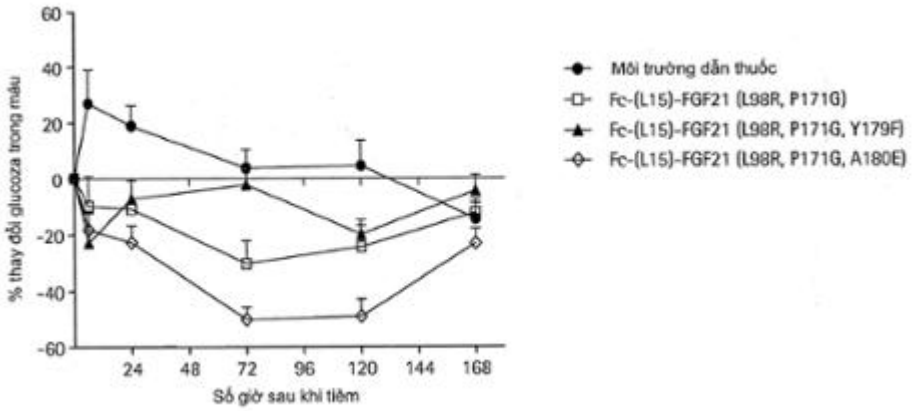
(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(11) **1-0029363**
(51)[7] **A61K 38/18**; C07K 14/50
(13) **B**

(21) 1-2011-03204
(22) 04/05/2010
(86) PCT/US2010/033478 04/05/2010
(87) WO/2010/129503 11/11/2010
(30) 61/175,736 05/05/2009 US; 61/285,118 09/12/2009 US
(45) 25/09/2021 402
(43) 25/07/2012 292A
(73) Amgen Inc. (US)
One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California 91320-1799, United States of America
(72) BELOUSKI, Edward John (US); ELLISON, Murielle Marie (US); HAMBURGER, Agnes Eva (US); HECHT, Randy Ira (US); LI, Yue-Sheng (US); MICHAELS, Mark Leo (US); SUN, Jeonghoon (KR); XU, Jing (CN).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) POLYPEPTIT FGF21 ĐỘT BIẾN, AXIT NUCLEIC MÃ HOÁ POLYPEPTIT NÀY VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA POLYPETIT NÀY DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ RỐI LOẠN CHUYỂN HÓA

(57) Sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit FGF21 đột biến, polypeptit FGF21 đột biến, dược phẩm chứa polypeptit FGF21 đột biến này, và axit nucleic, polypeptit hoặc dược phẩm này dùng để sử dụng trong điều trị rối loạn chuyển hóa.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit FGF21 đột biến, polypeptit FGF21 đột biến, dược phẩm chứa polypeptit FGF21 đột biến này, và axit nucleic, polypeptit hoặc dược phẩm dùng để sử dụng trong điều trị rối loạn chuyển hóa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

FGF21 là polypeptit dạng được tiết, thuộc phân họ yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF: fibroblast growth factor) bao gồm FGF19, FGF21 và FGF23 (Itoh et al., 2004, Trend Genet. 20: 563-69). FGF21 là FGF không điển hình ở chỗ nó không phụ thuộc heparin và có chức năng làm hormon trong điều hòa quá trình chuyển hóa glucoza, lipit và năng lượng.

FGF21 được phân lập từ thư viện cADN gan dưới dạng yếu tố được tiết ở gan. Nó được biểu hiện với mức độ cao ở gan và tụy và là thành viên duy nhất của họ FGF được biểu hiện chủ yếu ở gan. Chuột nhắt chuyển gen biểu hiện quá mức FGF21 thể hiện các kiểu hình chuyển hóa là tốc độ tăng trưởng chậm, lượng glucoza và triglyxerit trong huyết tương thấp, và không mắc bệnh đái tháo đường typ 2 liên quan đến tuổi tác, chứng tăng sản đảo nhỏ và bệnh béo phì. Việc dùng làm thuốc của protein FGF21 tái tổ hợp ở mô hình loài gặm nhấm và linh trưởng tạo ra lượng bình thường của glucoza trong huyết tương, lượng triglyxerit và cholesterol giảm, và khả năng dung nạp glucoza và độ nhạy insulin tăng lên. Ngoài ra, FGF21 làm giảm thể trọng và mỡ trong cơ thể bằng cách tăng tiêu thụ năng lượng, hoạt động thể chất và tốc độ chuyển hóa. Nghiên cứu thử nghiệm đề xuất cơ sở cho việc dùng làm thuốc của FGF21 để điều trị bệnh đái tháo đường typ 2, bệnh béo phì, chứng loạn lipit huyết và các tình trạng hoặc rối loạn chuyển hóa khác ở người.

FGF21 của người có thời gian bán hủy *in vivo* ngắn. Ở chuột nhắt, thời gian bán hủy của FGF21 của người là từ 1 đến 2 giờ, và ở khỉ cynomolgus, thời gian bán hủy là từ 2,5 đến 3 giờ. Trong quá trình phát triển protein FGF21 để sử dụng làm chất trị liệu trong điều trị bệnh đái tháo đường typ 2, việc làm tăng thời gian bán hủy là điều mong muốn. Protein FGF21 có

thời gian bán hủy tăng cho phép dùng liều ít thường xuyên hơn cho bệnh nhân được cho dùng protein này. Protein như vậy được mô tả trong bản mô tả này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến polypeptit đã phân lập chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:4 và còn chứa: (a) ít nhất một cải biến thế axit amin ở vị trí 180; và (b) ít nhất một cải biến thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: (i) cải biến thế ở vị trí 171 và (ii) cải biến thế ở vị trí 98; và (c) tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, polypeptit đã phân lập chứa cải biến thế ở vị trí 98 và cải biến thế ở vị trí 180 và trong đó: (a) cải biến thế ở vị trí 98 được chọn từ nhóm bao gồm arginin, xystein, axit glutamic, glutamin, lysin và threonin; và (b) cải biến thế ở vị trí 180 được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, prolin, serin hoặc axit glutamic; và (c) tổ hợp của chúng. Theo một phương án, gốc ở vị trí 98 là arginin và gốc ở vị trí 180 là axit glutamic. Sáng chế còn đề xuất polypeptit dung hợp chứa polypeptit đã phân lập được dung hợp với trình tự axit amin khác loại. Theo một phương án, trình tự axit amin khác loại là miền Fc hoặc mảnh của nó, và có thể bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:11. Theo phương án khác, polypeptit được dung hợp với miền Fc qua nhóm liên kết và theo phương án khác nữa, nhóm liên kết chứa GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:31). Theo một phương án cụ thể, polypeptit này chứa SEQ ID NO:47. Sáng chế cũng đề xuất multime chứa hai hoặc nhiều polypeptit dung hợp. Dược phẩm chứa polypeptit đã phân lập và tá dược bào chế dược dụng, như hydrogel, cũng được đề xuất. Theo khía cạnh khác, phương pháp điều trị rối loạn chuyển hóa được đề xuất và theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho bệnh nhân cần điều trị dược phẩm được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một phương án, rối loạn chuyển hóa là bệnh đái tháo đường và theo phương án khác, rối loạn chuyển hóa là bệnh béo phì. Axit nucleic mã hóa polypeptit đã phân lập cũng được đề xuất và theo một phương án, axit nucleic này chứa SEQ ID NO:46. Axit nucleic có thể có mặt trong vectơ, và bản thân vectơ này có thể có mặt ở tế bào chủ. Theo một phương án khác nữa, polypeptit này chứa: (a) cải biến cắt cụt ở đầu amino không nhiều hơn 8 gốc axit amin, trong đó polypeptit này có khả năng làm giảm lượng glucoza trong máu ở động vật có vú; (b) cải biến cắt cụt ở đầu carboxyl không nhiều hơn 12 gốc axit amin, trong đó polypeptit này có khả năng làm giảm lượng glucoza trong máu

ở động vật có vú; hoặc (c) cải biến cắt cụt ở đầu amino không nhiều hơn 8 gốc axit amin và cải biến cắt cụt ở đầu carboxyl không nhiều hơn 12 gốc axit amin, trong đó polypeptit này có khả năng làm giảm lượng glucoza trong máu ở động vật có vú. Theo các phương án khác nữa, polypeptit được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều polyme, như PEG.

