile	Leu	Leu	Met	Lys	Ser	Ala	Arg	Asn	Ser	Cys	Trp
		100				105							110		
Ser	Lys	Asp	Ala	Glu	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Ser	Ile	Tyr	Gln	Gly	Gly	Ile
		115				120							125		
Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Asp	Arg	Ile	Phe	Val	Ser	Val	Thr	Asn	Glu
		130				135							140		
His	Leu	Ile	Asp	Met	Asp	His	Glu	Ala	Ser	Phe	Phe	Gly	Ala	Phe	Leu
145					150					155					160
Val	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Arg	Val	Ala	Ala	His	Ile
			165						170					175	
Thr	Gly	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Asn	Thr	Leu	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Lys
			180						185					190	
Asn	Glu	Lys	Ala	Leu	Gly	Arg	Lys	Ile	Asn	Ser	Trp	Glu	Ser	Ser	Arg
		195							200					205	
Ser	Gly	His	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Leu	His	Leu	Arg	Asn	Gly	Glu	Leu
		210							215					220	
Val	Ile	His	Glu	Lys	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Gln	Thr	Tyr	Phe
225					230					235					240
Arg	Phe	Gln	Glu	Glu	Ile	Lys	Glu	Asn	Thr	Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Met
			245						250					255	
Val	Gln	Tyr	Ile	Tyr	Lys	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Pro	Ile	Leu	Leu
			260						265					270	
Met	Lys	Ser	Ala	Arg	Asn	Ser	Cys	Trp	Ser	Lys	Asp	Ala	Glu	Tyr	Gly
		275							280					285	
Leu	Tyr	Ser	Ile	Tyr	Gln	Gly	Gly	Ile	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Asp

290	295	300
Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His		
305	310	315
Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Ser Gly		
325	330	335
Asn Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser		
340	345	350
Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg		
355	360	365
Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser		
370	375	380
Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe		
385	390	395
Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys		
405	410	415
Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr		
420	425	430
Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser		
435	440	445
Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly		
450	455	460
Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr		
465	470	475
Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala		
485	490	495
Phe Leu Val Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser		
500	505	510
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		

515	520	525
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
530	535	540
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
545	550	555
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
565	570	575
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Thr		
580	585	590
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
595	600	605
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
610	615	620
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
625	630	635
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
645	650	655
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
660	665	670
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
675	680	685
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
690	695	700
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
705	710	715
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
725	730	735
Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe		

740 745 750 Glu
 Lys
 <210> 21
 <211> 739
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"
 <400> 21
 Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile
 20 25 30
 Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu
 35 40 45
 His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr
 50 55 60
 Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn
 65 70 75 80
 Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser
 85 90 95
 Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp
 100 105 110
 Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile
 115 120 125
 Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu
 130 135 140

His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu
 145 150 155 160
 Val Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile
 165 170 175
 Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys
 180 185 190
 Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg
 195 200 205
 Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu
 210 215 220
 Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe
 225 230 235 240
 Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met
 245 250 255
 Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu
 260 265 270
 Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp
 290 295 300
 Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His
 305 310 315 320
 Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Ser Gly
 325 330 335
 Asn Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser
 340 345 350
 Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg
 355 360 365

Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser
 370 375 380
 Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe
 385 390 395 400
 Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys
 405 410 415
 Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr
 420 425 430
 Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser
 435 440 445
 Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly
 450 455 460
 Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr
 465 470 475 480
 Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala
 485 490 495
 Phe Leu Val Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser
 500 505 510
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
 515 520 525
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 530 535 540
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 545 550 555 560
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 565 570 575
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 580 585 590

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

595

600

605

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile

610

615

620

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

625

630

635

640

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

645

650

655

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

660

665

670

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

675

680

685

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

690

695

700

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

705

710

715

720

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

725

730

735

Pro Gly Lys

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 22

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1

5

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 23

Gly Ser Gly Ser

1

<210> 24

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 24

Gly Ser Gly

1

<210> 25

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 25

Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Cys Asp Lys Thr His

1 5 10 15

Thr Cys Pro Pro Cys

20

<210> 26

<211> 751

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 26

Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr

1 5 10 15

Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile

20 25 30

Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu

35 40 45

His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr

50 55 60

Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn

65 70 75 80

Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser

85 90 95

Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp

100 105 110

Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile

115	120	125
Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu		
130	135	140
His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu		
145	150	155
Val Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile		
165	170	175
Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys		
180	185	190
Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg		
195	200	205
Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu		
210	215	220
Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe		
225	230	235
Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met		
245	250	255
Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu		
260	265	270
Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly		
275	280	285
Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp		
290	295	300
Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His		
305	310	315
Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Ser Gly		
325	330	335
Asn Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser		

340	345	350
Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg		
355	360	365
Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser		
370	375	380
Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe		
385	390	395
Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys		
405	410	415
Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr		
420	425	430
Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser		
435	440	445
Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly		
450	455	460
Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr		
465	470	475
Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala		
485	490	495
Phe Leu Val Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Asp		
500	505	510
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro		
515	520	525
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
530	535	540
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		

545		550		555		560									
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
				565					570					575	
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
				580					585					590	
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
				595					600					605	
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys
				610					615					620	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
				625					630					635	
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
				645					650					655	
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
				660					665					670	
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
				675					680					685	
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
				690					695					700	
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
				705					710					715	
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
				725					730					735	
Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	Glu	Lys
				740					745					750	

<210> 27

<211> 750

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 27

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

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

370	375	380	
Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr			
385	390	395	400
Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys			
	405	410	415
Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro			
	420	425	430
Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys			
	435	440	445
Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu			
	450	455	460
Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu			
465	470	475	480
Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly			
	485	490	495
Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Cys Asp Lys Thr			
	500	505	510
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
	515	520	525
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
	530	535	540
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
545	550	555	560
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
	565	570	575
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Thr Tyr Arg Val Val			
	580	585	590
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			

595 600 605
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 610 615 620
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 625 630 635 640
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 645 650 655
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 660 665 670
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 675 680 685
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 690 695 700
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 705 710 715 720
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ser
 725 730 735
 Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 740 745 750
 <210> 28
 <211> 750
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Nguồn
 <223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"
 <400> 28
 Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr

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

225 230 235 240
 Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
 245 250 255
 Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
 260 265 270
 Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
 275 280 285
 Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
 290 295 300
 Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
 305 310 315 320
 Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg
 325 330 335
 Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser
 340 345 350
 Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser
 355 360 365
 Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu
 370 375 380
 Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr
 385 390 395 400
 Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys
 405 410 415
 Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro
 420 425 430
 Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys
 435 440 445
 Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu

450 455 460
 Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu
 465 470 475 480
 Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 485 490 495
 Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Cys Asp Lys Thr
 500 505 510
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 515 520 525
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 530 535 540
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 545 550 555 560
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 565 570 575
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Thr Tyr Arg Val Val
 580 585 590
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 595 600 605
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 610 615 620
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 625 630 635 640
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 645 650 655
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 660 665 670
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

675 680 685
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 690 695 700
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 705 710 715 720
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ser
 725 730 735
 Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 740 745 750 <210>

29

<211> 736

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 29

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

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

305	310	315	320
Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Ser Arg			
	325	330	335
Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser			
	340	345	350
Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser			
	355	360	365
Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu			
	370	375	380
Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr			
385	390	395	400
Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys			
	405	410	415
Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro			
	420	425	430
Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys			
	435	440	445
Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu			
	450	455	460
Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu			
465	470	475	480
Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly			
	485	490	495
Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Cys Asp Lys Thr			
	500	505	510
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
	515	520	525
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			

```

      530              535              540
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
545              550              555              560
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
      565              570              575
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Thr Tyr Arg Val Val
      580              585              590
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
      595              600              605
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
      610              615              620
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
625              630              635              640
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
      645              650              655
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
      660              665              670
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
      675              680              685
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
      690              695              700
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
705              710              715              720
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      725              730              735

<210> 30
<211> 736
<212> PRT

```

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 30

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

	180		185		190
Lys	Ala	Leu	Gly	Arg	Lys
		Ile	Asn	Ser	Trp
			Glu	Ser	Ser
			Arg	Ser	Gly
	195		200		205
His	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn
		Leu	His	Leu	Arg
			Asn	Gly	Glu
			Leu	Val	Ile
	210		215		220
His	Glu	Lys	Gly	Phe	Tyr
		Tyr	Ile	Tyr	Ser
			Gln	Thr	Tyr
			Phe	Arg	Phe
225		230		235	240
Gln	Glu	Glu	Ile	Lys	Glu
		Asn	Thr	Lys	Asn
			Asp	Lys	Gln
			Met	Val	Gln
	245		250		255
Tyr	Ile	Tyr	Lys	Tyr	Thr
		Ser	Tyr	Pro	Asp
			Pro	Ile	Leu
			Leu	Met	Lys
	260		265		270
Ser	Ala	Arg	Asn	Ser	Cys
		Trp	Ser	Lys	Asp
			Ala	Glu	Tyr
			Gly	Leu	Tyr
	275		280		285
Ser	Ile	Tyr	Gln	Gly	Gly
		Ile	Phe	Glu	Leu
			Lys	Glu	Asn
			Asp	Arg	Ile
	290		295		300
Phe	Val	Ser	Val	Thr	Asn
		Glu	His	Leu	Ile
			Asp	Met	Asp
			His	Glu	Ala
305		310		315	320
Ser	Phe	Phe	Gly	Ala	Phe
		Leu	Val	Gly	Gly
			Ser	Gly	Ser
			Gly	Ser	Arg
	325		330		335
Val	Ala	Ala	His	Ile	Thr
		Gly	Thr	Arg	Gly
			Arg	Ser	Asn
			Thr	Leu	Ser
	340		345		350
Ser	Pro	Asn	Ser	Lys	Asn
		Glu	Lys	Ala	Leu
			Gly	Arg	Lys
			Ile	Asn	Ser
	355		360		365
Trp	Glu	Ser	Ser	Arg	Ser
		Gly	His	Ser	Phe
			Leu	Ser	Asn
			Leu	His	Leu
	370		375		380
Arg	Asn	Gly	Glu	Leu	Val
		Ile	His	Glu	Lys
			Gly	Phe	Tyr
			Tyr	Ile	Tyr
385		390		395	400
Ser	Gln	Thr	Tyr	Phe	Arg
		Phe	Gln	Glu	Glu
			Ile	Lys	Glu
			Asn	Thr	Lys

