



(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)



1-0027758

(51)<sup>7</sup> A61K 38/18

(13) B

(21) 1-2015-02039

(22) 30/10/2013

(86) PCT/CU2013/000007 30/10/2013

(87) WO2014/071894 15/05/2014

(30) CU/P/2012/0158 09/11/2012 CU

(45) 25/03/2021 396

(43) 25/08/2015 329A

(73) CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (CU)

Calle 216 esq. 15. Atabey, Playa, Habana 11600., La Habana. P.O. BOX 16040, Cuba

(72) CORRIA OSORIO Ángel de Jesús (CU); LEÓN MONZÓN Kalet (CU);  
CARMENATE PORTILLA Tania (CU); PUPO MERINO Amaury (CU); PÉREZ  
RODRÍGUEZ Saumel (CU).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) POLYPEPTIT TGFβ1 ĐỘT BIẾN HOẶC TGFβ3 ĐỘT BIẾN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(57) Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học và cụ thể hơn là đề cập đến polypeptit đột biến của phân tử TGFβ có trình tự cơ bản có mức tương đồng cao với trình tự của TGFβ của người. Các mutein này không còn khả năng tương tác với ALK5 nhưng vẫn duy trì được khả năng tương tác của chúng với các thụ thể khác là một phần của phức hợp thụ thể (TβRII và TβRIII). Chúng có đặc tính đối kháng quá trình truyền tín hiệu tất cả các biến thể tự nhiên của phối tử TGFβ, phụ thuộc thành viên ALK5 trong phức hợp thụ thể, và có tác dụng điều biến miễn dịch đáng kể. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hoạt chất là polypeptit hoặc protein dung hợp và mô tả việc ứng dụng tác dụng điều biến miễn dịch của chúng để điều trị các bệnh lý như ung thư, các bệnh lý đi kèm với chứng xơ hóa và các bệnh truyền nhiễm mãn tính.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học và thuốc. Sáng chế cũng đề cập đến các biến thể đột biến của phân tử TGF $\beta$ , là các chất đối kháng quá trình truyền tín hiệu của các đối tác tự nhiên của chúng, và mô tả ứng dụng của các biến thể này trong điều trị.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

TGF $\beta$  xytokin được phát hiện nhờ khả năng kích thích quá trình tạo thành cụm tế bào của chúng (Roberts AB, et al, Proc Natl Acad Sci USA 78: 5339-43, 1981); do quá trình này là chỉ dẫn kinh điển của quá trình biến nạp tế bào, nên phân tử này được gọi là yếu tố sinh trưởng chuyển hóa (Transforming Growth Factor) beta. Phôi tử TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3) hiện được công nhận là prototyp của các yếu tố sinh trưởng đa chức năng. Hầu hết tất cả các dạng tế bào trong cơ thể tạo ra chúng và biểu hiện phức hợp thụ thể của chúng. Các phân tử này là chất ức chế tiềm năng của quá trình tăng sinh biểu mô, nội mô và tế bào tạo máu (Ravitz, MJ et al, Adv Cancer Res 71: 165-207, 1997) và chúng là một trong những chất điều tiết tiềm năng nhất của quá trình sản xuất và lắng tụ chất nền ngoại bào (Massague, J. The Annu Rev Cell Biol 6: 597-641, 1990) và của quá trình sửa chữa mô (Roberts AB., and others, 275-308 Plenum, 1996). Chúng cũng điều tiết các cơ chế khác nhau trong quá trình phát triển phôi thai như biệt hóa, dịch chuyển và tạo mạch tế bào. (Taya, Y. et al, Development 126: 3869-79, 1999; Lidral, A. et al Am J Hum Genet 63: 557-68, 1998)

Trong hệ miễn dịch, truyền tín hiệu TGF $\beta$  là một nút điều hòa rất quan trọng. Một trong những chức năng quan trọng nhất của nó là duy trì tính nội cân bằng limpho bào và dung nạp miễn dịch, nhờ việc ức chế quá trình tăng sinh các tế bào T tự nhiên gây ra bởi các tự kháng nguyên trong môi trường làm giảm limpho bào. (Bevan, M. et al, Nat Immunol. 27, 13 (7): 667-73, 2012). Phân tử này cũng ức chế hoặc sửa đổi quá trình hoạt hóa, trưởng thành và biệt hóa của các tế bào giết tự nhiên (Laouar, Y. et al Nature Immunol 6: 600-607, 2005), các tế bào tua (Luo, X. et al, Proc. Natl Acad. Sci USA 104: 2821-2826, 2007; Bekeredjian Ding, I. et al, Immunology 128: 439-450, 2009), đại thực bào (Sica, A. et al, Semin. Cancer Biol 18, 349 - 355, 2008, Torroella. M et al, Cancer Res 69: 4800-09, 2009), bạch cầu trung tính (Fridlender, ZG et al, Cancer cell 16: 183-194, 2009) và tế bào T ghi nhớ và hiệu ứng (Gorelik, L. & Flavell, RA Nature Med, 7: 1118-1122, 2001; Flavell, RA Immunity 31:131-44, 2009). TGF $\beta$  đóng vai trò thiết yếu trong quá trình gây cảm ứng, biệt hóa và duy trì các tế bào T điều hòa cảm ứng và tự nhiên (CD4 +Foxp3+) và các tế bào T hiệu ứng TCD4+IL17+ (TH17) (Kryczek, I. et al, J. Immunol. 178 : 6730-33, 2007; Moo-

Young, TA et al. J. Immunother 32: 12-21, 2009; Fantini, MC et al J. Immunol. 172: 5149-53, 2004; Flavell, R.A. Cell 134: 392-404, 2008).

Phôi tử TGF $\beta$  trưởng thành là homodime gồm 112 gốc axit amin. Chúng có nguồn gốc từ phân tử tiền chất được tạo thành bởi tiền peptit dạng ẩn (the latency associated pro-peptide - LAP) nằm tại đầu N và miền hoạt hóa ở về phía cực đầu C. Cả hai miền này được phân tách trong nội bào bằng quá trình phân giải protein và phôi tử được tiết ra dưới dạng tiền chất bất hoạt, được tạo thành bởi miền trước (prodomain) được gắn kết thuận nghịch với miền hoạt hóa, do đó điều hòa việc tiếp cận với các thụ thể tế bào (Geoffrey D. Young and Joanne E. Murphy-Ullrich. JBC Vol 279, No. 36: 38032-39, 2004). Được công nhận rằng, tiền peptit thuộc dạng ẩn cũng quan trọng đối với quá trình tiết của miền trưởng thành (Gray A. and A Mason Science 247:1328-30, 1990).

Tất cả ba dạng đồng phân (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF  $\beta$ 3) tương tác trong màng huyết tương với các thụ thể T $\beta$ RI, T $\beta$ RII và T $\beta$ RIII. TGF $\beta$ 3, còn gọi là Betaglycan, không được biểu hiện trong tất cả các dạng tế bào, và mặc dù nó không cần thiết cho quá trình truyền tín hiệu qua các phôi tử TGF $\beta$ 1 và TGF $\beta$ 3, nhưng nó là nguồn dự trữ các phôi tử này khi T $\beta$ RII được bão hòa. (Wang XF et al, Cell 67: 797-805, 1991; Lebrin F. et al Cardiovasc. Res 65: 599-608, 2005). T $\beta$ RIII tạo ra phức hợp với các thụ thể T $\beta$ RI và T $\beta$ RII là phôi tử với chúng. Các thụ thể này chủ yếu gắn kết với T $\beta$ RII và phức hợp T $\beta$ RII/TGF $\beta$  tuyển chọn và hoạt hóa một cách đồng bộ và với thụ thể T $\beta$ RI ái lực cao, dẫn đến tạo thành phức hợp dị trimere truyền tín hiệu. TGF $\beta$ 1 và TGF $\beta$ 3 có thể gắn kết với T $\beta$ RII với ái lực cao (5-30pm), trong khi TGF $\beta$ 2 chỉ có thể gắn kết được như vậy khi có mặt T $\beta$ RIII (De Crescenzo et al, J Biol Chem 279: 26013-18, 2004; De Crescenzo et al, J. Mol. Biol 328: 1173-1183, 2003; Groppe et al, Molecular Cell 29, 157-168, 2008).

Chưa có báo cáo về việc các phôi tử của họ TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 và TGF $\beta$ 3 có khả năng gắn kết với các thụ thể typ II khác, là một phần của cùng họ protein T $\beta$ RII (Huang F và YG Chen Cell Biosc Mar 15, 2 : 9, 2012). Tuy nhiên, chúng có thể gắn kết với một vài thụ thể typ I. ALK5 được mô tả như là thụ thể T $\beta$ RI tham chiếu của họ phụ phôi tử của nó. Sau khi nó gắn kết vào phức hợp T $\beta$ RII/TGF- $\beta$ , quá trình phosphoryl hoá các protein SMAD2/3 được kích hoạt (Huang F và YG Chen Cell Biosc; Mar 15; 2:9, 2012). ALK1 được hoạt hóa để đáp lại sự tạo thành phức hợp TGF/ T $\beta$ RII trong các tế bào nội mô và các tín hiệu bởi SMAD1 và SMAD5 (Goumans MJ et al, Mol Cell 12 (4): 817-28, 2003). Ở một số tế bào biểu mô, quá trình truyền tín hiệu SMAD1/5 được gây ra bởi các thụ thể ALK2, ALK3 và ALK6 (Daly AC et al, Mol Cell Biol, 28: 6889-6902, 2008). ALK2 cũng liên quan với các quá trình phát triển tim mạch *in vivo* (Olivey HE et al, Dev Dyn 235 (1): 50-9, 2006). Cần nhấn mạnh rằng cả T $\beta$ RII và ALK5 là độc nhất với họ phôi tử TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 và TGF $\beta$ 3 trong khi ALK1/2/6/3 pha tạp hơn và còn được dùng chung bởi Activin và các protein tạo

dạng xương (Sebald W. et al, Biol Chem, 385 (8): 697-710, 2004).