Theo phương án khác, polypeptit đã phân lập chứa cải biến thế ở vị trí 171 và cải biến thế ở vị trí 180 và trong đó: (a) cải biến thế ở vị trí 180 được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, prolin, serin và axit glutamic; (b) cải biến thế ở vị trí 171 được chọn từ nhóm bao gồm alanin, arginin, asparagin, axit aspartic, xystein, axit glutamic, glutamin, glyxin, histidin, lysin, serin, threonin, tryptophan và tyrosin; và (c) tổ hợp của chúng. Theo một phương án, gốc ở vị trí 171 là glyxin và gốc ở vị trí 180 là axit glutamic. Sáng chế còn đề xuất polypeptit dung hợp chứa polypeptit đã phân lập được dung hợp với trình tự axit amin khác loại. Theo một phương án, trình tự axit amin khác loại này là miền Fc hoặc mảnh của nó, và có thể bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:11. Theo phương án khác, polypeptit được dung hợp với miền Fc qua nhóm liên kết và theo phương án khác nữa, nhóm liên kết chứa GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:31). Theo một phương án cụ thể, polypeptit này chứa SEQ ID NO:47. Sáng chế cũng đề xuất multime chứa hai hoặc nhiều polypeptit dung hợp. Dược phẩm chứa polypeptit đã phân lập và tá dược bào chế dược dụng, như hydrogel, cũng được đề xuất. Theo khía cạnh khác, phương pháp điều trị rối loạn chuyển hóa được đề xuất và theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho bệnh nhân cần điều trị dược phẩm được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một phương án, rối loạn chuyển hóa là bệnh đái tháo đường và theo phương án khác, rối loạn chuyển hóa là bệnh béo phì. Axit nucleic mã hóa polypeptit đã phân lập cũng được đề xuất và theo một phương án, axit nucleic này chứa SEQ ID NO:46. Axit nucleic có thể có mặt trong vectơ, và bản thân vectơ này có thể có mặt ở tế bào chủ. Theo một phương án khác nữa, polypeptit này chứa: (a) cải biến cắt cụt ở đầu amino không nhiều hơn 8 gốc axit amin, trong đó polypeptit này có khả năng làm giảm lượng glucoza trong máu ở động vật có vú; (b) cải biến cắt cụt ở đầu carboxyl không nhiều hơn 12 gốc axit amin, trong đó polypeptit này có khả năng làm giảm lượng glucoza trong máu ở động vật có vú; hoặc (c) cải biến cắt cụt ở đầu amino không nhiều hơn 8 gốc axit amin và cải biến cắt cụt ở đầu carboxyl không nhiều hơn 12 gốc axit amin, trong đó polypeptit này có khả năng làm giảm lượng

glucoza trong máu ở động vật có vú. Theo các phương án khác nữa, polypeptit được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều polyme, như PEG.

Theo phương án khác nữa, polypeptit này chứa cải biến thế ở vị trí 98, cải biến thế ở vị trí 171 và cải biến thế ở vị trí 180 của SEQ ID NO:4 và trong đó: (a) cải biến thế ở vị trí 171 được chọn từ nhóm bao gồm alanin, arginin, asparagin, axit aspartic, xystein, axit glutamic, glutamin, glyxin, histidin, lysin, serin, threonin, tryptophan hoặc tyrosin; (b) cải biến thế ở vị trí 98 được chọn từ nhóm bao gồm arginin, xystein, axit glutamic, glutamin, lysin hoặc threonin; và (c) cải biến thế ở vị trí 180 được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, prolin, serin hoặc axit glutamic; và tổ hợp của chúng. Theo phương án khác, gốc ở vị trí 98 là arginin, gốc ở vị trí 171 là glyxin và gốc ở vị trí 180 là axit glutamic. Sáng chế còn đề xuất polypeptit dung hợp chứa polypeptit đã phân lập được dung hợp với trình tự axit amin khác loại. Theo một phương án, trình tự axit amin khác loại này là miền Fc hoặc mảnh của nó, và có thể bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:11. Theo phương án khác, polypeptit được dung hợp với miền Fc qua nhóm liên kết và theo phương án khác nữa, nhóm liên kết chứa GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:31). Theo một phương án cụ thể, polypeptit này chứa SEQ ID NO:47. Sáng chế cũng đề xuất multime chứa hai hoặc nhiều polypeptit dung hợp. Dược phẩm chứa polypeptit đã phân lập và tá dược bào chế dược dụng, như hydrogel, cũng được đề xuất. Theo khía cạnh khác, phương pháp điều trị rối loạn chuyển hóa được đề xuất và theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho bệnh nhân cần điều trị dược phẩm được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một phương án, rối loạn chuyển hóa là bệnh đái tháo đường và theo phương án khác, rối loạn chuyển hóa là bệnh béo phì. Axit nucleic mã hóa polypeptit đã phân lập cũng được đề xuất và theo một phương án, axit nucleic này chứa SEQ ID NO:46. Axit nucleic có thể có mặt trong vectơ, và bản thân vectơ này có thể có mặt ở tế bào chủ. Theo một phương án khác nữa, polypeptit này chứa: (a) cải biến cắt cụt ở đầu amino không nhiều hơn 8 gốc axit amin, trong đó polypeptit này có khả năng làm giảm lượng glucoza trong máu ở động vật có vú; (b) cải biến cắt cụt ở đầu carboxyl không nhiều hơn 12 gốc axit amin, trong đó polypeptit này có khả năng làm giảm lượng glucoza trong máu ở động vật có vú; hoặc (c) cải biến cắt cụt ở đầu amino không nhiều hơn 8 gốc axit amin và cải biến cắt cụt ở đầu carboxyl không nhiều hơn 12 gốc axit amin, trong đó polypeptit này có

khả năng làm giảm lượng glucoza trong máu ở động vật có vú. Theo các phương án khác nữa, polypeptit được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều polyme, như PEG.

Các phương án cụ thể của sáng chế sẽ được thấy rõ từ phần mô tả chi tiết các phương án nhất định và các yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các Fig.1A-1B thể hiện kết quả của thử nghiệm hoạt tính ELK-luxiferaza được thực hiện trên các FGF21 đột biến cắt cụt 7-181 và 8-181 (Fig.1A) và các FGF21 đột biến cắt cụt 1-172, 1-171, 1-169 và 1-164 (Fig.1B); mỗi hình thể hiện kết quả thu được đối với đối chứng FGF21 của người.

Fig.2 thể hiện kết quả của thử nghiệm hoạt tính ELK-luxiferaza được thực hiện trên đối chứng FGF21 của người và các FGF21 đột biến cắt cụt 3-181, 4-181, 5-181, 7-181, 8-181, 1-180, 1-178, 1-177, 1-176, 1-175, 1-174, 1-173, 1-172, 9-181 và 1-149.

Fig.3 thể hiện lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm PBS (cột đặc), đối chứng FGF21 của người (cột rỗng), hoặc các FGF21 đột biến cắt cụt 8-181 (cột gạch chéo hướng xuống bên phải) và 9-181 (cột gạch chéo hướng xuống bên trái).

Fig.4 thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm PBS (hình tròn đặc), đối chứng Fc-FGF21 (WT) (hình tròn rỗng), hoặc các protein dung hợp Fc-FGF21 dạng cắt cụt chứa các gốc axit amin 5-181 (hình tam giác đặc) hoặc 7-181 (hình tam giác rỗng).

Fig.5 thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm PBS (hình tròn đặc), đối chứng FGF21-Fc (WT) (hình tròn rỗng), protein dung hợp FGF21-Fc dạng cắt cụt chứa các gốc 1-175 (hình tam giác đặc), hoặc protein Fc-FGF21 dạng cắt cụt chứa các gốc axit amin 1-171 (hình tam giác rỗng).