405	410	415
Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro		
420	425	430
Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys		
435	440	445
Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu		
450	455	460
Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu		
465	470	475
Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly		
485	490	495
Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Cys Asp Lys Thr		
500	505	510
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
515	520	525
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
530	535	540
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
545	550	555
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
565	570	575
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Thr Tyr Arg Val Val		
580	585	590
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
595	600	605
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
610	615	620
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		

625 630 635 640
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 645 650 655
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 660 665 670
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 675 680 685
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 690 695 700
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 705 710 715 720
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 725 730 735

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 31

Asp Glu Val Asp

1

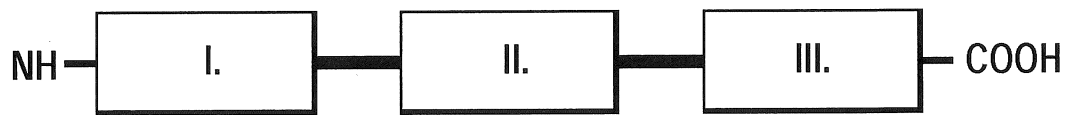
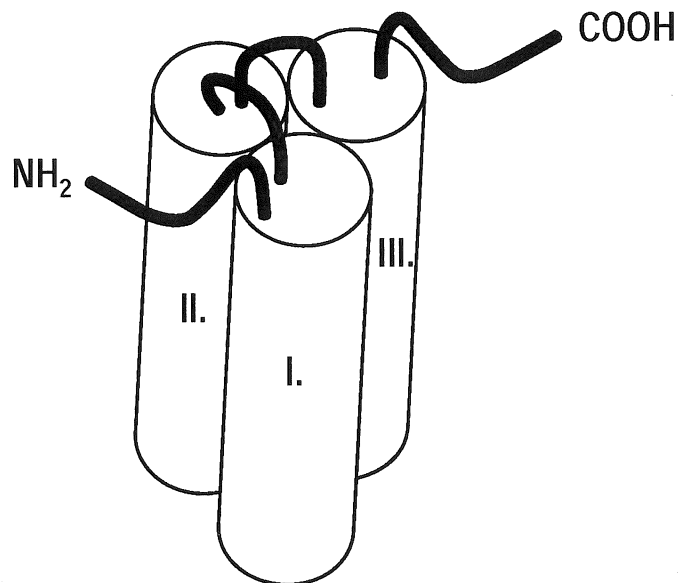
Fig. 1**A.****B.**