Quá trình truyền tín hiệu qua ALK5 có liên quan đến các cơ chế gây bệnh khác nhau ở một số bệnh. Ở bệnh ung thư, ví dụ, vai trò của nó là phức tạp và có liên quan đến quá trình ức chế đáp ứng miễn dịch và thúc đẩy tiến triển của khối u. Quá trình ức chế đáp ứng miễn dịch chủ yếu xảy ra trong giai đoạn đầu của sinh khối u, trong khi vai trò của nó như chất thúc đẩy tiến triển của khối u xảy ra ở giai đoạn cuối của sinh ung thư, qua việc tạo các phenotyp xâm lấn di căn và ức chế đáp ứng miễn dịch kháng khối u (Miyazono K. Nat Rev. Cancer 10: 415-24, 2010; Miyazono K. Cancer Sci 101 (2): 306-12, 2010; Hawinkels LJ. et al, Growth Factors 29(4):140-52, 2011). Một bệnh lý khác gây ra bởi hoạt tính của TGF $\beta$  là nhiễm khuẩn mãn tính gây ra bởi các tác nhân gây bệnh như HIV, HBV, HCV, CMV, mycobacteria và kí sinh trùng *Trypanosoma cruzi*. TGF $\beta$  gây ra tác động tiêu cực đối với đáp ứng miễn dịch bảo vệ, cho phép các tác nhân gây bệnh nội bào này sinh trưởng và tồn tại (Reed GS. Microbes and Infection 1: 1313-1325, 1999). Trong nhiều bệnh, việc sản sinh quá mức TGF $\beta$  góp phần làm dư thừa mô xơ bệnh lý, gây ảnh hưởng đến chức năng bình thường của cơ quan bị phá hủy. Một số ví dụ về sự dư thừa mô xơ bệnh lý là chứng xơ hóa phổi, bệnh sarcoit, chứng xơ hóa cơ tim, bệnh cơ tim, bệnh xơ gan, bệnh xơ cứng hệ thống, bệnh xơ cứng cầu thận và bệnh xơ gan mật tiên phát, và trong một số các bệnh khác (Kopp JB et al, Microbes and Infection, 1: 1349 - 1365, 1999).

Đã có nhiều chiến lược ức chế quá trình truyền tín hiệu TGF $\beta$ . Hầu hết các chất ức chế đã được đánh giá trong mô hình lý thuyết, mặc dù một số chất trong số đó đã bắt đầu được thử nghiệm giai đoạn lâm sàng ở nhiều loại bệnh ung thư và xơ hóa (Flavell RA. Nat Rev Immunol. 10(8): 554-67, 2010; Connolly EC et al, Int J Biol Sci 8(7): 964-78, 2012; Hawinkels LJ. et al, Growth Factors 29 (4): 140-52, 2011). Trong tình trạng kỹ thuật có thể tìm thấy các chiến lược ức chế sau:

1- Trung hoà phối tử bằng cách sử dụng dạng miễn ngoại bào dễ hòa tan của các thụ thể của nó (US 2002/0004037 và US 2007/0244042), kháng thể kháng TGF $\beta$  (US 2002/076858, US 2005/0276802) hoặc oligonucleotit phong bế quá trình tải nạp các gen xytokin (US 2004/0006036, US2007/0155685).

2- Phong bế truyền tín hiệu bằng cách sử dụng các phân tử nhỏ gắn kết với miền kinaza của T $\beta$ RI/ALK5 (US 2006/0057145, US 2005/0136043, US 2006/0234911)

3- Phong bế thụ thể II bằng các kháng thể thừa nhận miễn ngoại bào của nó (US 2010/0119516, US 2009/7579186).

Hiện vẫn chưa có báo cáo về chiến lược ức chế bằng cách sử dụng mutein của phối tử TGF $\beta$  làm chất đối kháng truyền tín hiệu.

#### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế dựa trên phát hiện khoa học rằng các biến thể đột biến của họ

TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 và TGF $\beta$ 3) có thể ức chế chức năng của đối tác tự nhiên của chúng. Các tác giả sáng chế đã phát hiện lần đầu tiên trong các thử nghiệm *in vitro* thấy rằng các biến thể đột biến của TGF $\beta$  về cơ bản có thể ức chế quá trình truyền tín hiệu gây ra bởi các biến thể tự nhiên và do đó trung hòa tác dụng sinh học của nó. Phát hiện này tạo cơ sở cho một chiến lược mới để điều tiết quá trình truyền tín hiệu TGF $\beta$  ở các bệnh lý như ung thư, xơ hóa hay nhiễm khuẩn mãn tính trong đó các phối tử này có tác động có hại.

Sáng chế đề xuất các polypeptit có mức tương đồng cao với TGF $\beta$  của người về trình tự cơ bản, ngoại trừ ở một số vị trí mà axit amin tự nhiên đã bị gây đột biến để loại bỏ hoặc làm giảm về cơ bản khả năng truyền tín hiệu của chúng thông qua thụ thể ALK5 typ 1. Các biến thể đột biến của TGF $\beta$  này duy trì khả năng gắn kết với ái lực cao với các thụ thể T $\beta$ RII và T $\beta$ RIII, nhưng lại không thể truyền tín hiệu bởi chúng không tương tác với thụ thể ALK5 typ I, điều biến âm tính quá trình truyền tín hiệu các biến thể tự nhiên bằng cách cạnh tranh với chúng để gắn kết với các thụ thể T $\beta$ RII và T $\beta$ RIII ái lực cao. Sáng chế cũng mô tả các ứng dụng của biến thể đột biến này trong điều trị, riêng rẽ hoặc kết hợp với vacxin hoặc các phương thức điều trị khác để điều trị các bệnh lý như ung thư, chứng xơ hóa hoặc các nhiễm khuẩn mãn tính trong đó tác động của TGF $\beta$  có tác động đến tiến trình của bệnh.

Tính mới của sáng chế nằm ở cách thức điều biến quá trình truyền tín hiệu TGF $\beta$  trong điều trị và do đó điều biến khả năng xâm lấn và di căn của các khối u khác nhau và hoạt tính của các hệ miễn dịch khác nhau và các tế bào mô liên kết, ở các bệnh mà trong đó chức năng của TGF $\beta$  làm giảm đáp ứng miễn dịch bảo vệ hoặc tự nhiên hoặc gây ra bởi phương pháp chủng ngừa hoặc sửa chữa mô dư thừa và chứng xơ hóa. Tất cả các phương pháp ức chế đã biết đều không sử dụng mutein của phối tử TGF $\beta$  làm chất đối kháng truyền tín hiệu. Thể đột biến TGF $\beta$  theo sáng chế gần như là các tự protein và vì vậy có tính sinh miễn dịch thấp, làm giảm đến mức tối thiểu nguy cơ của các đáp ứng kháng thể chống lại chúng. Tính đặc hiệu cao của chúng đối với hệ thụ thể TGF $\beta$  làm giảm các độc tính không mong muốn (phổ biến trong các chiến lược dựa trên các chất ức chế có kích cỡ nhỏ). Các biến thể đột biến của TGF $\beta$  này duy trì gắn kết ái lực với thụ thể T $\beta$ RII ít nhất như TGF $\beta$ 1 và TGF $\beta$ 3 tự nhiên (6-10 pM). Ái lực này là khó có thể đạt được bằng các chiến lược ức chế thụ thể hoặc phối tử khác, với kháng thể đơn dòng hoặc các thuốc khác. Điều bất ngờ là các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng các biến thể đột biến TGF $\beta$  này duy trì được khả năng tương tác của chúng với thụ thể T $\beta$ RII và T $\beta$ RIII, tạo ra lợi thế so với các kháng thể kháng thụ thể T $\beta$ RII, do các mutein phong bế tất cả các vị trí liên kết có thể của phối tử tự nhiên với bề mặt tế bào.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. Phân tích thẩm tách Western của mutein G\_M1 và TGF $\beta$ 1. Protein

dung hợp Fc dạng đại. SDS-PAGE của các protein này được thực hiện trong các điều kiện gây cảm ứng và không gây cảm ứng, và việc nhuộm được thực hiện với kháng thể TGF $\beta$ 1 kháng người. Hàng thứ nhất là protein chuẩn có phân tử lượng thấp, hàng thứ hai là mutein GM\_1\_Fc, hàng thứ ba là Fc dạng đại TGF $\beta$ 1 và hàng thứ tư là kháng thể không tương thích hR3 được sử dụng.