Các Fig.6A-6D thể hiện kết quả phân tích sắc ký lỏng - khối phổ (LC-MS) của mẫu đối chứng Fc-(G5)-FGF21 của người (SEQ ID NO:107) (Fig.6A) và các mẫu Fc-(G5)-FGF21 được lấy từ chuột nhắt tại thời điểm 6 giờ (mẫu D6; Fig.6B), 24 giờ (mẫu D24; Fig.6C) và 48 giờ (mẫu D48; Fig.6D) sau khi tiêm.

Các Fig.7A-7D thể hiện kết quả phân tích LC-MS của mẫu đối chứng FGF21-(G3)-Fc của người có nguồn gốc từ động vật có vú (SEQ ID NO:105) (Fig.7A) và các mẫu FGF21-(G3)-Fc được lấy từ chuột nhắt tại thời điểm 6 giờ (mẫu E6; Fig.7B), 24 giờ (mẫu E24; Fig.7C) và 48 giờ (mẫu E48; Fig.7D) sau khi tiêm.

Các Fig.8A-8D thể hiện kết quả phân tích LC-MS của mẫu đối chứng Fc-(L15)-FGF21 (SEQ ID NO:49) (Fig.8A) và các mẫu Fc-(L15)-FGF21 được lấy từ chuột nhắt tại thời điểm 6 giờ (Fig.8B), 24 giờ (Fig.8C) và 48 giờ (Fig.8D) sau khi tiêm.

Các Fig.9A-9D thể hiện kết quả phân tích LC-MS của mẫu đối chứng FGF21-(L15)-Fc (SEQ ID NO:41) (Fig.9A) và các mẫu FGF21-(L15)-Fc được lấy từ chuột nhắt tại thời điểm 6 giờ (Fig.9B), 24 giờ (Fig.9C) và 48 giờ (Fig.9D) sau khi tiêm.

Các Fig.10A-10B thể hiện các vị trí phân cắt được xác định bằng phân tích LC-MS của các protein dung hợp Fc-(L15)-FGF21 (Fig.10A, SEQ ID NO:49) và FGF21-(L15)-Fc (Fig.10B, SEQ ID NO:41) được tiêm vào chuột nhắt.

Fig.11 thể hiện lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm PBS (cột đặc), Fc-(L15)-FGF21 (SEQ ID NO:49) (cột rỗng), hoặc các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 G170E (SEQ ID NO:51) (cột gạch chéo hướng xuống bên trái), Fc-(L15)-FGF21 P171A (SEQ ID NO:53) (cột gạch chéo hướng xuống bên phải), Fc-(L15)-FGF21 S172L (SEQ ID NO:55) (cột gạch chéo kép), Fc-(L15)-FGF21(G170E, P171A, S172L) (SEQ ID NO:59) (cột gạch ngang), hoặc Fc-(L15)-FGF21 G151A (SEQ ID NO:61) (cột gạch bậc thang).

Fig.12 thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm PBS (hình tròn đặc), Fc-(L15)-FGF21 (SEQ ID NO:49) (hình tròn rỗng), hoặc các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 G170E (SEQ ID NO:51) (hình tam giác đặc), Fc-(L15)-FGF21 P171A (SEQ ID NO:53) (hình tam giác rỗng), Fc-(L15)-FGF21 S172L (SEQ ID NO:55) (hình thoi đặc), Fc-(L15)-FGF21(G170E, P171A, S172L) (SEQ ID NO:59) (hình thoi rỗng), hoặc Fc-(L15)-FGF21 G151A (SEQ ID NO:61) (hình vuông đặc).

Fig.13 thể hiện lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm PBS (cột đặc), Fc-(L15)-FGF21 (SEQ ID NO:49) (cột rỗng), hoặc các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-

(L15)-FGF21(P150A, G151A, I152V) (cột gạch chéo hướng xuống bên trái), Fc-(L15)-FGF21 G170E (SEQ ID NO:51) (cột gạch chéo hướng xuống bên phải), Fc-(L15)-FGF21(G170E, P171A) (SEQ ID NO:63) (cột gạch chéo kép), hoặc Fc-(L15)-FGF21(G170E, S172L) (SEQ ID NO:67) (cột gạch ngang).

Fig.14 thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm PBS (hình vuông đặc), Fc-(L15)-FGF21 (SEQ ID NO:49) (hình vuông rỗng), hoặc các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21(P150A, G151A, I152V) (SEQ ID NO:65) (hình tam giác ngược đặc), Fc-(L15)-FGF21 G170E (SEQ ID NO:51) (hình tam giác ngược rỗng), Fc-(L15)-FGF21(G170E, P171A) (SEQ ID NO:63) (hình tròn đặc), hoặc Fc-(L15)-FGF21(G170E, S172L) (SEQ ID NO:67) (hình tròn rỗng).

Fig.15 thể hiện lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm PBS (cột đặc) hoặc các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 G170E (SEQ ID NO:51) (cột rỗng), Fc-(L15)-FGF21 G170A (SEQ ID NO:69) (cột gạch chéo hướng xuống bên trái), Fc-(L15)-FGF21 G170C (SEQ ID NO:71) (cột gạch chéo hướng xuống bên phải), Fc-(L15)-FGF21 G170D (SEQ ID NO:73) (cột gạch chéo kép), Fc-(L15)-FGF21 G170N (SEQ ID NO:75) (cột gạch ngang), hoặc Fc-(L15)-FGF21 G170S (SEQ ID NO:77) (cột gạch bậc thang).

Fig.16 thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm PBS (hình tròn đặc) hoặc các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 G170E (SEQ ID NO:51) (hình tròn rỗng), Fc-(L15)-FGF21 G170A (SEQ ID NO:69) (hình tam giác đặc), Fc-(L15)-FGF21 G170C (SEQ ID NO:71) (hình tam giác rỗng), Fc-(L15)-FGF21 G170D (SEQ ID NO:73) (hình thoi đặc), Fc-(L15)-FGF21 G170N (SEQ ID NO:75) (hình thoi rỗng), hoặc Fc-(L15)-FGF21 G170S (SEQ ID NO:77) (hình tam giác ngược đặc).

Fig.17 thể hiện lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm PBS (cột đặc) hoặc các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 G170E (SEQ ID NO:51) (cột rỗng), Fc-(L15)-FGF21 P171E (SEQ ID NO:79) (cột gạch chéo hướng xuống bên trái), Fc-(L15)-FGF21 P171H (SEQ ID NO:81) (cột gạch chéo hướng xuống bên phải), Fc-(L15)-FGF21 P171Q (SEQ ID NO:83) (cột gạch chéo kép), Fc-(L15)-FGF21 P171T (SEQ ID NO:85) (cột gạch ngang), hoặc Fc-(L15)-FGF21 P171Y (SEQ ID NO:87) (cột gạch bậc thang).

Fig.18 thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm PBS (hình tròn đặc) hoặc các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 G170E (SEQ ID NO:51) (hình tròn rỗng), Fc-(L15)-FGF21 P171E (SEQ ID NO:79) (hình tam giác đặc), Fc-(L15)-FGF21 P171H (SEQ ID NO:81) (hình tam giác rỗng), Fc-(L15)-FGF21 P171Q (SEQ ID NO:83) (hình thoi đặc), Fc-(L15)-FGF21 P171T (SEQ ID NO:85) (hình thoi rỗng), hoặc Fc-(L15)-FGF21 P171Y (SEQ ID NO:87) (hình vuông đặc).

Các Fig.19A-19D thể hiện kết quả phân tích LC-MS của mẫu đối chứng Fc-(L15)-FGF21 (Fig.19A, SEQ ID NO:49) và các mẫu được lấy từ chuột nhắt tại thời điểm 6 giờ (Fig.19B), 24 giờ (Fig.19C) và 48 giờ (Fig.19D) sau khi tiêm.