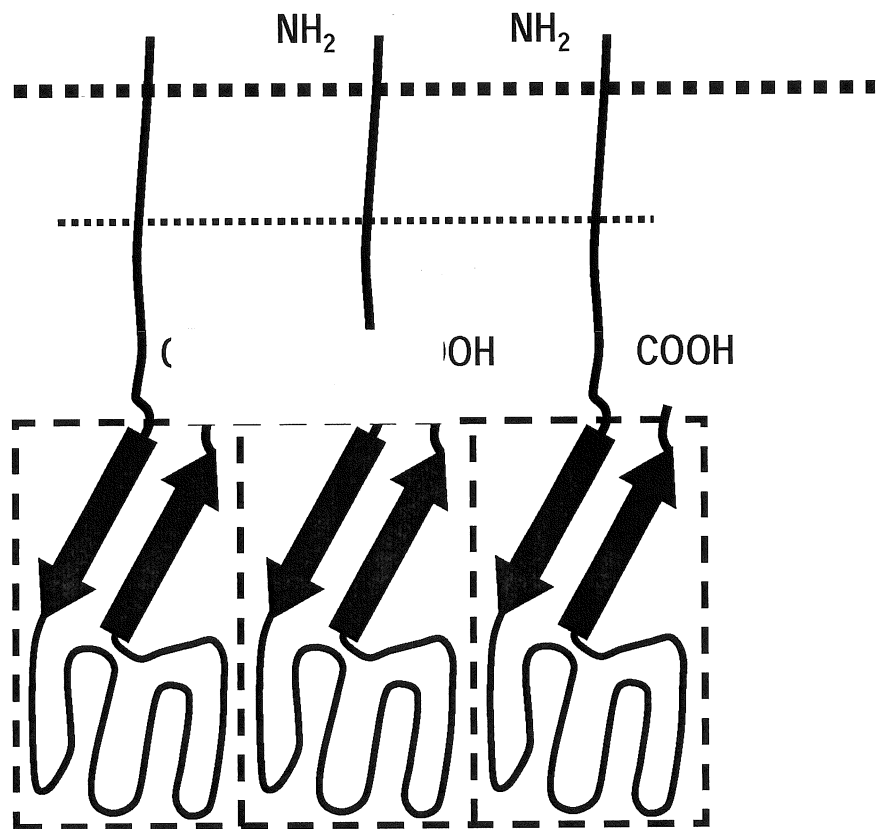
Fig. 2

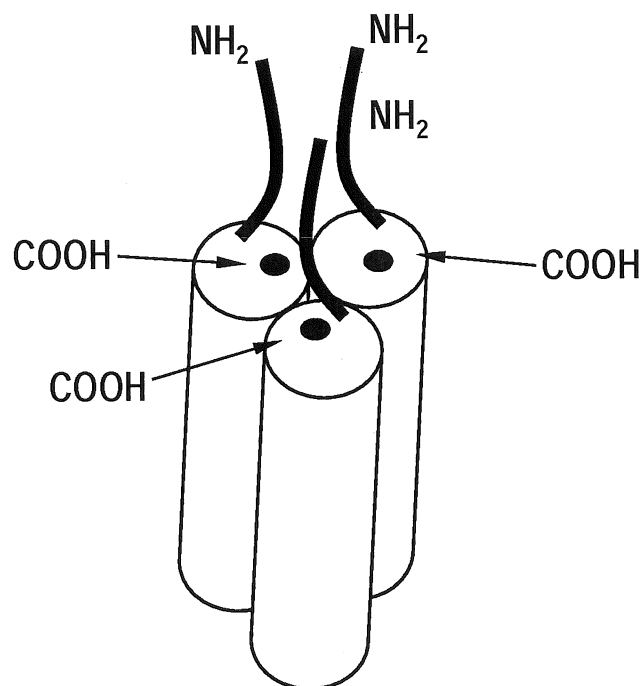
Fig. 3

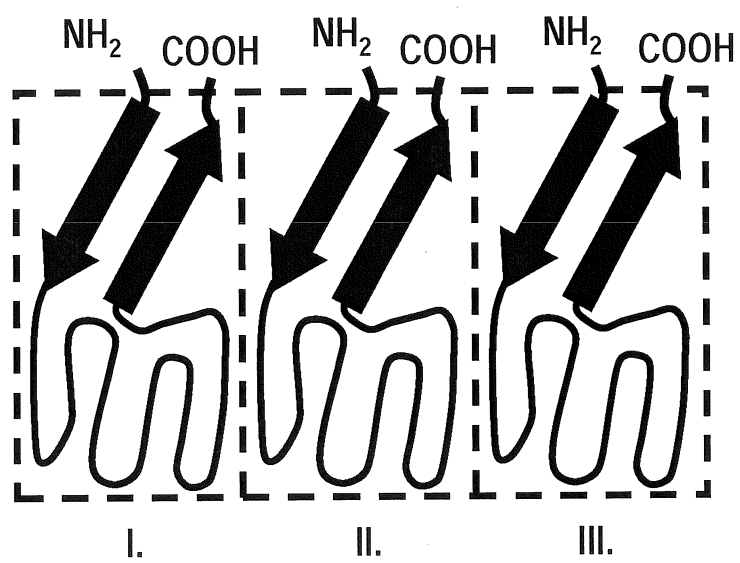
Fig. 4

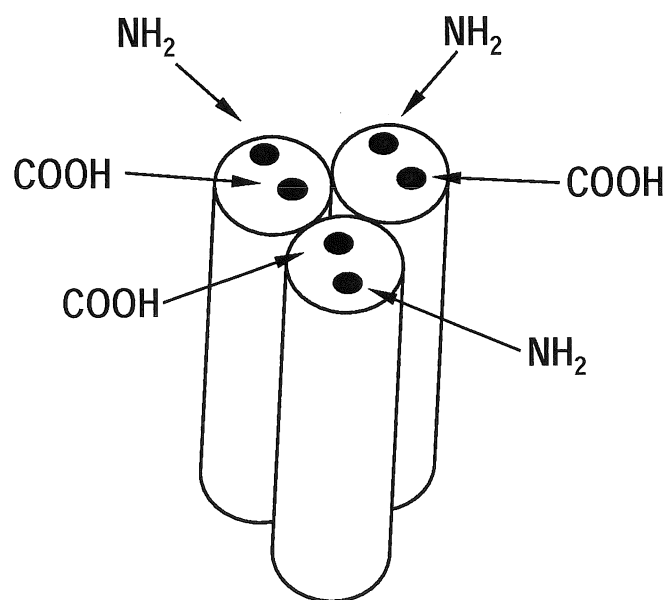
Fig. 5

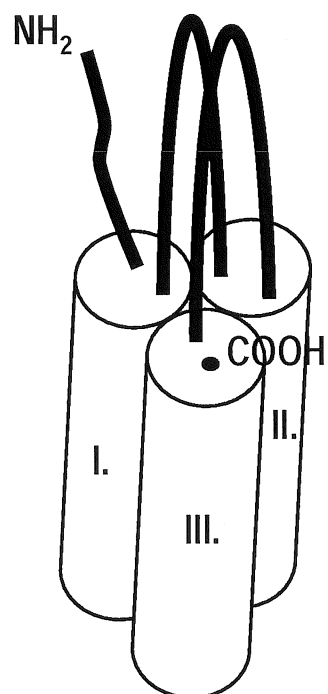