Fig. 2. Thử nghiệm ELISA để đánh giá mức thừa nhận thụ thể T $\beta$ RII bởi mutein G\_M1\_Fc. Đối với kiểm chứng âm tính, kháng thể không tương thích hR3 được sử dụng. Mutein G\_M1 giữ được khả năng gắn kết với thụ thể T $\beta$ RII tương tự với khả năng gắn kết của TGF $\beta$ 1 tự nhiên.

Fig. 3. Thử nghiệm đánh giá sự ức chế quá trình tăng sinh dòng tế bào CTLL-2 phụ thuộc IL2, gây ra bởi TGF $\beta$  tự nhiên hoặc đột biến. Đã thấy rằng khả năng ức chế quá trình tăng sinh dòng tế bào CTLL-2 của mutein G\_M1 thấp hơn nhiều so với khả năng của TGF $\beta$ 1 tự nhiên của người. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm trung bình ức chế từ ba thử nghiệm độc lập.

Fig. 4. Thử nghiệm để đánh giá khả năng trung hòa ức chế quá trình tăng sinh dòng tế bào CTLL-2 phụ thuộc IL2 của mutein G\_M1, gây ra bởi TGF  $\beta$ 1 tự nhiên. Hình vẽ thể hiện tỷ lệ phần trăm trung bình của quá trình tăng sinh tế bào được ghi điểm trong ba thử nghiệm độc lập.

Fig. 5. Mutein G\_M1 ức chế sự dịch chuyển *in vitro* của dòng tế bào khối u 4T1 của chuột nhắt. Hình ảnh của vết thương kín được chụp ở các khoảng thời gian xen kẽ khác nhau được chỉ ra trong hình vẽ cho thấy tỷ lệ vết thương kín giảm đáng kể ở mỗi thời điểm khi các tế bào được xử lý bằng mutein.

Fig. 6. Mutein G\_M1 ức chế quá trình biệt hóa/chuyển hoá của các tế bào CD4+CD25- GITR- T thành tế bào T điều tiết Foxp3+CD4+, được gây ra bởi TGF $\beta$  tự nhiên. Tỷ lệ phần trăm của tế bào T điều tiết được thu hồi trong môi trường nuôi cấy tế bào T được giảm gần như về 0 khi các tế bào T tự nhiên được ủ với 500 ng/ml mutein. Nồng độ này chỉ cao hơn 30 lần so với nồng độ của TGF $\beta$  tái tổ hợp của người 1 được sử dụng chủ yếu là để gây chuyển hoá.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất polypeptit đối kháng hoạt tính qua thụ thể ALK5 của các phối tử TGF $\beta$  tự nhiên. Các polypeptit này có mức tương đồng lớn hơn 90% với trình tự axit amin của phối tử TGF $\beta$  tự nhiên. Polypeptit theo sáng chế có ít nhất một đột biến trong trình tự axit amin cơ bản của chúng, tại một trong các gốc được chọn từ nhóm bao gồm Y6, W30, W32, I51, L51, Q67 và L101.

Theo phương án cụ thể theo sáng chế, gốc axit amin ban đầu được gây đột biến bằng một trong số các gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm;

đối với vị trí 6: A

đối với vị trí 30: N, R, K, D, Q, L, S, P, V, I, G, C, T, A, E;

đối với vị trí 32: A;

đối với vị trí 51: Q, W, Y, A;

đối với vị trí 67: H, F, Y, W và

đối với vị trí 101: A, E;

Theo khía cạnh khác của sáng chế, polypeptit này có các đột biến được bổ sung vào bề mặt tương tác với các thụ thể TGF $\beta$ RII và/hoặc TGF $\beta$ RIII để làm tăng ái lực của nó với chúng.

Tiếp theo, sáng chế đề xuất được phẩm để điều trị bệnh ung thư, các bệnh lý đi kèm với chứng xơ hóa và các bệnh truyền nhiễm mãn tính chứa một hoặc hỗn hợp của polypeptit được mô tả trong sáng chế và chất dẫn thuốc được dung thích hợp để dùng chúng. Các polypeptit như vậy có thể được liên kết cộng hóa trị với protein mang, có thể là albumin hoặc vùng Fc của globulin miễn dịch của người. Theo phương án khác của sáng chế, polypeptit có thể được peg hóa.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng polypeptit theo sáng chế để bào chế được phẩm hữu ích để điều trị bệnh ung thư, các bệnh lý đi kèm với chứng xơ hóa và các bệnh truyền nhiễm mãn tính, cũng như để tăng đáp ứng của tế bào và/hoặc dịch thể với vacxin thay thế cho TGF $\beta$  tự nhiên, đặc biệt là khi vacxin có tiềm năng là vacxin để điều trị bệnh ung thư.

#### Thu nhận polypeptit đột biến TGF $\beta$

Sáng chế đề xuất polypeptit có chiều dài gồm 112 axit amin. Các polypeptit này có mức tương đồng về trình tự với các phân tử TGF $\beta$  khác nhau cao hơn 90%. Trong vùng trình tự của chúng, polypeptit chứa từ 1 đến 6 đột biến so với TGF $\beta$  tự nhiên. Các gốc thay thế gốc tự nhiên được lựa chọn để có các đặc tính hóa lý rất khác nhau so với axit amin gốc, thay đổi từ không phân cực thành phân cực, từ tích điện thành không tích điện, từ lớn thành nhỏ và từ axit thành bazơ.

Các polypeptit này, còn có thể được gọi là mutein TGF $\beta$ , được thiết kế dựa trên cấu trúc ba chiều của TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 và TGF $\beta$ 3 tự nhiên khi tạo phức với các thụ thể T $\beta$ RII và ALK5 của chúng (và được nhập vào dữ liệu PDB). Các đột biến chỉ được đưa vào ở các vị trí TGF $\beta$  tương ứng với các axit amin được tiếp xúc đáng kể với dung môi tạo thành một phần của vùng gắn kết thụ thể ALK5 chứ không phải vùng gắn kết của thụ thể T $\beta$ RII. Các gốc này được đoán là có vai trò quan trọng trong sự tương tác với ALK5 theo các chương trình tin sinh học công cộng. Bảng dưới đây thể hiện các gốc từ bề mặt gắn kết với ALK5 được dự đoán là đóng vai trò quan trọng trong sự tương tác và các đột biến có khả năng gây ảnh hưởng đến gắn kết này. Từ các kết quả này, thiết lập được dữ liệu về tất cả các mutein lý thuyết có khả năng và chọn được các mutein có tiềm năng đối kháng *in vitro* cao nhất.

Bảng 1: Axit amin trong trình tự TGF $\beta$  quan trọng đối với tương tác T $\beta$ RI/ALK5 và đột biến được dự đoán theo lý thuyết sẽ khử ổn định gắn kết.

| Gốc TGF $\beta$ | Bảo toàn tiến hóa        | Đột biến                      |
|-----------------|--------------------------|-------------------------------|
| W30             | Được bảo toàn giống nhau | N,R,K,D,Q,L,S,P,V,I,G,C,T,A,E |
| W32             | Được bảo toàn giống nhau | A                             |
| L101            | Được bảo toàn giống nhau | A,E                           |
| I51             | Được bảo toàn giống nhau | Q,W,Y,A                       |
| Q67             | Không được bảo toàn      | H, F, Y, W                    |
| Y6              | Không được bảo toàn      | A                             |

Polypeptit theo sáng chế có thể thu được bằng các phương pháp khác nhau bao gồm tổng hợp hóa học protein. Chúng cũng có thể thu được bằng kỹ thuật di truyền, như biểu hiện chúng dưới dạng các thể vùi ở vi khuẩn như *E. coli* hoặc ở các tế bào động vật có vú như CHO và HEK293 bằng cách sử dụng quy trình gây nhiễm bất kỳ được phản ánh trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các đột biến ở các vị trí đặc hiệu cũng có thể thu được bằng kỹ thuật gây đột biến trực tiếp bằng phản ứng của mạch polymeaza.

Chọn lọc polypeptit đột biến TGF $\beta$  theo hoạt tính sinh học của chúng

Polypeptit theo sáng chế được chọn từ các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* để có đồng thời các đặc tính sau:

- Các biến thể đột biến của TGF $\beta$  này cũng được dùng để chỉ mutein theo sáng chế, duy trì khả năng gắn kết của chúng với thụ thể T $\beta$ RII. Khả năng gắn kết này có thể được đánh giá trực tiếp bằng thử nghiệm ELISA, hiện đang có trên thị trường, để dò chuỗi thụ thể T $\beta$ RII hoặc một cách gián tiếp lên quần thể tế bào dương tính với thụ thể. Mức độ thừa nhận thụ thể T $\beta$ RII nên được so sánh với các mức độ của TGF $\beta$  tự nhiên.
- Các mutein này phong bế gắn kết của phối tử TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3) với thụ thể T $\beta$ RII. Điều này có thể được đo trực tiếp bằng ELISA cạnh tranh phủ các đĩa bằng mỗi phối tử TGF $\beta$  (đang có trên thị trường) và đánh giá khả năng ức chế gắn kết của T $\beta$ RII với phối tử của mutein này.
- Các biến thể đột biến của TGF $\beta$  này bị mất hoặc về cơ bản bị giảm khả năng truyền tín hiệu của chúng qua thụ thể T $\beta$ RI. Đặc tính này có thể được đánh giá trực tiếp bằng thử nghiệm tách miễn dịch Western định lượng mức Smad2 và Smad3 được phosphoryl hoá trong dịch thủy phân tế bào khối u của dòng 4T1 của chuột và dòng MDA-MB231 của người được xử lý bằng mutein hoặc bằng TGF $\beta$  tự nhiên. Các mutein này phải làm giảm mức phosphoryl hoá Smad2 và Smad3 thấp hơn ít nhất 100 lần so với TGF $\beta$  tự nhiên. Đặc tính làm giảm mức phosphoryl hóa cũng có thể được đánh giá *in vitro* trong các thử nghiệm ức chế quá trình tăng sinh gây ra bởi IL-2 trên dòng tế bào CTLL-2. Các thể đột biến này phải có hoạt tính ức chế thấp hơn

ít nhất 100 lần so với hoạt tính ức chế của TGF $\beta$  tự nhiên.