Các Fig.20A-20D thể hiện kết quả phân tích LC-MS của mẫu đối chứng Fc-(L15)-FGF21 G170E (Fig.20A, SEQ ID NO:51) và các mẫu Fc-(L15)-FGF21 G170E được lấy từ chuột nhắt tại thời điểm 6 giờ (Fig.20B), 24 giờ (Fig.20C) và 48 giờ (Fig.20D) sau khi tiêm.

Các Fig.21A-21D thể hiện kết quả phân tích LC-MS của mẫu đối chứng Fc-(L15)-FGF21 P171A (Fig.21A, SEQ ID NO:53) và các mẫu Fc-(L15)-FGF21 P171A được lấy từ chuột nhắt tại thời điểm 6 giờ (Fig.21B), 24 (Fig.21C) và 48 giờ (Fig.21D) sau khi tiêm.

Các Fig.22A-22D thể hiện kết quả phân tích LC-MS của mẫu đối chứng Fc-(L15)-FGF21 S172L (Fig.22A, SEQ ID NO:55) và các mẫu Fc-(L15)-FGF21 S172L được lấy từ chuột nhắt tại thời điểm 6 giờ (Fig.22B), 24 giờ (Fig.22C) và 48 giờ (Fig.22D) sau khi tiêm.

Các Fig.23A-23D thể hiện các vị trí phân cắt được xác định bằng phân tích LC-MS của các protein dung hợp Fc-(L15)-FGF21 (Fig.23A, SEQ ID NO:49), Fc-(L15)-FGF21 G170E (Fig.23B, SEQ ID NO:51), Fc-(L15)-FGF21 P171A (Fig.23C, SEQ ID NO:53) và Fc-(L15)-FGF21 S172L (Fig.23D, SEQ ID NO:55) được tiêm vào chuột nhắt.

Các Fig.24A-24C thể hiện kết quả của thử nghiệm hoạt tính ELK-luxiferaza được thực hiện trên các FGF21 đột biến FGF21 L99R (SEQ ID NO:109), FGF21 L99D (SEQ ID NO:111) và FGF21 A111T (SEQ ID NO:113) (Fig.24A); các FGF21 đột biến FGF21 A129D (SEQ ID NO:115), FGF21 A129Q (SEQ ID NO:117) và FGF21 A134K (SEQ ID NO:119) (Fig.24B); và các FGF21 đột biến FGF21 A134Y(SEQ ID NO:121), FGF21 A134E (SEQ ID

NO:123) và FGF21 A129K (SEQ ID NO:125) (Fig.24C); mỗi hình thể hiện kết quả thu được đối với đối chứng FGF21 của người.

Các Fig.25A-25D thể hiện kết quả của thử nghiệm hoạt tính ELK-luxiferaza được thực hiện trên các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 P171G (SEQ ID NO:89), Fc-(L15)-FGF21 P171S (SEQ ID NO:91) và Fc-(L15)-FGF21 P171T (SEQ ID NO:85) (Fig.25A); các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 P171Y (SEQ ID NO:87), Fc-(L15)-FGF21 P171W (SEQ ID NO:93) và Fc-(L15)-FGF21 P171C (SEQ ID NO:95) (Fig.25B); Fc-(L15)-FGF21 (SEQ ID NO:49), Fc-(L15)-FGF21 (A45K, G170E) (SEQ ID NO:97) và FGF21 A45K (SEQ ID NO:99) (Fig.25C); và Fc-(L15)-FGF21 (SEQ ID NO:49), Fc-(L15)-FGF21 P171E (SEQ ID NO:79) và Fc-(L15)-FGF21 (A45K, G170E) (SEQ ID NO:97) (Fig.25D); mỗi hình thể hiện kết quả thu được đối với đối chứng FGF21 của người.

Các Fig.26A-B thể hiện sự kết tụ dưới dạng hàm số theo thời gian đối với FGF21 trưởng thành kiểu dại và các FGF21 đột biến khác nhau; Fig.26A thể hiện % thay đổi của sự kết tụ đối với đối chứng FGF21 (WT, hình thoi đặc) và FGF21 A45K (hình tròn đặc) sau khi ủ 65 mg/mL protein ở nhiệt độ 4°C trong 1, 2 và 4 ngày, trong khi đó Fig.26B thể hiện % thay đổi của sự kết tụ đối với đối chứng FGF21 (WT) (SEQ ID NO:4) và FGF21 P78C (SEQ ID NO:127), FGF21 P78R (SEQ ID NO:129), FGF21 L86T (SEQ ID NO:131), FGF21 L86C (SEQ ID NO:133), FGF21 L98C (SEQ ID NO:135), FGF21 L98R (SEQ ID NO:137), FGF21 A111T (SEQ ID NO:113), FGF21 A129D (SEQ ID NO:115), FGF21 A129Q (SEQ ID NO:117), FGF21 A129K (SEQ ID NO:125), FGF21 A134K (SEQ ID NO:119), FGF21 A134Y (SEQ ID NO:121) và FGF21 A134E (SEQ ID NO:123) (tất cả đều được đánh dấu trên đồ thị) sau khi ủ 65 mg/mL protein ở nhiệt độ 4°C trong 1, 6 và 10 ngày.

Fig.27 thể hiện kết quả của thử nghiệm hoạt tính ELK-luxiferaza được thực hiện trên đối chứng FGF21 của người và các FGF21 đột biến FGF21 A45K (SEQ ID NO:99), FGF21 L52T (SEQ ID NO:139) và FGF21 L58E (SEQ ID NO:141).

Fig.28A là đồ thị thể hiện sự thay đổi mức độ kết tụ đối với các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21(6-181, G170E) (SEQ ID NO:101) (hình thoi đặc), Fc-(L15)-FGF21 (A45K, G170E) (SEQ ID NO:97) (hình vuông rỗng), Fc-(L15)-FGF21 P171E (SEQ ID NO:79) (hình tam giác đặc), Fc-(L15)-FGF21 P171A (SEQ ID NO:53) (dấu gạch chéo), Fc-

(L15)-FGF21 G170E (SEQ ID NO:51) (hình tam giác rỗng), và đối chứng FGF21 (hình tròn đặc) sau khi ủ ở 4°C trong 1, 4 và 8 ngày, và Fig.28B là biểu đồ cột cũng thể hiện kết quả của việc ủ.

Fig.29 thể hiện lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm PBS (môi trường dẫn thuốc) (hình tròn đặc) hoặc các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21(A45K, G170E) (SEQ ID NO:97) (hình tròn rỗng), Fc-(L15)-FGF21 (A45K, P171G) (SEQ ID NO:103) (hình tam giác đặc) hoặc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) (hình tam giác rỗng).

Fig.30 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm hoạt tính ELK-luxiferaza được thực hiện trên FGF21 của người (hình tròn đặc, đường nét liền), Fc-(L15)-FGF21 (SEQ ID NO:49) (hình tròn rỗng, đường nét liền) và Fc-(L15) FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) (hình tam giác đặc, đường nét đứt).

Fig.31 là đồ thị thể hiện % kết tụ phân tử lượng cao quan sát được sau chín ngày ở nhiệt độ phòng (Fig.31A) và ở nhiệt độ 4°C (Fig.31B) của FGF21 (SEQ ID NO:4) (hình tròn đặc, đường nét liền), Fc-(L15)-FGF21 (SEQ ID NO:49) (hình tròn rỗng, đường nét liền) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) (hình tam giác đặc, đường nét đứt).

Fig.32 là các vạch khối phổ MALDI thể hiện sự thay đổi quan sát được ở Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) tại các thời điểm khác nhau trong khoảng thời gian 168 giờ.

Fig.33 là đồ thị thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu ở chuột nhắt ob/ob đối với mỗi trong số đối chứng môi trường dẫn thuốc PBS (hình tròn rỗng), FGF21 trưởng thành kiểu dại (hình vuông đặc) và các FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) (hình tam giác ngược đặc), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182P) (SEQ ID NO:143) (hình thoi rỗng) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182G) (SEQ ID NO:145) (hình tròn đặc).