Fig. 6

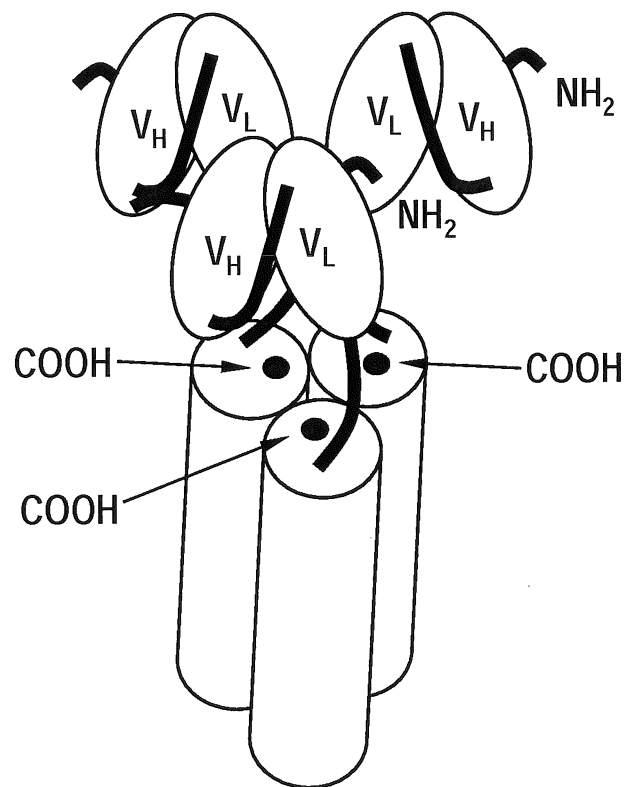
Fig. 7

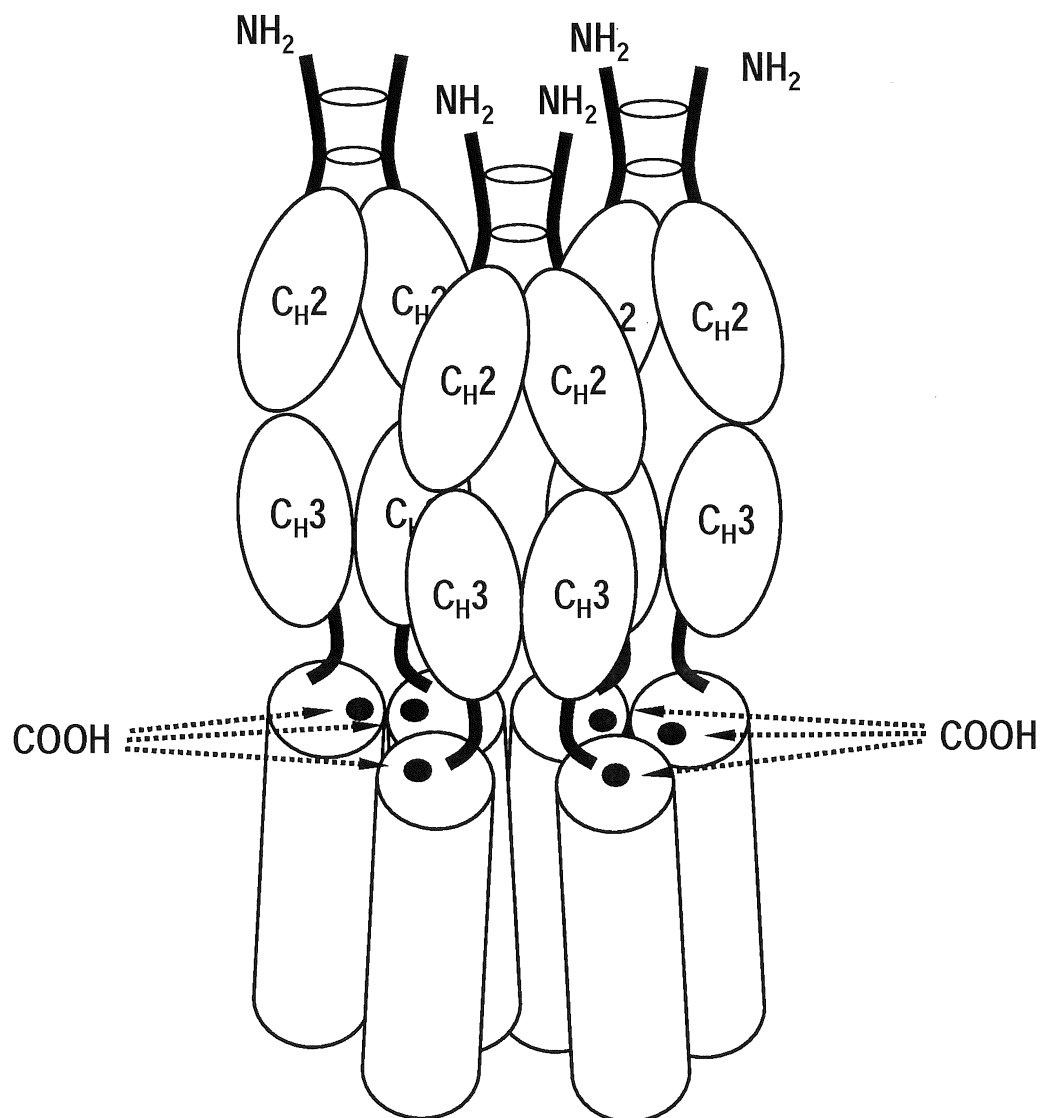
Fig. 8

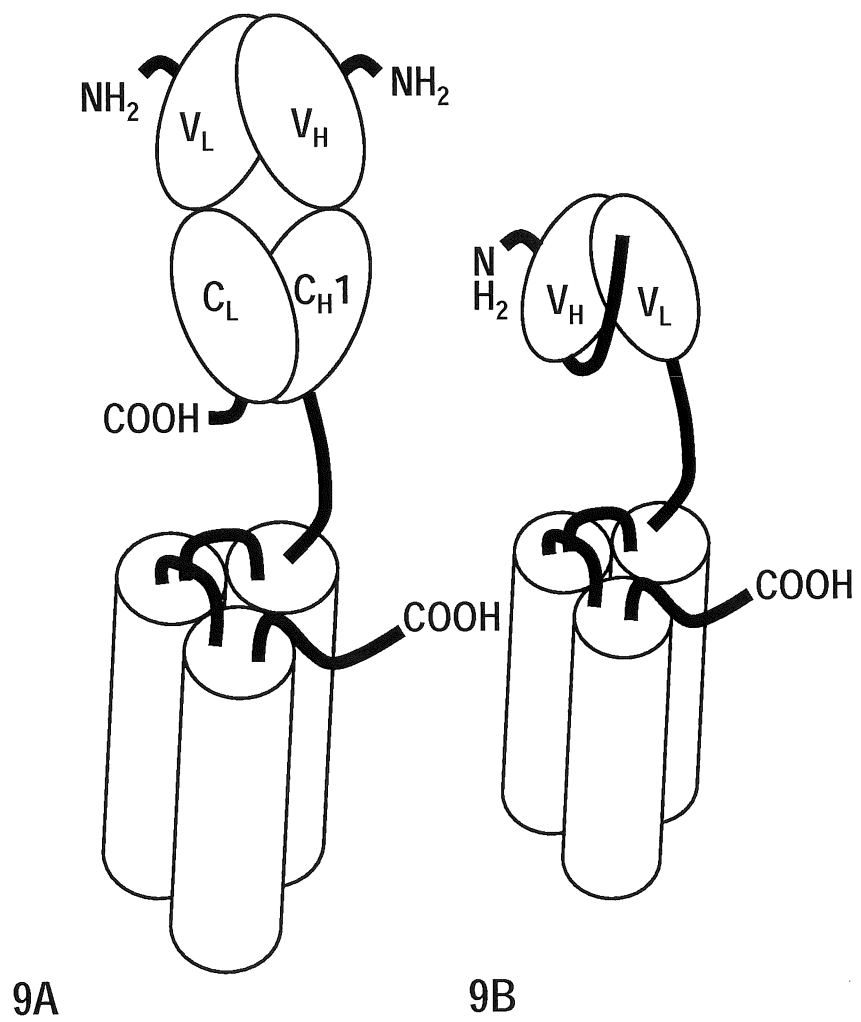
Fig. 9

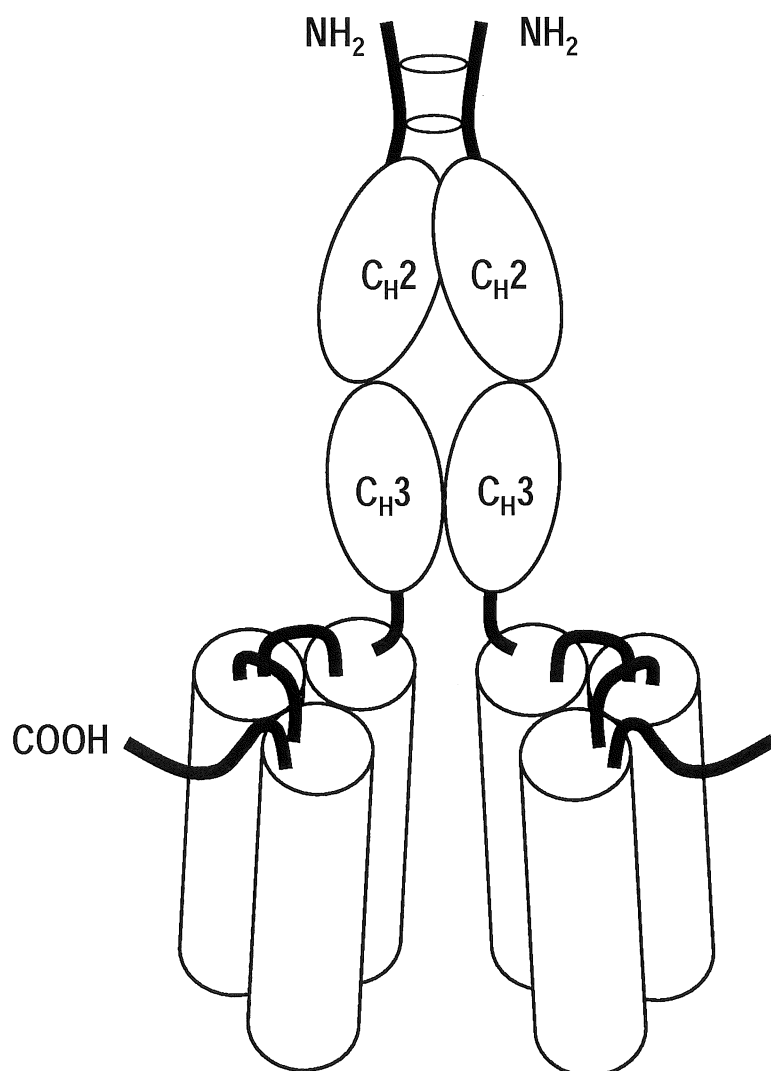