- Các biến thể đột biến của TGF $\beta$  này có khả năng ức chế quá trình truyền tín hiệu gây ra bởi mỗi phối tử TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3). Đặc tính này có thể được đánh giá trực tiếp bằng thử nghiệm thẩm tách miễn dịch Western định lượng mức được phosphoryl hoá Smad2 và Smad3 trong dịch thủy phân tế bào khối u của dòng 4T1 của chuột và dòng MDA-MB231 của người được xử lý bằng mutein hoặc bằng TGF $\beta$  tự nhiên. Ở nồng độ trong khoảng 50ng/mL-10 $\mu$ g/mL các mutein phải có khả năng ức chế ít nhất 100 lần quá trình truyền tín hiệu gây ra bởi phối tử thương mại.

- Các biến thể đột biến TGF $\beta$  này có tác dụng kháng khối u *in vitro*. Chúng có thể ức chế sự dịch chuyển của một số dòng tế bào khối u được xử lý hoặc không được xử lý bằng phối tử tự nhiên. Ví dụ về các dòng này là dòng 4T1 của chuột và dòng MDA-MB231 của người. Trong các thử nghiệm dịch chuyển, trên quan điểm thống kê, các mutein này có thể cần phải ức chế đáng kể sự dịch chuyển của khối u các tế bào.

- Các biến thể đột biến của TGF $\beta$  này bị mất hoặc làm giảm về cơ bản khả năng gây ra quá trình biệt hóa của các tế bào T CD4+ tự nhiên thành phenotip Treg foxp3+ hoặc TH17 với sự có mặt của lần lượt IL-2 hoặc IL-6 và IL-23. Đặc tính này có thể được đánh giá trực tiếp trong các thử nghiệm gây cảm ứng tế bào *in vitro* Treg và Th17. Các thể đột biến này phải có khả năng gây cảm ứng thấp hơn ít nhất 100 lần so với khả năng của TGF $\beta$  tự nhiên.

- Các biến thể đột biến TGF $\beta$  này có khả năng ức chế quá trình biệt hóa của các tế bào T CD4+ thành phenotip Treg foxp3+ hoặc TH17 gây ra bởi các chất tương tự tự nhiên của chúng. Đặc tính này có thể được đánh giá trực tiếp trong các thử nghiệm gây cảm ứng tế bào Treg và Th17 *in vitro*. Ở nồng độ trong khoảng 50ng/mL-10 $\mu$ g/mL Các mutein này phải có khả năng để ức chế ít nhất 100 lần mức truyền tín hiệu gây ra bởi phối tử thương mại.

- Các biến thể đột biến của TGF $\beta$  này có tác dụng kháng khối u *in vivo*. Chúng có thể ức chế phát triển khối u *in vivo* và khả năng di căn của một số dòng tế bào trong mô hình khối u cấy ghép được. Đặc tính này có thể được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình khối u ghép trực tiếp nguyên phát của dòng 4T1 ngực ở chuột nhắt BALB/c và ở dòng tế bào khối u MDA-MB231 của người ở chuột nhắt thiếu hụt miễn dịch. Các mutein này phải gây giảm đáng kể ở mức thống kê kích cỡ của khối u và số lượng các di căn phổi so với nhóm kiểm chứng được xử lý bằng PBS.

- Các biến thể TGF $\beta$  đột biến này có khả năng làm tăng *in vivo* tự nhiên hoặc gây ra bởi đáp ứng miễn dịch kháng khối u chủng ngừa trong mô hình khối u cấy ghép được.

Đặc tính này có thể được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình khối u cấy ghép trực tiếp nguyên phát của dòng khối u ngực 4T1 và dòng khối u ruột kết

CT26 qua da, ở chuột nhắt BALB/c. Các mutein này phải làm tăng hoạt tính tiêu tế bào và quá trình tiết xytokin của các tế bào giết tự nhiên và tế bào lymphô T CD8+. Chúng cũng phải làm tăng hoạt tính của các tế bào tua và tế bào T CD4+ biệt hóa TH1 và làm giảm đáng kể số lượng tế bào T điều tiết và tế bào ức chế tủy bào và hoạt tính tiền khối u của chúng.

Sáng chế đề xuất các cải biến mutein TGF $\beta$  khác nữa mà từ đó miễn trường thành thiếu hụt LAP có thể được tạo ra, mà không gây ảnh hưởng đến quá trình tiết của nó. Điều này đòi hỏi rằng các mutein có thể thu được ở dạng hoạt động của chúng sao cho chúng tương tác với T $\beta$ RII, dẫn đến làm đơn giản được quá trình sản xuất.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất các cải biến mutein TGF $\beta$  khác nữa làm tăng chu kỳ bán rã của chúng. Các cải biến này bao gồm peg hóa, dung hợp của polypeptit điều biến miễn dịch bất kỳ trong số các polypeptit điều biến miễn dịch được mô tả trên đây với protein mang, có thể là albumin hoặc vùng Fc của globulin miễn dịch của người, trong số những cái khác.

Theo phương án cụ thể hơn, sáng chế đề xuất các biến thể đột biến của TGF $\beta$  (các đột biến đặc hiệu được tham khảo trong Bảng 2) được hòa lẫn với mảnh Fc của IgG1 của người dẫn đến đột biến đã được chọn để biểu hiện các đặc tính nêu trên. Vùng Fc được chọn để ghép cặp có bộ đột biến (ala234, ala235) trên miền Cy2 ngăn ngừa nó tránh khỏi tương tác với các thụ thể Fc gamma, ngoại trừ thụ thể Fc sơ sinh, do đó làm vô hiệu hóa khả năng tạo ra cơ chế hiệu ứng miễn dịch của nó (Labrijn AF et al, Curr Opin Immunol. Aug, 20 (4):479-85, 2008. Epub 2008 Jul 9).

Các mutein này có nhiều thay thế axit amin làm giảm đáng kể khả năng truyền tín hiệu của chúng qua ALK5. Tuy nhiên, chúng duy trì khả năng gắn kết của nó với T $\beta$ RII và T $\beta$ RIII, và ức chế hoạt tính của TGF $\beta$  tự nhiên.

Bảng 2: Thể đột biến được cấu trúc, dùng để chỉ đột biến theo đánh số TGF $\beta$  của người.

| Đột biến                            | Số tham chiếu |
|-------------------------------------|---------------|
| W30E, L101E, I51Q                   | G_M1          |
| W30E, L101A, L51Q                   | G_M2          |
| W30E, L101E, I51Q, Q67H             | G_M3          |
| W30E, L101A, K97D, E12H, I51Q, Q67H | G_M4          |

Theo phương án khác, sáng chế cũng bao hàm các cải biến mutein TGF $\beta$  khác nữa, được thực hiện để làm tăng ái lực của chúng với T $\beta$ RII và T $\beta$ RIII, nhưng không làm ảnh hưởng hoặc thậm chí làm tăng đặc tính ức chế của chúng, hoặc cải thiện động học *in vivo* của chúng với chu kỳ bán rã tăng. Các đột biến bổ sung như vậy có thể thu được bằng thiết kế theo tỷ lệ các công cụ tin sinh học hoặc bằng cách sử dụng các thư viện phân tử kết hợp có bản chất khác

nhau (thư viện biểu hiện thể thực khuẩn, thư viện về biểu hiện gen ở nấm hoặc vi khuẩn).

Ứng dụng điều trị của polypeptit đột biến TGF $\beta$ .

Sáng chế cũng bao gồm dược phẩm chứa hoạt chất là mutein TGF $\beta$  và các chất tương tự của chúng hoặc protein dung hợp được mô tả trong sáng chế cũng như các ứng dụng điều trị có khả năng của chúng để điều biến khả năng xâm lấn và di căn của các khối u khác nhau và hoạt tính của các hệ miễn dịch khác nhau và các tế bào mô liên kết ở các bệnh có chức năng của TGF $\beta$  làm giảm đáp ứng miễn dịch bảo vệ, tự nhiên hoặc gây ra bởi phương pháp chủng ngừa, hoặc gây ra sửa chữa mô dư thừa và chứng xơ hóa.