Fig.34 là đồ thị thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu ở chuột nhắt ob/ob đối với mỗi trong số đối chứng môi trường dẫn thuốc PBS (hình tròn đặc) và các FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) (hình tam giác đặc), Fc-(L15)-FGF21

(L98R, P171G, 182G, 183G) (SEQ ID NO:147) (hình tam giác rỗng), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182G) (SEQ ID NO:145) (hình thoi đặc) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182P) (SEQ ID NO:143) (hình thoi rỗng).

Fig.35 là đồ thị thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu ở chuột nhắt ob/ob đối với mỗi trong số đối chứng môi trường dẫn thuốc PBS (hình tròn rỗng) và các FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) (hình vuông đặc), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, Y179S) (SEQ ID NO:149) (hình tam giác rỗng), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, Y179A) (SEQ ID NO:153) (hình tam giác ngược đặc), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180S) (SEQ ID NO:155) (hình thoi rỗng) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180G) (SEQ ID NO:157) (hình tròn đặc).

Fig.36 là đồ thị thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu ở chuột nhắt ob/ob đối với mỗi trong số đối chứng môi trường dẫn thuốc PBS (hình tròn đặc) và các FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) (hình vuông rỗng), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, Y179F) (SEQ ID NO:151) (hình tam giác đặc) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:57) (hình thoi rỗng).

Fig.37 là sơ đồ mô tả thiết kế nghiên cứu cho nghiên cứu tăng liều trong sáu tuần được tiến hành ở khỉ redut. Trên hình vẽ này, các biểu tượng trắng chỉ sự lấy máu ở trạng thái đói và các biểu tượng gạch chéo chỉ sự lấy máu ở trạng thái no.

Các Fig.38A-D là các đồ thị mô tả cách khỉ redut được phân ngẫu nhiên đối với profin OGTT, OGTT AUC và trọng lượng cơ thể; Fig.38A thể hiện lượng glucoza ban đầu trong OGTT1, hình vuông đặc tương ứng với nhóm A, hình tròn đặc, đường nét liền tương ứng với nhóm B và hình tròn rỗng, đường nét đứt tương ứng với nhóm C trước khi các hợp chất hoặc môi trường dẫn thuốc được phân cho mỗi nhóm; Fig.38B thể hiện lượng glucoza ban đầu trong OGTT2, hình vuông đặc tương ứng với nhóm A, hình tròn đặc, đường nét liền tương ứng với nhóm B và hình tròn rỗng, đường nét liền tương ứng với nhóm C trước khi các hợp chất hoặc môi trường dẫn thuốc được phân cho mỗi nhóm; Fig.38C thể hiện lượng glucoza ban đầu đối với các OGTT 1 và 2 được thể hiện theo AUC, cột gạch chéo hướng xuống bên trái tương ứng với nhóm A, cột gạch chéo hướng xuống bên phải tương ứng với nhóm B và cột rỗng tương ứng với nhóm C; và Fig.38D thể hiện trọng lượng cơ thể ban đầu, cột gạch chéo hướng xuống

bên trái tương ứng với nhóm A, cột gạch chéo hướng xuống bên phải tương ứng với nhóm B và cột rỗng tương ứng với nhóm C.

Fig.39 là đồ thị thể hiện % thay đổi của trọng lượng cơ thể so với mức ban đầu của môi trường dẫn thuốc, FGF21 (SEQ ID NO:4) và Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) ở khỉ redut; cột gạch chéo hướng xuống bên trái 1 và 2 tương ứng với tuần 1 và 2 ở liều thấp, cột rỗng 3 và 4 tương ứng với tuần 3 và 4 ở liều trung bình, cột đặc 5 và 6 tương ứng với tuần 5 và 6 ở liều cao và cột gạch chéo hướng xuống bên phải 7, 8 và 9 tương ứng với tuần 7-9 trong giai đoạn đào thải.

Fig.40 là đồ thị thể hiện % thay đổi của insulin lúc đói so với mức ban đầu của môi trường dẫn thuốc, FGF21 (SEQ ID NO:4) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) đối với lượng insulin lúc đói ở khỉ redut; cột gạch chéo hướng xuống bên trái 1 và 2 tương ứng với tuần 1 và 2 ở liều thấp, cột rỗng 3 và 4 tương ứng với tuần 3 và 4 ở liều trung bình, cột đặc 5 và 6 tương ứng với tuần 5 và 6 ở liều cao và cột gạch chéo hướng xuống bên phải 7 và 8 tương ứng với tuần 7 và 8 trong giai đoạn đào thải.

Fig.41 là đồ thị thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, FGF21 (SEQ ID NO:4) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43), được cho dùng ở liều cao, đối với lượng insulin lúc no của khỉ redut thu được trong tuần 5 và 6 của nghiên cứu; cột gạch chéo tương ứng với tuần 5 và cột rỗng tương ứng với tuần 6.

Fig.42 là đồ thị thể hiện profin glucoza trong OGTT5 được tiến hành khi kết thúc hai tuần điều trị liều cao bằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43); hình tròn đặc, đường nét liền tương ứng với môi trường dẫn thuốc, hình vuông rỗng, đường nét đứt tương ứng với FGF21 và hình tam giác đặc, đường nét liền tương ứng với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43).

Fig.43 là đồ thị thể hiện profin insulin trong OGTT5 được tiến hành khi kết thúc hai tuần điều trị liều cao bằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43); hình tròn đặc, đường nét liền tương ứng với môi trường dẫn thuốc, hình vuông rỗng, đường nét đứt tương ứng với FGF21 và hình tam giác đặc, đường nét liền tương ứng với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43).

Fig.44 là đồ thị thể hiện % thay đổi so với mức ban đầu của OGTT AUC3-5 của glucoza được xác định khi kết thúc mỗi giai đoạn dùng liều (liều thấp, trung bình và cao) của khỉ redut; cột rỗng tương ứng với AUC3 được tính toán từ các phép đo glucoza trong OGTT3, cột gạch chéo hướng xuống bên phải tương ứng với AUC4 được tính toán từ các phép đo glucoza trong OGTT4 và cột gạch chéo hướng xuống bên trái tương ứng với AUC5 được tính toán từ các phép đo glucoza trong OGTT5.

Fig.45 là đồ thị thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, FGF21 và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) đối với % thay đổi so với mức ban đầu của lượng triglyxerit trong huyết tương lúc đói từ mỗi nhóm khỉ redut; cột gạch chéo hướng xuống bên trái 1 và 2 tương ứng với tuần 1 và 2 ở liều thấp, cột rỗng 3 và 4 tương ứng với tuần 3 và 4 ở liều trung bình, cột đặc 5 và 6 tương ứng với tuần 5 và 6 ở liều cao và cột gạch chéo hướng xuống bên phải 7, 8 và 9 tương ứng với tuần 7-9 trong giai đoạn đào thải.

Fig.46 là đồ thị thể hiện lượng triglyxerit trong huyết tương lúc no từ mỗi nhóm khỉ redut, được đo trong tuần điều trị thứ năm và thứ sáu bằng môi trường dẫn thuốc, FGF21 hoặc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) ở liều cao; cột gạch chéo tương ứng với tuần 5 và cột rỗng tương ứng với tuần 6.

Fig.47 là đồ thị thể hiện nồng độ FGF21 của người ở các con khỉ riêng rẽ được đo tại thời điểm trước khi dùng liều, và 5, 12, 19 và 26 ngày, với các mẫu thu được tại thời điểm khoảng 21 giờ sau mỗi lần tiêm.

Fig.48 là đồ thị thể hiện nồng độ Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) ở các con khỉ riêng rẽ được đo tại thời điểm trước khi dùng liều, và 5, 12, 19 và 26 ngày, với các mẫu được thu tại thời điểm khoảng 5 ngày sau mỗi lần tiêm.

Fig.49 là đồ thị thể hiện nồng độ trung bình của các nồng độ FGF21 và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) được đo từ ba OGTT được tiến hành sau mỗi liều thấp, trung bình và cao; cột gạch chéo tương ứng với OGTT3 ở liều thấp, cột đặc tương ứng với OGTT4 ở liều trung bình và cột rỗng tương ứng với OGTT5 ở liều cao.