Fig. 10

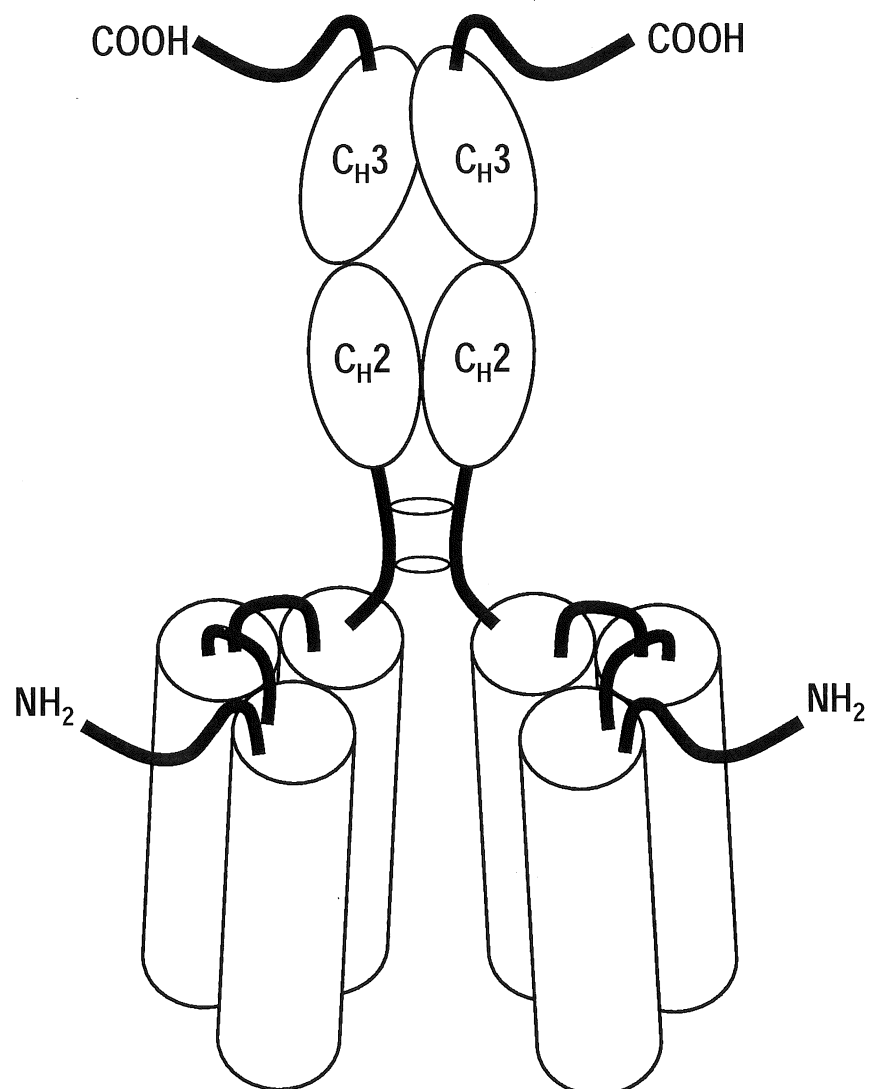
Fig. 11

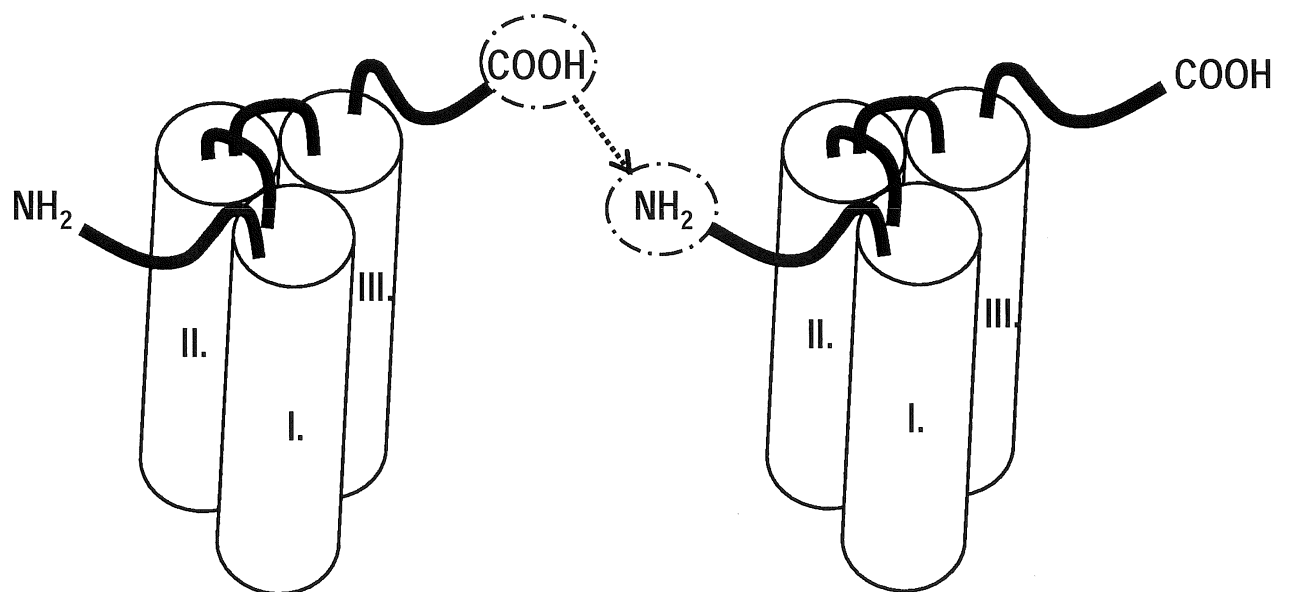
Fig. 12

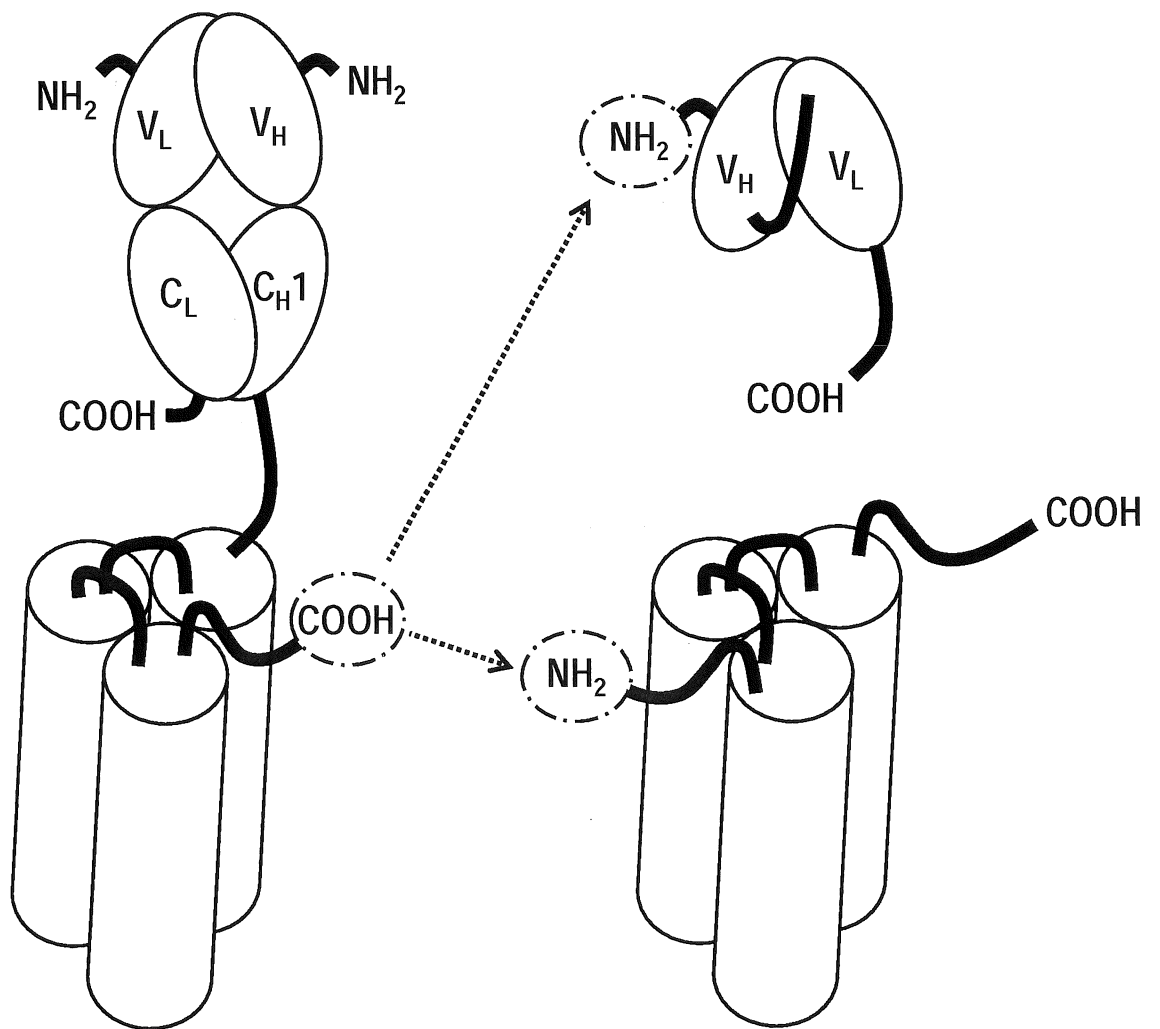
Fig. 13

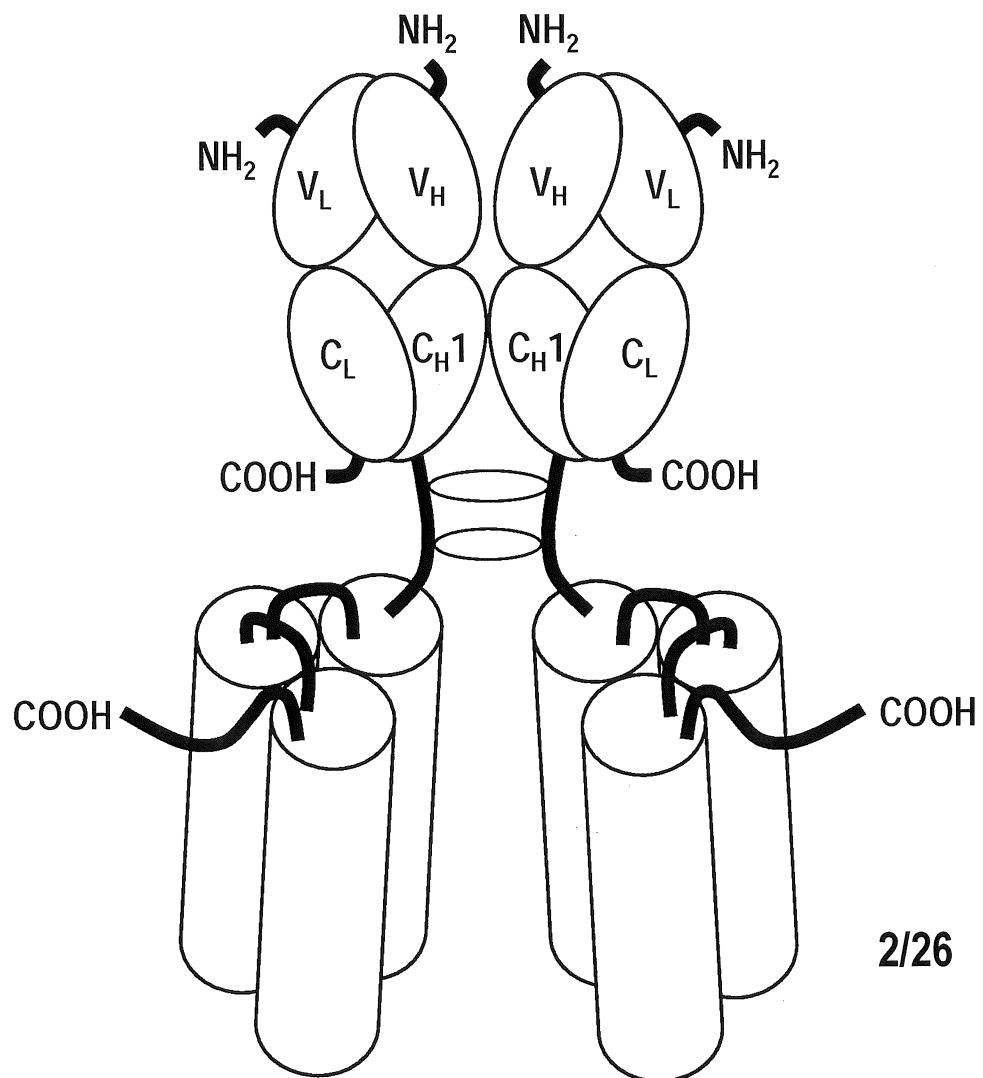
Fig. 14