Đối với việc sử dụng trong điều trị của chúng, polypeptit theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng mang bệnh độc lập hoặc kết hợp với các polypeptit khác hoặc các chất khác làm thuận lợi hoặc làm tăng tác động điều trị của nó. Đường dùng có thể là đường dùng bất kỳ trong số các đường dùng được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này để dùng thuốc ngoài đường tiêu hóa. Tốt hơn là, polypeptit có thể được dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da hoặc trong khối u.

Polypeptit hoặc protein dung hợp theo sáng chế cũng có thể được dùng dưới dạng một phần của dược phẩm hữu ích trong điều trị ung thư, các bệnh lý đi kèm với chứng xơ hóa và các bệnh truyền nhiễm mãn tính. Tốt hơn là, sáng chế bao hàm chế phẩm, gồm dược phẩm chứa chất dẫn thuốc được dùng.

Dược phẩm bao gồm chất mang được dùng. Chất mang được dùng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước muối, nước vô trùng, dung dịch nước muối đệm phosphat, và các chất tương tự. Các chất đệm, chất làm phân tán và các chất trợ không độc thích hợp để dùng cho bệnh nhân có thể chứa trong dược phẩm theo sáng chế. Dược phẩm này có thể là dung dịch thích hợp để dùng và là vô trùng và không chứa các hạt không mong muốn.

Theo phương án khác, sáng chế cũng mô tả các phương pháp điều trị bao gồm bước cho đối tượng mắc ung thư, các bệnh lý đi kèm với chứng xơ hóa hoặc các bệnh truyền nhiễm mãn tính dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của polypeptit, protein dung hợp hoặc dược phẩm theo sáng chế. Theo phương án cụ thể, đối tượng là người.

Polypeptit hoặc protein dung hợp theo sáng chế cũng có thể được dùng cùng với các phương pháp điều trị ung thư truyền thống (hóa trị và xạ trị) dưới dạng chất làm tăng hiệu quả của các phương pháp này.

Để thu được hiệu quả điều trị mong muốn, polypeptit theo sáng chế cần được dùng ở các nồng độ đủ cao để đảm bảo rằng nồng độ của chúng ở hạch bạch huyết hoặc vị trí các khớp ngoại vi là thích hợp cho các bệnh đang quan tâm, tức là trong khoảng nồng độ trong đó mutein có tác dụng ức chế TGF $\beta$  tự nhiên. Vì vậy, liều dùng phải được điều chỉnh theo dạng bệnh và đường dùng thuốc đang nghiên cứu. Ví dụ, trong trường hợp của điều trị khối u, liều

lượng cần được được điều chỉnh để đạt được nồng độ thể đột biến bên trong khối u và/hoặc hạch bạch huyết khu trú đủ cao để có hiệu quả ức chế. Khoảng liều lượng cần chẩn đoán có thể thay đổi trong khoảng 1.25-20 mg/kg/liều hằng tuần hoặc hai tuần một lần.

Số lần dùng cũng phải được điều chỉnh theo sự phân bố sinh học của mutein đang nói đến. Nói chung nồng độ hữu hiệu trên đây cần được kéo dài trong khoảng thời gian từ 2 đến 30 ngày liên tục. Nếu mutein được liên hợp với protein mang, tần suất dùng cần được được điều chỉnh theo.

Khi hợp chất hoặc dược phẩm theo sáng chế được sử dụng cùng với chất chống ung thư khác, sáng chế đề xuất, ví dụ, các tùy chọn điều trị đồng thời, theo giai đoạn hoặc xen kẽ. Do vậy, hợp chất theo sáng chế có thể được dùng đồng thời trong dược phẩm riêng rẽ, nghĩa là hợp chất theo sáng chế có thể được dùng trước hoặc sau chất chống ung thư khác, ví dụ, với sự khác nhau về giây, phút, giờ, ngày hoặc tuần.

Tác động điều trị được xác định là làm giảm một phần hoặc hoàn toàn các triệu chứng của bệnh. Ở bệnh ung thư, tác động điều trị được xác định là sự giảm về kích thước khối u hoặc sự tăng khoảng thời gian tái phát, trong số các tác động khác.

Chiến lược điều trị mới này có nhiều ưu điểm so với các đề xuất điều biến quá trình truyền tín hiệu TGF $\beta$  khác. Ví dụ:

- Thể đột biến TGF $\beta$  hầu như là các tự protein (ngoại trừ các đột biến mới) và vì vậy có tính sinh miễn dịch thấp. Thực tế này làm giảm đến mức tối thiểu nguy cơ của các đáp ứng kháng thể chống lại chúng.
- Tính đặc hiệu của chúng cao nhờ hệ thụ thể TGF $\beta$  làm giảm các độc tính không mong muốn, phổ biến trong các chiến lược là dựa vào chất ức chế có kích cỡ nhỏ.
- Các biến thể đột biến của TGF $\beta$  này duy trì ái lực gắn kết với thụ thể T $\beta$ RII ít nhất bằng TGF $\beta$ 1 và TGF $\beta$ 3 tự nhiên (6-10 pM). Ái lực này khó để đánh bại được các chiến lược ức chế thụ thể hoặc phối tử, với kháng thể đơn dòng hoặc các thuốc khác.
- Các biến thể đột biến của TGF $\beta$  này có kích cỡ nhỏ hơn so với kháng thể đơn dòng và các thụ thể được liên hợp với Fc. Đặc điểm này đảm bảo sự thâm thấu vào khối u tốt hơn so với các thuốc khác ức chế quá trình truyền tín hiệu TGF $\beta$  và đã mô tả ở trên.
- Các biến thể đột biến của TGF $\beta$  này ức chế quá trình truyền tín hiệu phối tử bất kỳ qua hệ thụ thể T $\beta$ RII/T $\beta$ RI (ALK5), là có lợi về mặt lý thuyết so với các kháng thể pan-phối tử, bởi vì chỉ hướng đến các dạng đồng phân TGF $\beta$  đã biết, nếu các dạng đồng phân khác tồn tại các kháng thể này có thể không ức chế được chúng.
- Các biến thể đột biến TGF $\beta$  duy trì khả năng tương tác với thụ thể T $\beta$ RIII. Điều này mang lại lợi ích so với các kháng thể kháng thụ thể T $\beta$ RII, bởi vì

các mutein này phong bế tất cả các vị trí liên kết có khả năng của phối tử TGF $\beta$  tự nhiên với bề mặt tế bào.

- Gắn kết với mảnh Fc làm tăng chu kỳ bán rã của mutein, có thể có lợi đối với thuốc có kích cỡ nhỏ, do liều lượng và tần suất của chúng sẽ thấp hơn.
- Gắn kết với mảnh Fc của IgG1 của người không tương tác với các thụ thể Fc gamma, ngoại trừ với thụ thể Fc sơ sinh, tránh việc xung đột các cơ chế hiệu ứng miễn dịch trên các tế bào không khối u của vật chủ, làm giảm khả năng của các độc tố không mong muốn so với các kháng thể kháng thụ thể II duy trì khả năng tương tác đầy đủ với các thụ thể Fc gamma của chúng.

Sáng chế được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

#### Ví dụ 1. Thiết kế Mutein TGF $\beta$ .

Thể đột biến TGF $\beta$  được thiết kế điện toán bằng cách sử dụng phương pháp tin sinh học. Như đã chỉ ra ban đầu, các cấu trúc phức hợp ba của thụ thể TGF $\beta$ 1 và TGF $\beta$ 3 với TGF $\beta$  được sử dụng. Năng lượng gắn kết giữa các dạng đồng phân tự nhiên và tất cả các biến thể đột biến có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình tin sinh học công cộng. Mutein G\_M1 được biểu hiện trong các tế bào CHO-K1 bằng cách sử dụng cấu trúc gen trên cơ sở vật truyền lentivirus PLW chứa vùng bản lề đầu tận cùng C và miền Cy2 và Cy3 của IgG1 của người và đuôi histidin. G\_M1 được tinh chế bằng sắc ký ái lực bằng protein A. Nó thu được (Fig. 1) với độ tinh khiết cao (> 95%).

#### Ví dụ 2. Đánh giá gắn kết của mutein G\_M1 với T $\beta$ RII bằng ELISA.

Thử nghiệm ELISA được thực hiện bằng cách phủ T $\beta$ RII (1 $\mu$ g/ml) và biểu hiện bằng kháng thể Fc kháng người được liên hợp với phosphatase kiềm. Đối với mẫu kiểm chứng âm tính kháng thể không tương thích hR3 được sử dụng. Fig. 2 cho thấy rằng mutein G\_M1 giữ được khả năng gắn kết của nó với thụ thể T $\beta$ RII, là tương tự với khả năng của TGF $\beta$ 1 tự nhiên.

#### Ví dụ 3. Mutein G\_M1 có khả năng truyền tín hiệu qua thụ thể T $\beta$ RI (ALK5) giảm, và vì vậy mô phỏng hoạt tính sinh học của TGF $\beta$ tự nhiên.

Các tác giả sáng chế ức chế quá trình tăng sinh dòng tế bào CTLL-2 phụ thuộc IL2, gây ra bởi TGF $\beta$  tự nhiên hoặc đột biến. 5000 CTLL-2 tế bào/giếng được kích thích bằng rIL-2 (50U/ml) và được nuôi cấy với sự có mặt của nồng độ được chỉ định của TGF $\beta$  dạng đại hoặc mutein G\_M1, trong 48 giờ. Sau đó, chất phản ứng alamar blue được bổ sung vào môi trường nuôi cấy và mức gây cảm ứng được đo ở 540 và 630nm.