Fig.50 là trình tự axit amin của protein dung hợp Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47); các gốc IgG1 Fc (SEQ ID NO:11) được bôi đậm, nhóm liên kết

(G4S)3 (SEQ ID NO:31) được in nghiêng và các đột biến điểm trong trình tự FGF21 (SEQ ID NO:39) được bôi đậm và gạch chân.

Fig.51 là đồ thị thể hiện sự đáp ứng liều của các hợp chất thử nghiệm trong các thử nghiệm Erk-luxiferaza; Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:57), FGF21 kiểu dại và thể dung hợp Fc với FGF21 kiểu dại được thử nghiệm.

Fig.52 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm liên kết cân bằng dung dịch Biacore của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) đối với □-Klotho của người (bên phải) và của khỉ cynomolgus (bên trái).

Fig.53 là cặp đồ thị thể hiện sự đáp ứng liều của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) ở chuột nhắt db/db sau một lần tiêm đơn lẻ; Fig.53A thể hiện lượng glucoza trong máu ở chuột nhắt db/db tại các thời điểm khác nhau sau khi tiêm môi trường dẫn thuốc hoặc Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E), trong khi đó Fig.53B thể hiện tác dụng của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) đối với trọng lượng cơ thể sau một lần tiêm đơn lẻ vào chuột nhắt db/db.

Fig.54 là sơ đồ thể hiện nghiên cứu tần suất liều của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) ở chuột nhắt DIO.

Fig.55 là đồ thị thể hiện profin GTT của chuột nhắt được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc, Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) hoặc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) ở các tần suất liều khác nhau.

Fig.56 là đồ thị thể hiện sự thay đổi của trọng lượng cơ thể so với mức ban đầu (ngày 0) ở chuột nhắt được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc, Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) hoặc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) ở các tần suất liều khác nhau.

Fig.57 là đồ thị thể hiện kết quả của nghiên cứu *in vitro* của hydrogel chứa FGF21 đột biến FGF21 (L98R, P171G)) (SEQ ID NO:37).

Fig.58 là đồ thị thể hiện tác dụng đối với lượng glucoza trong máu của chuột nhắt db/db 8 tuần tuổi được cho dùng các chế phẩm hydrogel khác nhau.

Fig.59 là đồ thị thể hiện tác dụng đối với lượng glucoza trong máu của chuột nhắt db/db 8 tuần tuổi được cho dùng các chế phẩm hydrogel khác nhau.

Fig.60 là đồ thị thể hiện tác dụng đối với lượng glucoza trong máu của chuột nhắt db/B6 8 tuần tuổi được cho dùng các chế phẩm hydrogel khác nhau; hình tròn đặc thể hiện chuột nhắt được cho dùng hydrogel đối chứng, hình vuông đặc thể hiện chuột nhắt được cho dùng FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:37) trong hydrogel ở 10 mg/kg, hình tam giác đặc thể hiện chuột nhắt được cho dùng FGF21 (L98R, P171G) trong hydrogel ở 30 mg/kg, và hình tam giác ngược thể hiện chuột nhắt được cho dùng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:57) riêng rẽ.

Fig.61 là đồ thị thể hiện % thay đổi lượng glucoza trong máu của chuột nhắt db/B6 8 tuần tuổi được cho dùng các chế phẩm hydrogel khác nhau; hình tròn đặc thể hiện chuột nhắt được cho dùng hydrogel đối chứng, hình vuông đặc thể hiện chuột nhắt được cho dùng FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:37) trong hydrogel ở 10 mg/kg, hình tam giác đặc thể hiện chuột nhắt được cho dùng FGF21 (L98R, P171G) trong hydrogel ở 30 mg/kg, và hình tam giác ngược thể hiện chuột nhắt được cho dùng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:57) riêng rẽ.

Fig.62 là đồ thị thể hiện tác dụng đối với trọng lượng cơ thể của chuột nhắt db/B6 8 tuần tuổi được cho dùng các chế phẩm hydrogel khác nhau; hình tròn đặc thể hiện chuột nhắt được cho dùng hydrogel đối chứng, hình vuông đặc thể hiện chuột nhắt được cho dùng FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:37) trong hydrogel ở 10 mg/kg, hình tam giác đặc thể hiện chuột nhắt được cho dùng FGF21 (L98R, P171G) trong hydrogel ở 30 mg/kg, và hình tam giác ngược thể hiện chuột nhắt được cho dùng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:57) riêng rẽ.

Fig.63 là đồ thị thể hiện % thay đổi của trọng lượng của chuột nhắt db/B6 8 tuần tuổi được cho dùng các chế phẩm hydrogel khác nhau; hình tròn đặc thể hiện chuột nhắt được cho dùng hydrogel đối chứng, hình vuông đặc thể hiện chuột nhắt được cho dùng FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:37) trong hydrogel ở 10 mg/kg, hình tam giác đặc thể hiện chuột nhắt

được cho dùng FGF21 (L98R, P171G) trong hydrogel ở 30 mg/kg, và hình tam giác ngược thể hiện chuột nhắt được cho dùng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:57) riêng rẽ.

Fig.64 là sơ đồ mô tả thiết kế nghiên cứu cho nghiên cứu tăng liều trong chín tuần được tiến hành ở khỉ cynomolgus có khả năng dung nạp glucoza bị suy yếu (IGT).

Fig.65 là đồ thị thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) đối với sự hấp thu thức ăn trong bữa ăn buổi sáng của khỉ cynomolgus IGT được nghiên cứu.

Fig.66 là đồ thị thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) đối với sự hấp thu hoa quả của khỉ cynomolgus IGT được nghiên cứu.

Fig.67 là đồ thị thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) đối với sự hấp thu thức ăn trong bữa ăn buổi chiều của khỉ cynomolgus IGT được nghiên cứu.

Fig.68 là đồ thị thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) đối với trọng lượng cơ thể của khỉ cynomolgus IGT được nghiên cứu.

Fig.69 là đồ thị thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) đối với chỉ số khối lượng cơ thể của khỉ cynomolgus IGT được nghiên cứu.

Fig.70 là đồ thị thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) đối với độ dày nếp da của khỉ cynomolgus IGT được nghiên cứu.

Fig.71 là đồ thị thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) đối với vòng bụng của khỉ cynomolgus IGT được nghiên cứu.

Fig.72 là đồ thị thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) đối với lượng glucoza trong huyết tương của khỉ cynomolgus IGT được nghiên cứu.

Fig.73 là đồ thị thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) đối với sự dung nạp glucoza của khỉ cynomolgus IGT được nghiên cứu.

Fig.74 là đồ thị thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) đối với lượng triglyxerit trong huyết tương của khỉ cynomolgus IGT được nghiên cứu.

Fig.75 là đồ thị thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) đối với lượng tổng cholesterol trong huyết tương của khỉ cynomolgus IGT được nghiên cứu.

Fig.76 là đồ thị thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:47) đối với lượng HDL-cholesterol trong huyết tương của khỉ cynomolgus IGT được nghiên cứu.

Fig.77 là các vạch khối phổ MALDI thể hiện sự thay đổi quan sát được ở Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (phần bên trái, SEQ ID NO:43) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (phần bên phải, SEQ ID NO:57) tại các thời điểm khác nhau trong khoảng thời gian 168 giờ.

Fig.78 là đồ thị thể hiện lượng tương đối (%) của peptit đầu C nguyên chiều dài so với tổng các mảnh peptit đầu C có nguồn gốc từ cả Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) như được phân tích bằng MRM LC/MS/MS sau khi phân giải bằng Asp-N.

Fig.79 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm ELISA đối với nồng độ trong huyết tương của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:57) nguyên chiều dài nguyên vẹn trong khoảng thời gian 240 giờ sau khi tiêm tĩnh mạch ở chuột nhắt.

Fig.80 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm hoạt tính ELK-luxiferaza được thực hiện trên đối chứng âm, FGF21 của người (SEQ ID NO:4) và các FGF21 đột biến glycosyl hoá FGF21 (Y179N, S181T) (SEQ ID NO:161), FGF21 Y179N (SEQ ID NO:163) và FGF21 P124S (SEQ ID NO:165).