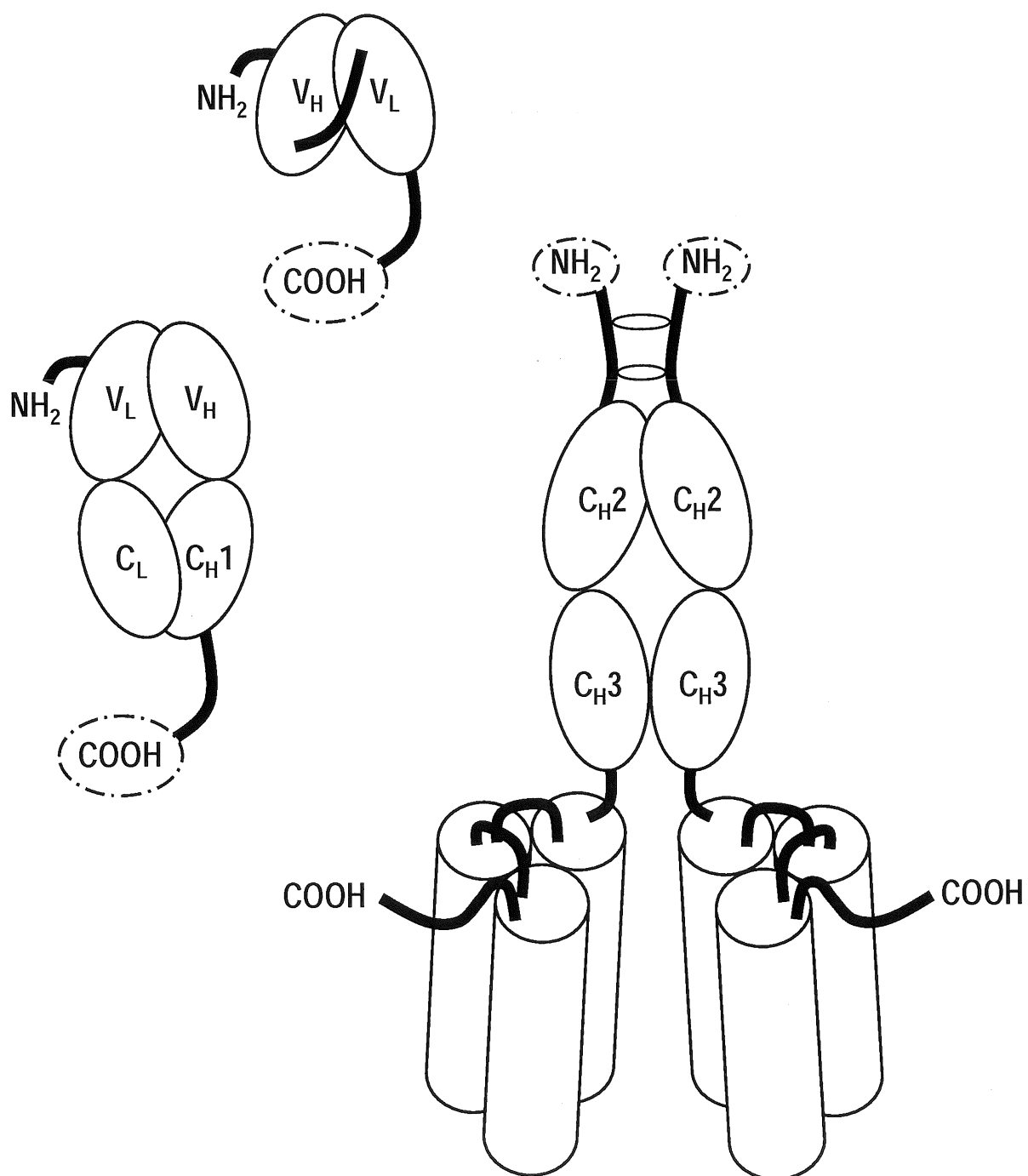
Fig. 15

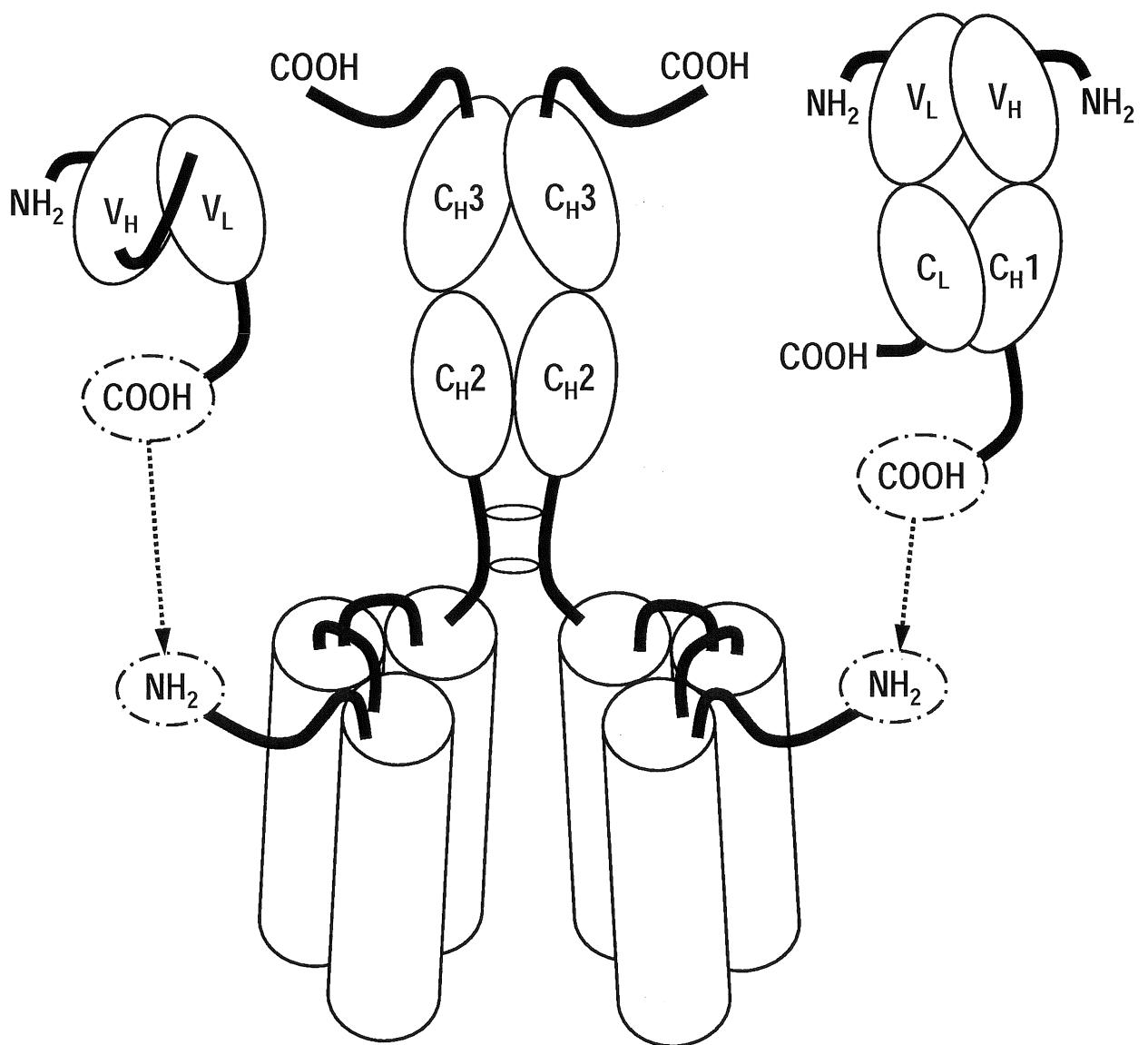
Fig. 16

Fig. 17A

Peptit tín hiệu được thể hiện trong phần chữ gạch chân và in đậm (không có mặt trong protein trưởng thành):
SEQ ID NO: 12