Mutein G\_M1 không thể ức chế quá trình tăng sinh dòng CTLL-2, ở nồng độ lớn hơn 200 lần so với nồng độ của TGF $\beta$ 1 thương mại được sử dụng làm

mẫu kiểm chứng dương tính của thử nghiệm (Fig. 3). Đã thấy rằng khả năng ức chế quá trình tăng sinh dòng tế bào CTLL-2 của mutein G\_M1 là thấp hơn nhiều so với khả năng của TGF $\beta$  thương mại.

Ví dụ 4. Mutein G\_M1 là chất đối kháng TGF $\beta$  truyền tín hiệu *in vitro*.

5000 CTLL-2 tế bào/giếng được kích thích bằng rIL-2 (50U/ml) và được nuôi cấy với sự có mặt của 2 pM TGF $\beta$  dạng đại và nồng độ được chỉ định của G\_M1, hoặc isotyp kiểm chứng hR3 MAb; hoặc kháng thể kháng TGF $\beta$  làm mẫu kiểm chứng dương tính. Sau 48 giờ, chất phản ứng alamar blue được bổ sung vào môi trường nuôi cấy và mức gây cảm ứng được đo ở 540 và 630nm.

Mutein G\_M1, chứ không phải isotyp kiểm chứng MAb hR3, làm trung hòa ức chế quá trình tăng sinh dòng tế bào CTLL-2 phụ thuộc IL2, gây ra bởi TGF $\beta$  tự nhiên (Fig. 4). Tác dụng trung hòa gây ra bởi mutein là tương tự với tác dụng thu được với kháng thể kháng TGF $\beta$ , được sử dụng làm mẫu kiểm chứng dương tính của thử nghiệm.

Ví dụ 5. Mutein G\_M1 có tác dụng kháng khối u *in vitro*.

Khả năng ức chế dịch chuyển dòng tế bào khối u 4T1 của mutein G\_M1 được đánh giá trong thử nghiệm vết thương kín *in vitro* (CC Liang et al, Nat Protoc. Two (2): 329-33, 2007). Dòng các tế bào được làm kín bằng cách cạo một lớp tế bào bằng đầu pipet vô trùng. Mutein G\_M1 hoặc TGF $\beta$  dạng đại (làm mẫu kiểm chứng âm tính) được bổ sung vào giếng. Fig. 5 cho thấy rằng tỷ lệ vết thương kín được giảm đáng kể ( $p < 0.05$  thử nghiệm Kruskal-Wallis với sau thử nghiệm Dunn ở mỗi thời điểm) khi các tế bào được xử lý bằng mutein.

Ví dụ 6. Mutein G\_M1 ức chế quá trình biệt hóa của các tế bào CD4 $^{+}$  T tự nhiên thành các tế bào Foxp3 $^{+}$  CD4 $^{+}$ T điều biến gây ra bởi TGF  $\beta$ 1 và IL2 tự nhiên.

Quần thể CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ -GITR $^{-}$  tự nhiên từ lá lách của 4 con chuột nhắt C57/BL6 được tinh chế bằng cách tuyển chọn tế bào.  $5 \times 10^4$  các tế bào này được kích thích bằng đĩa gắn kết kháng CD3 3  $\mu$ g/mL và 3  $\mu$ g/mL của hỗn hợp hòa tan kháng CD28, với sự có mặt của 5 ng/ml IL-2 và 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 tự nhiên của người. Trong điều kiện nuôi cấy này tỷ lệ phần trăm của tế bào T điều tiết được thu hồi sau 3 ngày là 55.6%. Mức độ ảnh hưởng của mutein trong môi trường này được đánh giá ở các nồng độ 250 và 500ng/mL. Tỷ lệ phần trăm của tế bào T Foxp3 $^{+}$  điều tiết được thu hồi, với sự có mặt hoặc không có mặt của mutein được đo. Fig. 6 cho thấy tỷ lệ phần trăm của tế bào T điều tiết được thu hồi trong môi trường nuôi cấy tế bào T giảm xuống gần bằng 0 với sự có mặt của Mutein G\_M1.

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Polypeptit TGF $\beta$ 1 đột biến hoặc TGF $\beta$ 3 đột biến đối kháng hoạt tính của TGF $\beta$  qua trung gian bởi thụ thể ALK5, trong đó, nếu polypeptit này là polypeptit TGF $\beta$ 1 đột biến, nó bao gồm sự thay thế axit amin trong các gốc axit amin W30, L101 và I51 của TGF $\beta$ 1 trưởng thành; và trong đó, nếu polypeptit này là polypeptit TGF $\beta$ 3 đột biến, nó bao gồm sự thay thế axit amin trong các gốc axit amin W30, L101 và L51 của TGF $\beta$ 3 trưởng thành.
2. Polypeptit theo điểm 1, trong đó các gốc được thay thế bằng các gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:  
đối với vị trí 30: N,R,K,D,Q,L,S,P,V,I,G,C,T,A,E;  
đối với vị trí 101: A, E; và  
đối với vị trí 51: Q,W,Y,A.
3. Polypeptit theo điểm 1, được ghép cặp với mảnh IgG1 của người bao gồm các đột biến ala234 và ala235 trong miền C $\gamma$ 2.
4. Dược phẩm chứa ít nhất một polypeptit theo điểm 1 với lượng nằm trong khoảng từ 50ng/mL đến 10 $\mu$ g/mL và chất dẫn thuốc được dụng thích hợp.
5. Dược phẩm theo điểm 4, trong đó dược phẩm này chứa:  
hỗn hợp của polypeptit; và  
chất dẫn thuốc được dụng thích hợp.
6. Dược phẩm theo điểm 4, trong đó polypeptit được liên kết cộng hóa trị với protein mang.
7. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó protein mang là vùng Fc của globulin miễn dịch của người.
8. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó polypeptit được peg hóa.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CENTRO INMUNOLOGIA MOLECULAR  
 <120> POLYPEPTIT TGF $\beta$ 1 ĐỘT BIẾN HOẶC TGF $\beta$ 3 ĐỘT BIẾN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHỨNG  
 <130> 442012CU00  
 <140> 2012-100  
 <141> 2012-11-05  
 <160> 73  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
 <220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp  
 <400> 1

Ala Leu Asp Thr Asp Ala Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Tyr Trp Ser Leu Asp Thr Gln Thr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
 65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
 85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 2  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp  
 <400> 2

Ala Leu Asp Ala Ala Ala Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 3

Ala Leu Asp Thr Asn Ala Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 4

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Asn Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
 65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
 85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 5

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 5

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Arg Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 6

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Lys Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 7

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Asp Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 8

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Gln Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 9  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 9

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Leu Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
 65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
 85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 10  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 10

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Ser Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 11

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Pro Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 12

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Val Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 13

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Ile Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 14

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Gly Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
 65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
 85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 15

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Cys Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys

35

40

45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 16

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 16

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Thr Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 17

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Ala Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 18

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Glu Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro

85

90

95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 19

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Asn Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
 65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
 85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 20

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Arg Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 21

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 21

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Lys Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 22

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Asp Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 23

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Gln Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 24  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 24

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Leu Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 25  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 25

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Ser Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
 65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
 85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 26

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Pro Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
 65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
 85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 27

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Val Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 28

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Ile Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 29

<211> 112

<212> PRT.

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 29

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Gly Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 30

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Cys Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
 65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
 85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 31

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 31

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Thr Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
 65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
 85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 32

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Ala Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 33

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 33

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Glu Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 34  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 34

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Asn Lys Trp  
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 35  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 35

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Arg Lys Trp

20

25

30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
 65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
 85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 36

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 36

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Lys Lys Trp  
 20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
 65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
 85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 37

<211> 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 37

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Asp Lys Trp  
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 38

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Gln Lys Trp  
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro

65

70

75

80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 39

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Leu Lys Trp  
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 40

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Ser Lys Trp  
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 41

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 41

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Pro Lys Trp  
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 42

<211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 42

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Val Lys Trp  
 20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
 65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
 85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 43  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 43

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Ile Lys Trp  
 20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 44

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 44

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Gly Lys Trp  
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 45

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 45

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Cys Lys Trp  
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 46

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 46

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Thr Lys Trp  
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 47  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 47

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Ala Lys Trp  
 20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
 65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
 85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 48  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 48

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Glu Lys Trp  
 20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 49  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 49

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Ala  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 50  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 50

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Ala  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 51

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 51

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Ala  
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 52  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 52

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Gln Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
 65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
 85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 53  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 53

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Trp Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 54  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 54

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Tyr Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 55  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 55