Mô tả chi tiết sáng chế

Protein FGF21 của người có các tính chất được tăng cường như thời gian bán hủy tăng và/hoặc sự kết tụ giảm có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này và các phương pháp sinh học phân tử tiêu chuẩn. Tùy ý, thời gian bán hủy có thể được kéo dài hơn nữa bằng cách dung hợp kháng thể, hoặc một phần của nó, vào đầu N hoặc đầu C của trình tự FGF21 kiểu dại. Cũng có thể kéo dài thời gian bán hủy hoặc làm giảm sự kết tụ của protein FGF21 kiểu dại hơn nữa bằng cách đưa cải biến thế axit amin vào protein này. Protein được cải biến như vậy được gọi trong bản mô tả này là thể đột biến, hoặc FGF21 đột biến, và tạo thành các phương án của sáng chế.

Các phương pháp axit nucleic tái tổ hợp được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm trong phần ví dụ thực hiện sáng chế, thường là các phương pháp được nêu trong tài liệu Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) hoặc Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994), cả hai tài liệu này được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn cho mục đích bất kỳ.

1. Định nghĩa chung

Thuật ngữ "phân tử axit nucleic đã phân lập" chỉ phân tử axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này mà (1) đã được tách ra khỏi ít nhất khoảng 50% protein, lipit, cacbon hydrat hoặc các vật liệu khác mà được tìm thấy trong tự nhiên cùng với nó khi toàn bộ axit nucleic được phân lập từ tế bào nguồn, (2) không liên kết với toàn bộ hoặc một phần của polynucleotit mà liên kết với "phân tử axit nucleic đã phân lập" này trong tự nhiên, (3) được liên kết theo cách hoạt động được với polynucleotit mà không liên kết với nó trong tự nhiên, hoặc (4) không có trong tự nhiên dưới dạng một phần của trình tự polynucleotit lớn hơn. Tốt hơn là, phân tử axit nucleic đã phân lập về cơ bản không chứa bất kỳ phân tử axit nucleic tạp nhiễm khác hoặc các chất tạp nhiễm khác mà được tìm thấy trong môi trường tự nhiên của nó

mà sẽ ảnh hưởng tới việc sử dụng nó trong sản xuất polypeptit hoặc việc sử dụng nó trong trị liệu, chẩn đoán, phòng bệnh hoặc nghiên cứu.

Thuật ngữ "vectơ" dùng để chỉ phân tử bất kỳ (ví dụ, axit nucleic, plasmit hoặc virut) được sử dụng để chuyển thông tin mã hóa vào tế bào chủ.

Thuật ngữ "vectơ biểu hiện" chỉ vectơ thích hợp cho việc biến nạp tế bào chủ và chứa trình tự axit nucleic mà điều khiển và/hoặc kiểm soát sự biểu hiện của trình tự axit nucleic khác loại được cài xen. Sự biểu hiện bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các quy trình như phiên mã, dịch mã và tách intron ra khỏi ARN nếu intron có mặt.

Thuật ngữ "được liên kết theo cách hoạt động được" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ sự sắp xếp trình tự kẹp sườn trong đó trình tự kẹp sườn được mô tả như vậy được tạo cấu trúc hoặc được lắp ráp để thực hiện chức năng thông thường của chúng. Do đó, trình tự kẹp sườn được liên kết theo cách hoạt động được với trình tự mã hoá có thể có khả năng thực hiện việc sao chép, phiên mã và/hoặc dịch mã trình tự mã hoá này. Ví dụ, trình tự mã hoá được liên kết theo cách hoạt động được với trình tự khởi đầu khi trình tự khởi đầu này có khả năng điều khiển sự phiên mã của trình tự mã hoá đó. Trình tự kẹp sườn không cần phải tiếp giáp với trình tự mã hoá, miễn là nó hoạt động chính xác. Do đó, ví dụ, trình tự đã được phiên mã nhưng chưa được dịch mã xen giữa có thể có mặt giữa trình tự khởi đầu và trình tự mã hoá, và trình tự khởi đầu này có thể vẫn được coi là "được liên kết theo cách hoạt động được" với trình tự mã hoá.

Thuật ngữ "tế bào chủ" dùng để chỉ tế bào đã được biến nạp hoặc có khả năng được biến nạp với trình tự axit nucleic, như axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này, và sau đó biểu hiện gen quan tâm được chọn. Thuật ngữ này bao gồm thế hệ con của tế bào bố mẹ, cho dù thế hệ con này có giống về hình thái hoặc về cấu trúc di truyền với bố mẹ ban đầu hay không, miễn là có mặt gen được chọn.

Thuật ngữ "polypeptit đã phân lập" chỉ polypeptit được đề xuất trong bản mô tả này mà (1) đã được tách ra khỏi ít nhất khoảng 50% polynucleotit, lipit, cacbon hydrat hoặc các vật liệu khác mà được tìm thấy trong tự nhiên cùng với nó khi được phân lập từ tế bào nguồn, (2) không liên kết (bằng tương tác cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị) với toàn bộ hoặc một phần của polypeptit mà liên kết với "polypeptit đã phân lập" này trong tự nhiên, (3) được liên

kết theo cách hoạt động được (bằng tương tác cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị) với polypeptit mà không liên kết với nó trong tự nhiên, hoặc (4) không có trong tự nhiên. Tốt hơn là, polypeptit đã phân lập về cơ bản không chứa bất kỳ polypeptit tạp nhiễm khác hoặc các chất tạp nhiễm khác mà được tìm thấy trong môi trường tự nhiên của nó mà sẽ ảnh hưởng tới việc sử dụng nó trong trị liệu, chẩn đoán, phòng bệnh hoặc nghiên cứu.

Thuật ngữ "có trong tự nhiên" khi được sử dụng cho vật liệu sinh học như phân tử axit nucleic, polypeptit, tế bào chủ, và dạng tương tự, chỉ vật liệu được tìm thấy trong tự nhiên và không bị thao tác bởi con người. Tương tự, "không có trong tự nhiên" trong bản mô tả này chỉ vật liệu mà không được tìm thấy trong tự nhiên hoặc đã được tổng hợp hoặc cải biến về mặt cấu trúc bởi con người. Khi được sử dụng cho nucleotit, thuật ngữ "có trong tự nhiên" chỉ các bazơ gồm adenin (A), xytosin (C), guanin (G), tymin (T) và uraxil (U). Khi được sử dụng cho axit amin, thuật ngữ "có trong tự nhiên" chỉ 20 axit amin gồm alanin (A), xystein (C), axit aspartic (D), axit glutamic (E), phenylalanin (F), glyxin (G), histidin (H), isoleuxin (I), lysin (K), leuxin (L), metionin (M), asparagin (N), prolin (P), glutamin (Q), arginin (R), serin (S), threonin (T), valin (V), tryptophan (W) và tyrosin (Y).

Thuật ngữ "polypeptit FGF21" chỉ polypeptit kiểu dại có trong tự nhiên được biểu hiện ở người. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "polypeptit FGF21" có thể được sử dụng theo cách thay thế được để chỉ polypeptit FGF21 nguyên chiều dài bất kỳ, ví dụ, các SEQ ID NO:2 và 6 gồm 209 gốc axit amin và được mã hóa bởi các trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và 5 một cách tương ứng; dạng trưởng thành bất kỳ của polypeptit này, ví dụ, các SEQ ID NO:4 và 8 gồm 181 gốc axit amin và được mã hóa bởi các trình tự nucleotit SEQ ID NO:3 và 7 một cách tương ứng, và trong đó 28 gốc axit amin ở đầu amino của polypeptit FGF21 nguyên chiều dài (tức là, các gốc tạo thành peptit tín hiệu) đã được loại bỏ. Polypeptit FGF21 nguyên chiều dài và trưởng thành có thể chứa, nhưng không bắt buộc, metionin đầu amino, mà có thể được đưa vào bằng cách thiết kế hoặc là kết quả của quy trình biểu hiện ở vi khuẩn.