Các modun monome vùng liên kết thụ thể TRAIL trong phần chữ thường: aa 120-281 và 121-281 của SEQ ID

NO:1, một cách tương ứng các phần tử liên kết giữa các monome TRAIL trong phần chữ in đậm: **SEQ ID NO:2**

Vùng Fc của IgG1 người trong *phần chữ được gạch chân và in nghiêng* : *SEQ ID NO: 10*

Phần tử liên kết bản lề giữa scTRAIL -RBD và Fc được thể hiện trong *phần chữ được in đậm và nghiêng*: *SEQ ID*

NO: 11

METDTLLVFVLLVWVPAGNGQQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGH
 SFLSNLHLRNGELV~~HEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYDPDILLM~~
 KSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLV**GS**GS
NGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHE
 KGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYDPDILLMKSARNSCWSKDAEYGLY
 SIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLV**GS**GS**NG**SRVAAHITGTRGRS
 NTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELV~~HEKGFYIYSQTYFRFQEE~~
 IKENTKNDKQMVQYIYKYTSYDPDILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIF
 VSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLV**GP****GSSSSSSSGSCDKTHTCPP****C**PAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLT
VLHQLWLNQKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK*

Fig. 17B

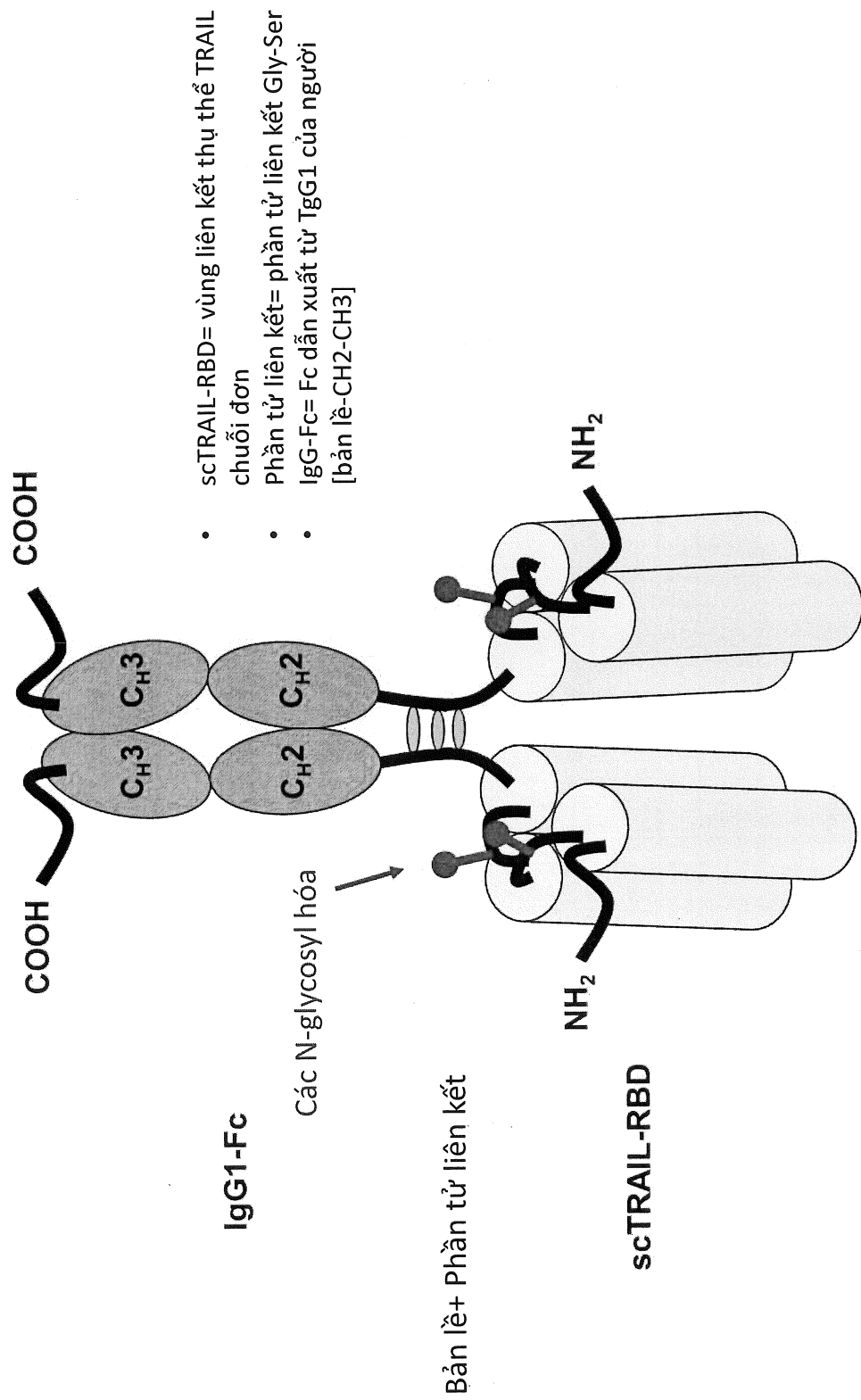


Fig. 18

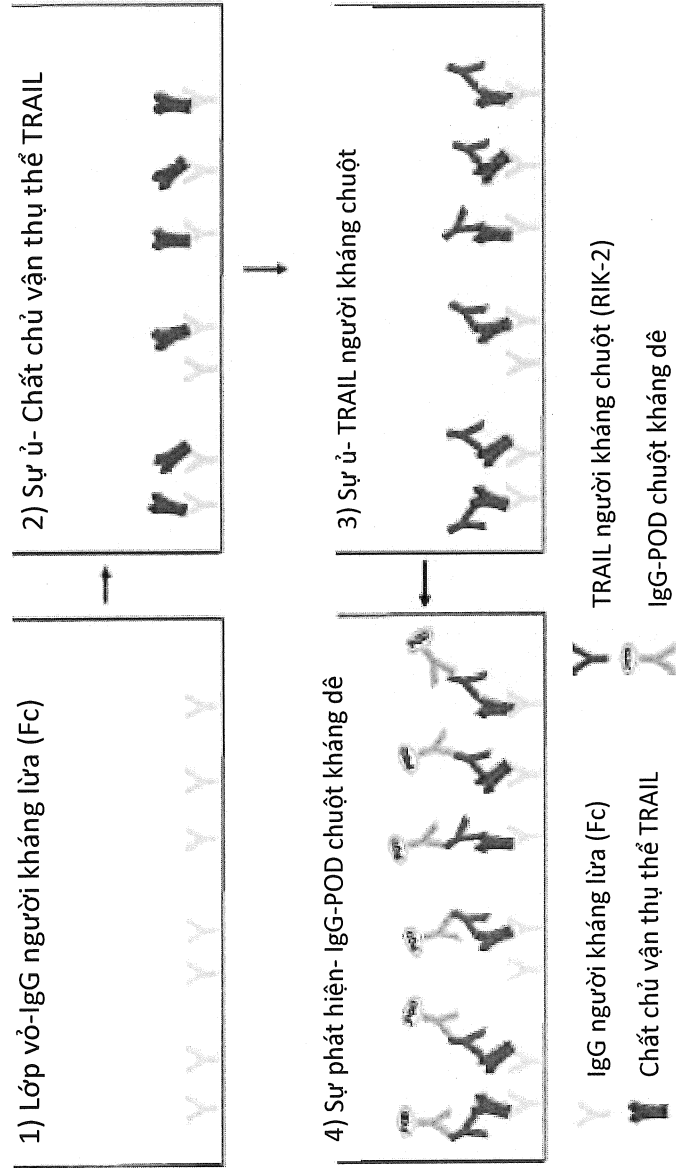


Fig. 19

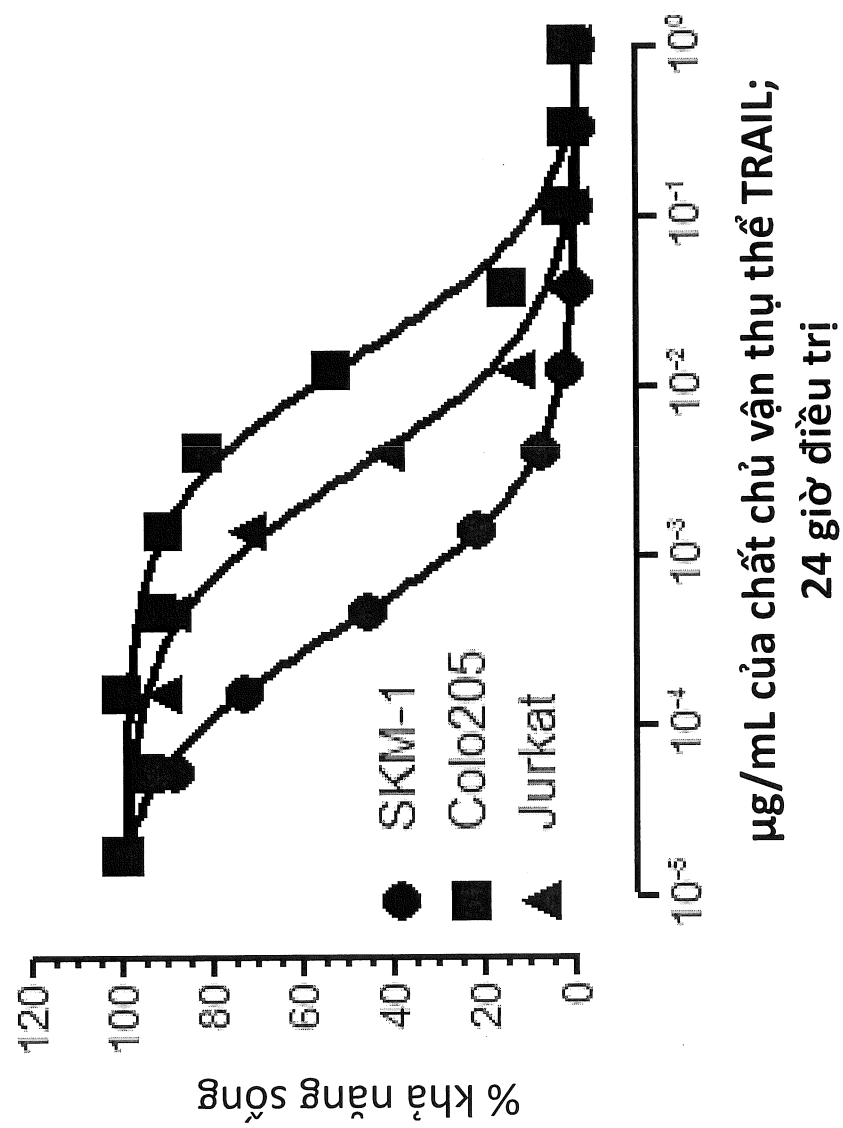


Fig. 20

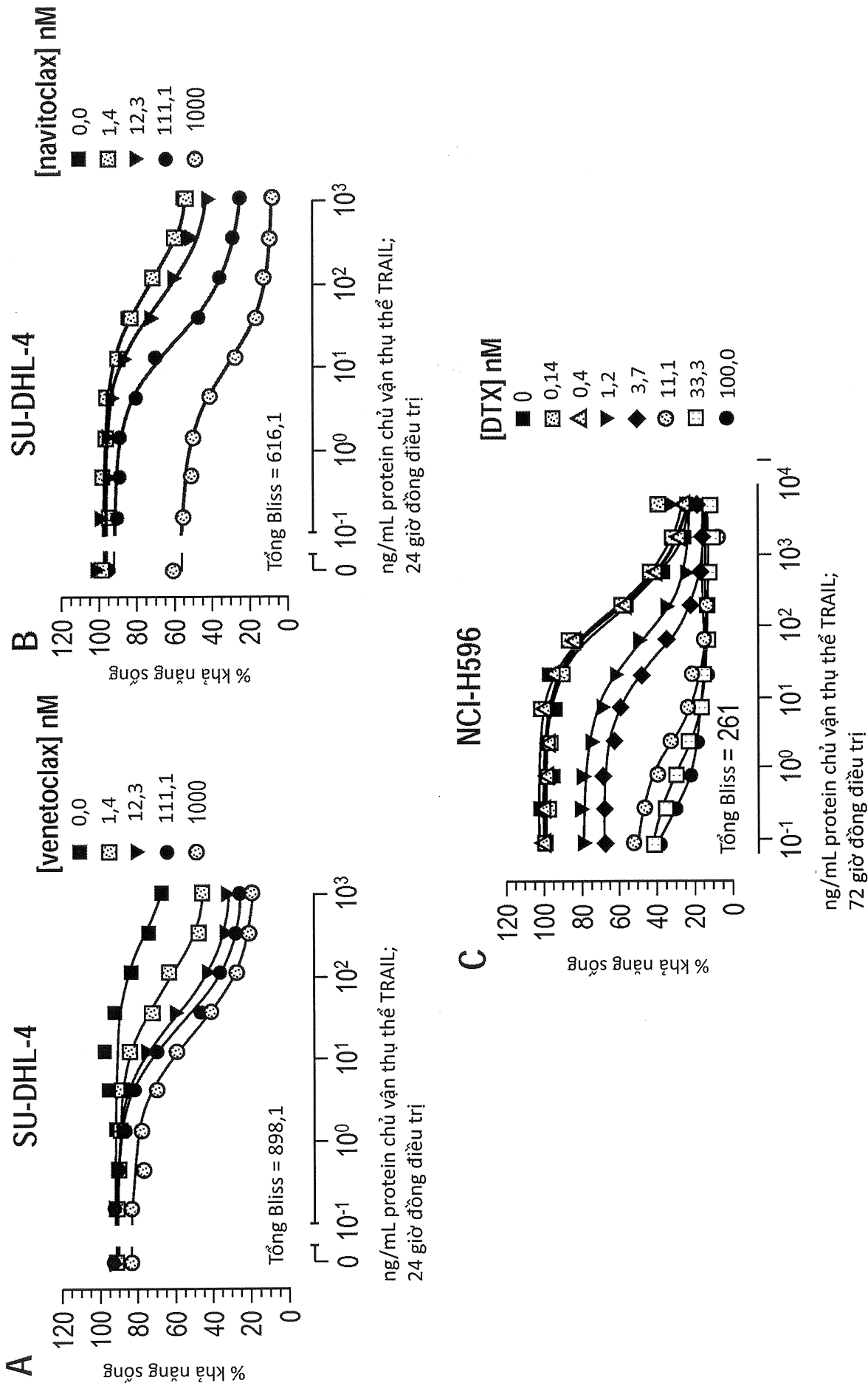
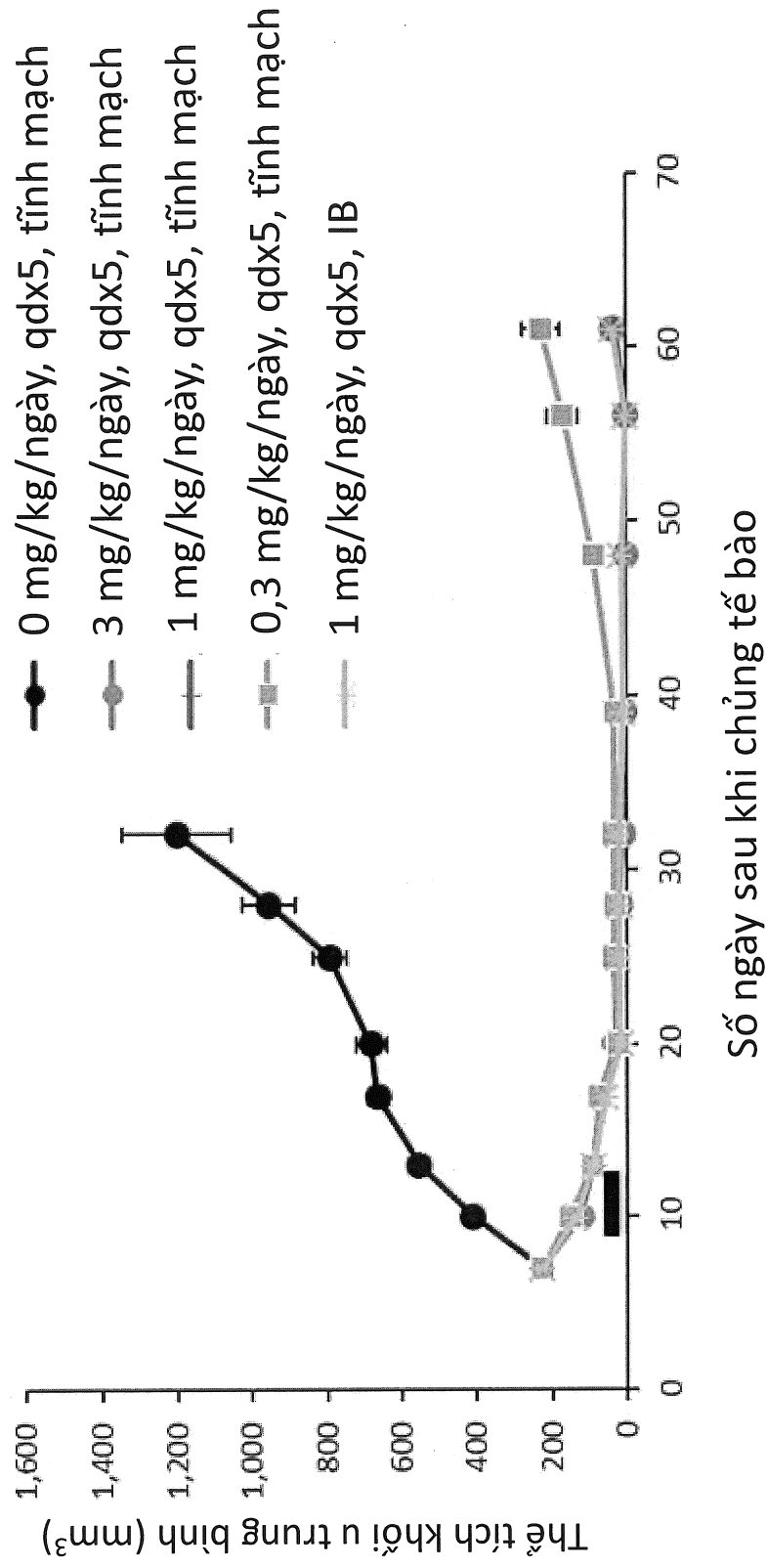