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys

|       |     |     |                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-------|-----|-----|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|       | Val | Arg | Gln                           | Leu | Tyr | Ile | Asp | Phe | Arg | Lys | Asp | Leu | Gly | Trp | Lys | Trp |  |
|       |     |     |                               | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |
|       | Ile | His | Glu                           | Pro | Lys | Gly | Tyr | His | Ala | Asn | Phe | Cys | Leu | Gly | Pro | Cys |  |
|       |     |     | 35                            |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |
|       | Pro | Tyr | Ala                           | Trp | Ser | Leu | Asp | Thr | Gln | Tyr | Ser | Lys | Val | Leu | Ala | Leu |  |
|       |     | 50  |                               |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
|       | Tyr | Asn | Gln                           | His | Asn | Pro | Gly | Ala | Ser | Ala | Ala | Pro | Cys | Cys | Val | Pro |  |
| 65    |     |     |                               |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
|       | Gln | Ala | Leu                           | Glu | Pro | Leu | Pro | Ile | Val | Tyr | Tyr | Val | Gly | Arg | Lys | Pro |  |
|       |     |     |                               |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
|       | Lys | Val | Glu                           | Gln | Leu | Ser | Asn | Met | Ile | Val | Arg | Ser | Cys | Lys | Cys | Ser |  |
|       |     |     |                               | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| <210> |     |     | 56                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| <211> |     |     | 112                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| <212> |     |     | PRT                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| <213> |     |     | Trình tự nhân tạo             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| <220> |     |     |                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| <223> |     |     | bằng công nghệ ADN tái tổ hợp |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| <400> |     |     | 56                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|       | Ala | Leu | Asp                           | Ala | Ala | Tyr | Cys | Phe | Arg | Asn | Val | Gln | Asp | Asn | Cys | Cys |  |
| 1     |     |     |                               |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |
|       | Leu | Arg | Pro                           | Leu | Tyr | Ile | Asp | Phe | Lys | Arg | Asp | Leu | Gly | Trp | Lys | Trp |  |
|       |     |     |                               | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |
|       | Ile | His | Glu                           | Pro | Lys | Gly | Tyr | Asn | Ala | Asn | Phe | Cys | Ala | Gly | Ala | Cys |  |
|       |     |     | 35                            |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |
|       | Pro | Tyr | Gln                           | Trp | Ser | Ser | Asp | Thr | Gln | His | Ser | Arg | Val | Leu | Ser | Leu |  |
|       |     | 50  |                               |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
|       | Tyr | Asn | Thr                           | Ile | Asn | Pro | Glu | Ala | Ser | Ala | Ser | Pro | Cys | Cys | Val | Ser |  |
| 65    |     |     |                               |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
|       | Gln | Asp | Leu                           | Glu | Pro | Leu | Thr | Ile | Leu | Tyr | Tyr | Ile | Gly | Lys | Thr | Pro |  |
|       |     |     |                               |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
|       | Lys | Ile | Glu                           | Gln | Leu | Ser | Asn | Met | Ile | Val | Lys | Ser | Cys | Lys | Cys | Ser |  |
|       |     |     |                               | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |

<210> 57  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 57

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Trp Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
 65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
 85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 58  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 58

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Tyr Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu

50

55

60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 59

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 59

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ala Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 60

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 60

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Gln Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 61

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 61

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Trp Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser

100

105

110

<210> 62  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 62

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
 20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Tyr Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
 65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
 85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 63  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 63

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
 20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Ala Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 64

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 64

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn His His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 65

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Phe His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 66

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 66

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Tyr His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 67  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 67

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Trp His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
 65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
 85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 68  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 68

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Ala Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 69

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 69

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Glu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 70

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 70

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Ala Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

&lt;400&gt; 71

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Glu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 72  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 72

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
 20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
 35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
 50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
 65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
 85 90 95

Lys Val Glu Gln Ala Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
 100 105 110

<210> 73  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> bằng công nghệ ADN tái tổ hợp

<400> 73

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
 20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
 35 40 45

27758

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Glu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

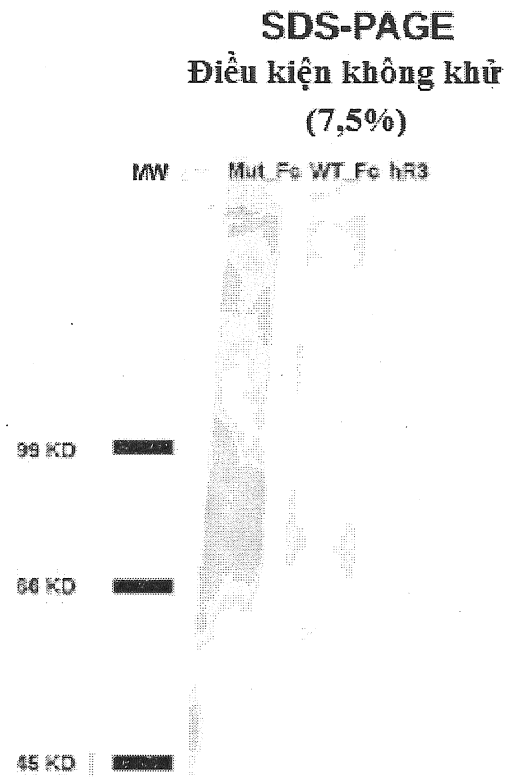
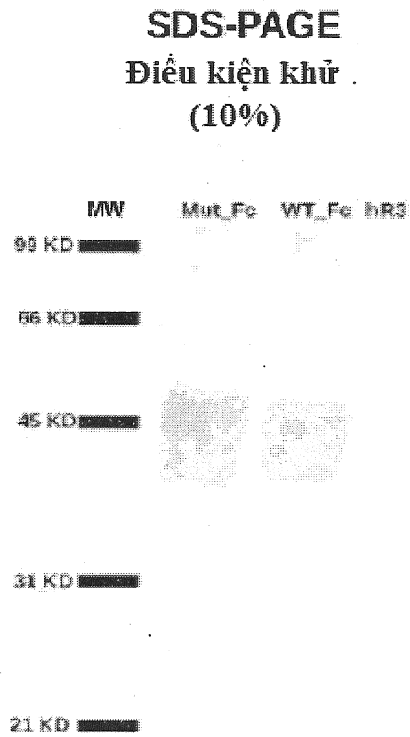
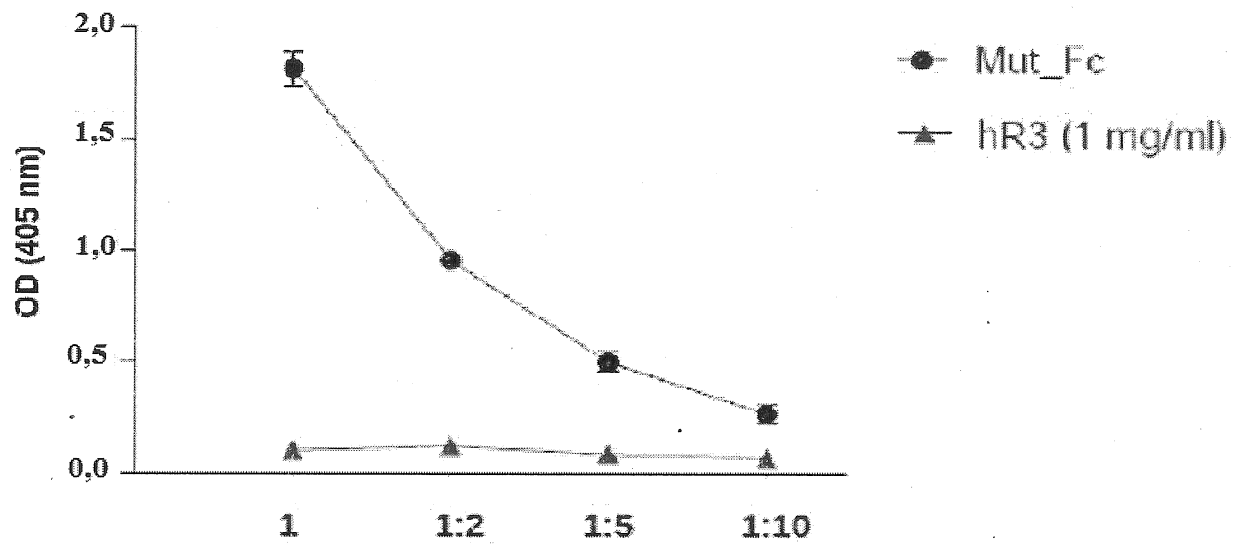
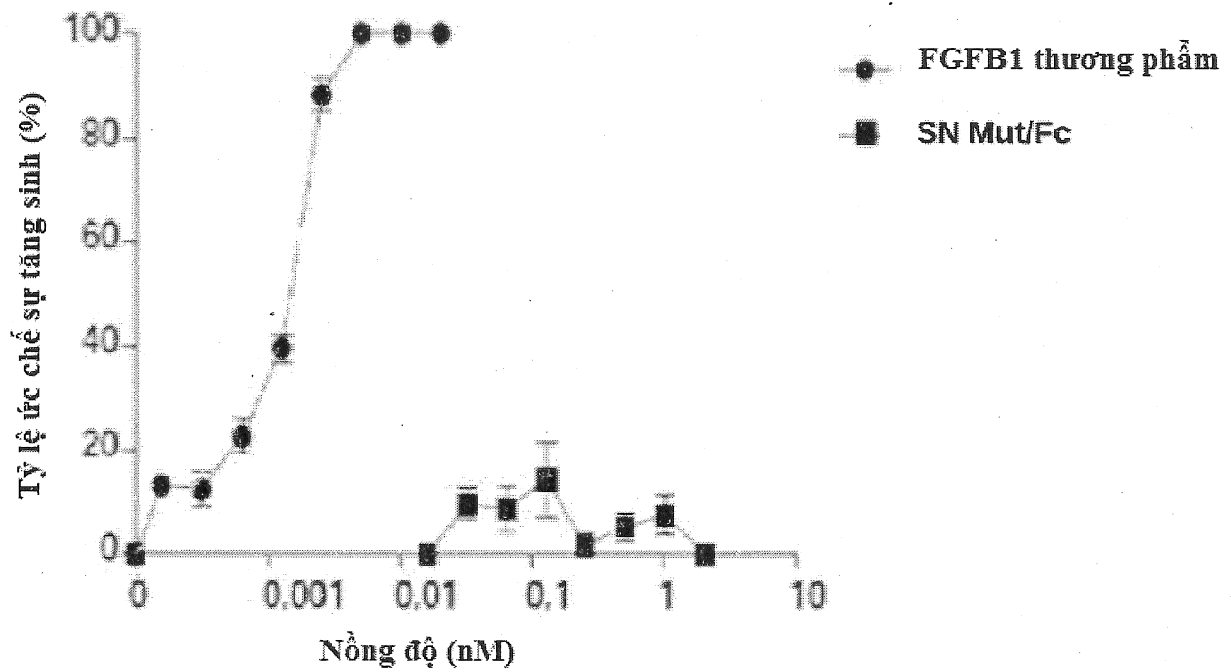
**Fig 1****Thẩm tách Western kháng TGFB1**