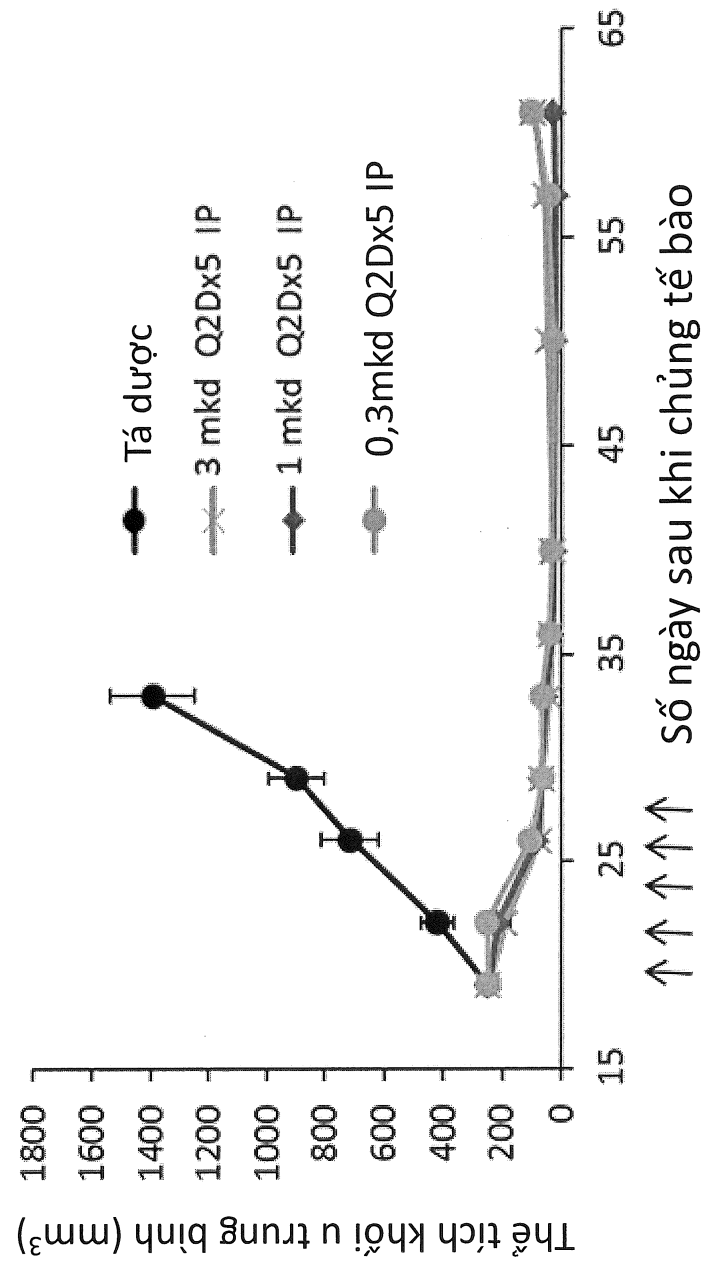
Fig. 21

Các chế độ điều trị được thể hiện đề cập đến
lượng protein chủ vận thụ thể TRAIL



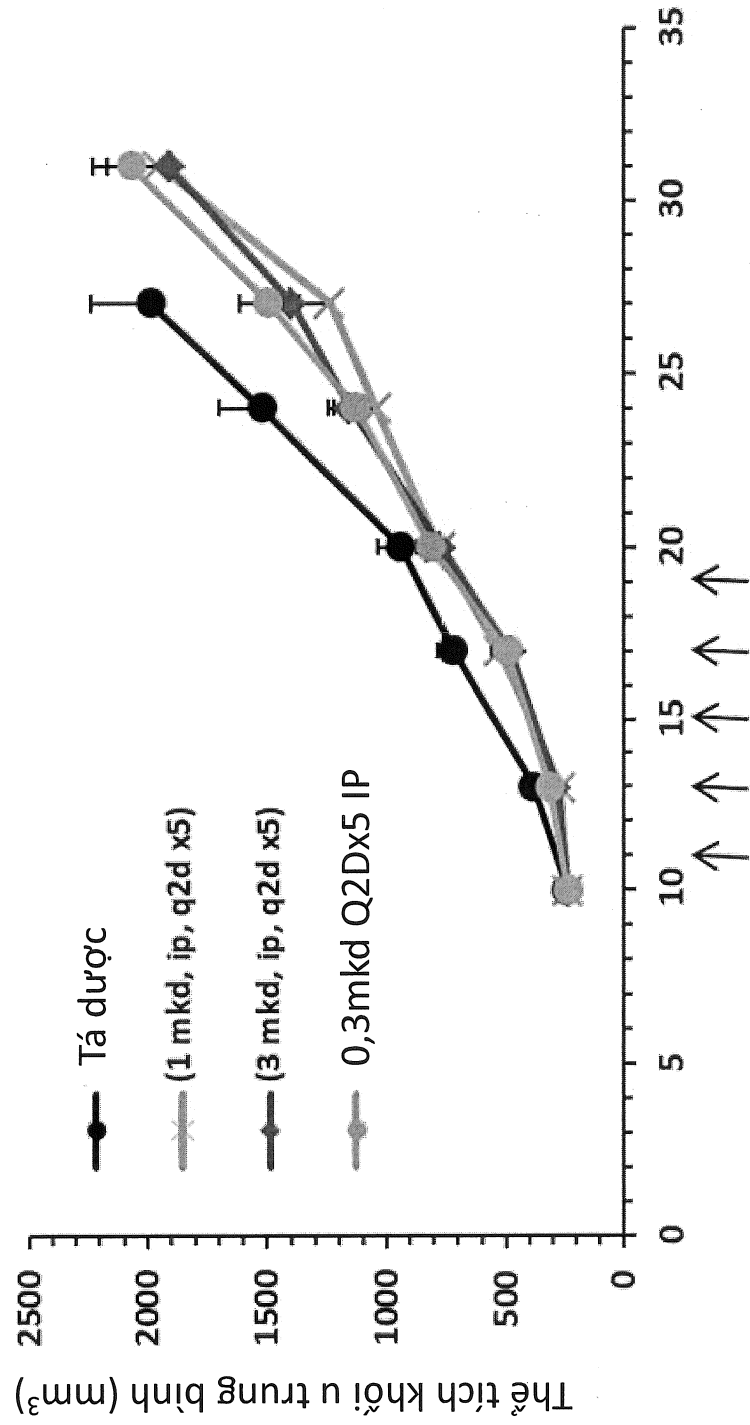
Chế độ điều trị được thể hiện đề cập đến lượng protein chủ vận thụ thể TRAIL

Fig. 22



Chế độ điều trị được thể hiện để cập đến lượng
protein chủ vận thụ thể TRAIL

Fig. 23



Số ngày sau khi chủng tế bào

Fig. 24

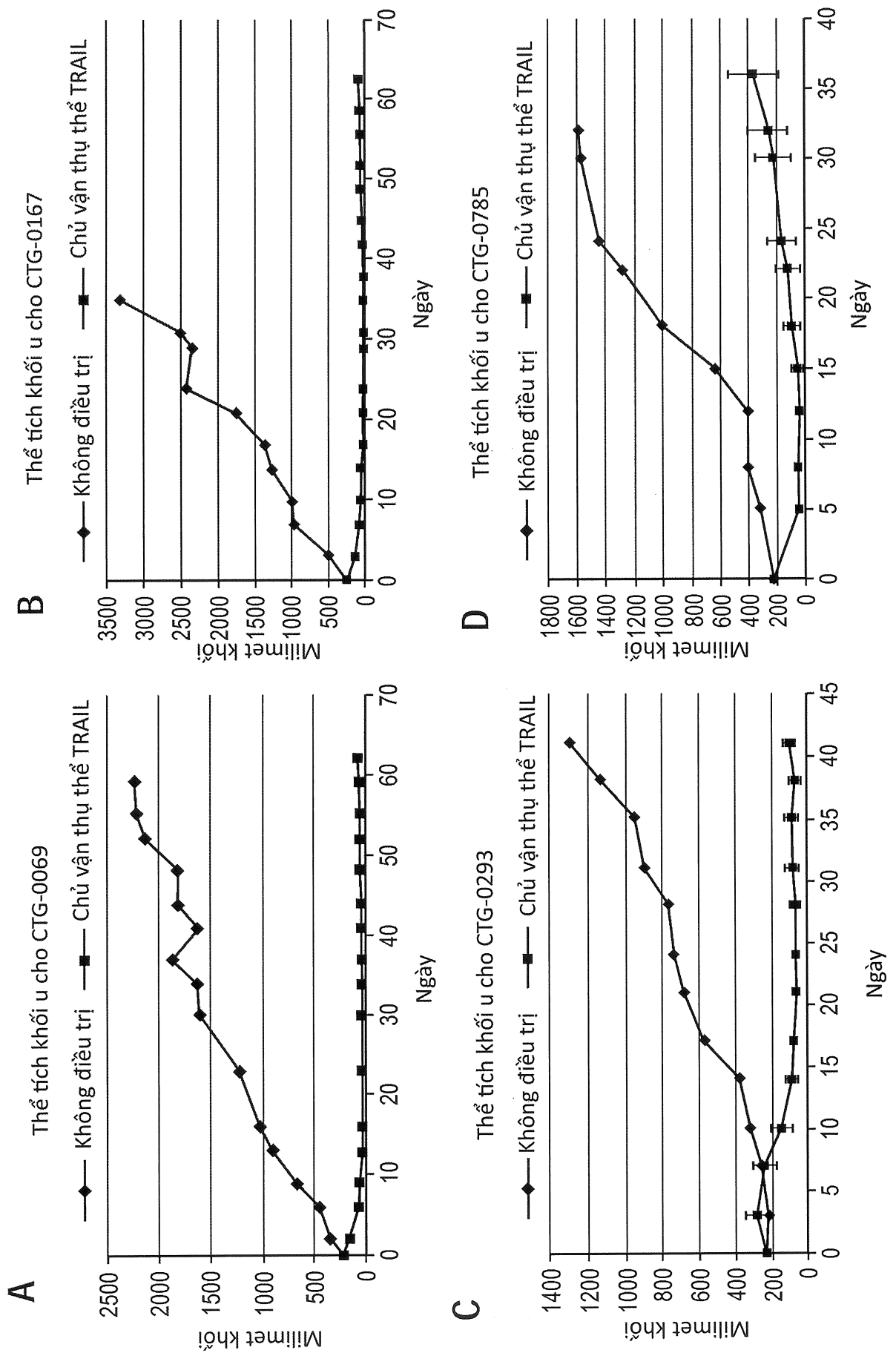


Fig. 24 (tiếp tục)