Fig 2



**Fig 3**

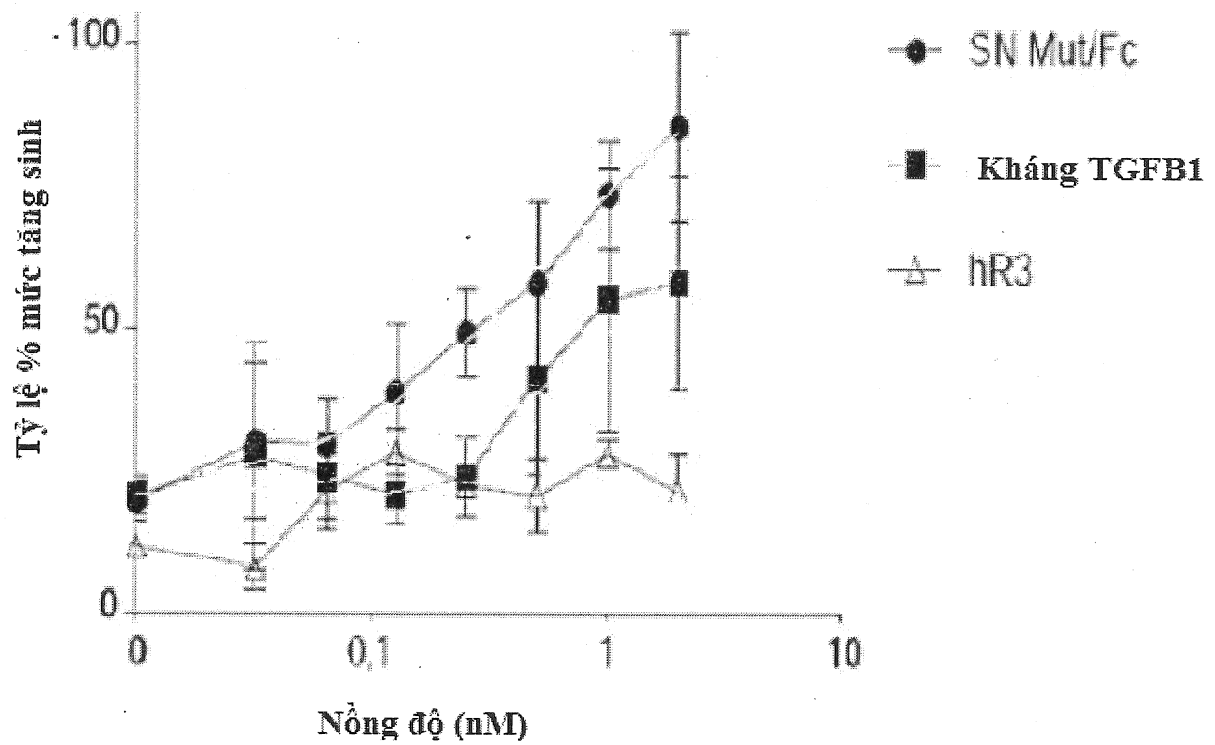
Ức chế sự tăng sinh CTLL2  
5000 tế bào/giếng + IL2 (50U/mL)



**Fig 4**

Trung hòa sự ức chế quá trình tăng sinh  
CTLL1 gây ra bởi rTGF $\beta$ 1

5000 tế bào/giếng + IL2 (50U/mL + rTGF $\beta$ 1 (2pM)



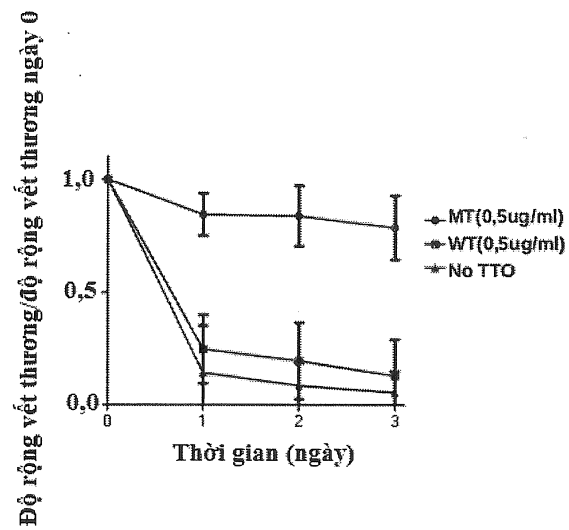
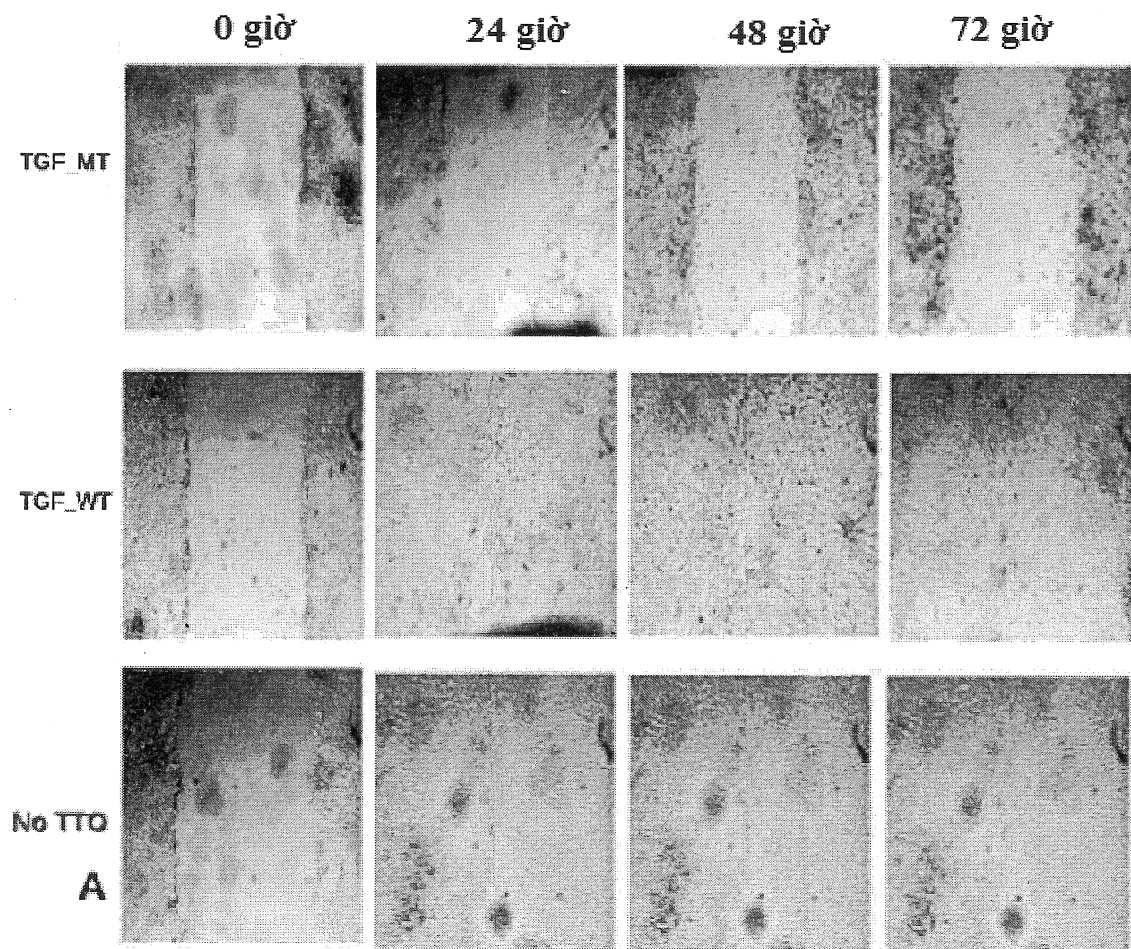
**Fig 5**

Fig 6