Các thuật ngữ "polypeptit FGF21 đột biến" và "FGF21 đột biến" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau và chỉ polypeptit FGF21 trong đó trình tự axit amin FGF21 có trong tự nhiên (ví dụ, các SEQ ID NO:2, 4, 6 hoặc 8) đã được cải biến. Các cải biến này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều cải biến thế axit amin, bao gồm cải biến thế bằng axit amin

không có trong tự nhiên và chất tương tự axit amin không có trong tự nhiên, và cải biến cắt cụt. Theo đó, polypeptit FGF21 đột biến bao gồm, nhưng không giới hạn ở, FGF21 đột biến định hướng vị trí, polypeptit FGF21 dạng cắt cụt, FGF21 đột biến kháng phân giải protein, FGF21 đột biến giảm kết tụ, FGF21 đột biến kết hợp và protein dung hợp FGF21, như được nêu trong bản mô tả này. Nhằm mục đích xác định cải biến cắt cụt và cải biến thế axit amin cụ thể của FGF21 đột biến theo sáng chế, việc đánh số gốc axit amin được cắt cụt hoặc được gây đột biến tương ứng với việc đánh số của polypeptit FGF21 trưởng thành gồm 181 gốc. FGF21 đột biến có thể chứa, nhưng không bắt buộc, metionin đầu amino, mà có thể được đưa vào bằng cách thiết kế hoặc là kết quả của quy trình biểu hiện ở vi khuẩn. Theo các phương án khác của sáng chế, polypeptit FGF21 đột biến chứa trình tự axit amin giống ít nhất khoảng 85% với trình tự axit amin của FGF21 đột biến, nhưng trong đó các gốc cụ thể mà mang lại tính chất mong muốn cho polypeptit FGF21 đột biến, ví dụ, tính chất kháng phân giải protein, tăng thời gian bán hủy hoặc giảm kết tụ và tổ hợp của chúng, không được cải biến thêm. Nói cách khác, ngoại trừ các gốc trong trình tự FGF21 đột biến mà đã được cải biến để mang lại tính chất kháng phân giải protein, giảm kết tụ hoặc các tính chất khác, thì khoảng 15% của tất cả các gốc axit amin còn lại trong trình tự FGF21 đột biến có thể được cải biến. Ví dụ, trong thể đột biến FGF21 Q173E, lên đến 15% của tất cả các gốc axit amin còn lại không phải là gốc axit glutamic, mà đã được thế cho glutamin ở vị trí 173, có thể được cải biến. Theo các phương án khác nữa, polypeptit FGF21 đột biến chứa trình tự axit amin giống ít nhất khoảng 90%, hoặc khoảng 95, 96, 97, 98 hoặc 99%, với trình tự axit amin của FGF21 đột biến, nhưng trong đó các gốc cụ thể mà mang lại tính chất kháng phân giải protein hoặc giảm kết tụ của polypeptit FGF21 đột biến không được cải biến thêm. Polypeptit FGF21 đột biến này có ít nhất một hoạt tính của polypeptit FGF21 kiểu dại.

Sáng chế cũng bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit FGF21 đột biến chứa trình tự axit amin giống ít nhất khoảng 85% với trình tự axit amin của FGF21 đột biến, nhưng trong đó các gốc cụ thể mà mang lại tính chất mong muốn cho polypeptit FGF21 đột biến, ví dụ, tính chất kháng phân giải protein, tăng thời gian bán hủy hoặc giảm kết tụ và tổ hợp của chúng, không được cải biến thêm.

Nói cách khác, ngoại trừ các gốc trong trình tự FGF21 đột biến mà đã được cải biến để mang lại tính chất kháng phân giải protein, giảm kết tụ hoặc các tính chất khác, thì khoảng

15% của tất cả các gốc axit amin còn lại trong trình tự FGF21 đột biến có thể được cải biến. Ví dụ, trong thể đột biến FGF21 Q173E, lên đến 15% của tất cả các gốc axit amin còn lại không phải là gốc axit glutamic, mà đã được thế cho glutamin ở vị trí 173, có thể được cải biến. Sáng chế cũng bao gồm phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit giống ít nhất khoảng 90%, hoặc khoảng 95, 96, 97, 98 hoặc 99%, với trình tự nucleotit mã hóa FGF21 đột biến, nhưng trong đó các nucleotit mã hóa các gốc axit amin mang lại tính chất kháng phân giải protein hoặc giảm kết tụ của polypeptit FGF21 đột biến được mã hóa không được cải biến thêm. Phân tử axit nucleic này mã hóa polypeptit FGF21 đột biến có ít nhất một hoạt tính của polypeptit FGF21 kiểu dại.

Thuật ngữ "polypeptit FGF21 đột biến có hoạt tính sinh học" chỉ polypeptit FGF21 đột biến bất kỳ nêu trong bản mô tả này mà có hoạt tính của polypeptit FGF21 kiểu dại, như khả năng làm giảm glucoza, insulin, triglyxerit hoặc cholesterol trong máu; làm giảm trọng lượng cơ thể; và cải thiện sự dung nạp glucoza, sự tiêu thụ năng lượng hoặc độ nhạy insulin, bất kể loại hoặc số lượng cải biến đã được đưa vào polypeptit FGF21 đột biến. Tuy nhiên, polypeptit FGF21 đột biến có mức hoạt tính FGF21 giảm một chút so với polypeptit FGF21 kiểu dại cũng có thể được coi là polypeptit FGF21 đột biến có hoạt tính sinh học.

Các thuật ngữ "lượng có hiệu quả" và "lượng có hiệu quả trị liệu" chỉ lượng của polypeptit FGF21 đột biến được sử dụng để tạo ra mức quan sát được của một hoặc nhiều hoạt tính sinh học của polypeptit FGF21 kiểu dại, như khả năng làm giảm lượng glucoza, insulin, triglyxerit hoặc cholesterol trong máu; làm giảm trọng lượng cơ thể; hoặc cải thiện sự dung nạp glucoza, sự tiêu thụ năng lượng hoặc độ nhạy insulin.

Các thuật ngữ "chất mang dược dụng" hoặc "chất mang chấp nhận được về mặt sinh lý" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ một hoặc nhiều tá dược bào chế thích hợp để đạt được hoặc tăng cường việc đưa polypeptit FGF21 đột biến vào cơ thể của người hoặc đối tượng không phải người. Thuật ngữ này bao gồm bất kỳ hoặc tất cả các dung môi, môi trường phân tán, lớp bao, chất kháng khuẩn và kháng nấm, chất đẳng trương và làm chậm hấp thụ, và dạng tương tự mà tương thích về mặt sinh lý. Ví dụ về chất mang dược dụng bao gồm một hoặc nhiều loại trong số nước, nước muối, nước muối đệm phosphat, dextroza, glyxerol, etanol và chất tương tự, cũng như tổ hợp của chúng. Trong một số trường hợp, tốt hơn là bao gồm

chất đẳng trương, ví dụ, đường, rượu polyhydric như manitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong dược phẩm. Chất dược dụng như chất thấm ướt hoặc lượng nhỏ của chất bổ trợ như chất thấm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất bảo quản hoặc chất đệm, mà làm tăng thời hạn sử dụng hoặc hiệu quả của polypeptit FGF21 đột biến cũng có thể đóng vai trò làm, hoặc tạo thành thành phần của, chất mang.

Thuật ngữ "kháng nguyên" chỉ phân tử hoặc một phần của phân tử có khả năng được liên kết bởi kháng thể, và ngoài ra còn có khả năng được sử dụng ở động vật để tạo ra kháng thể có khả năng liên kết với epitop của kháng nguyên đó. Kháng nguyên có thể có một hoặc nhiều epitop.

Thuật ngữ "Fc nguyên gốc" chỉ phân tử hoặc trình tự chứa trình tự của mảnh không liên kết kháng nguyên thu được bằng cách phân giải kháng thể nguyên vẹn hoặc được tạo ra theo cách khác, ở dạng monome hoặc multime, và có thể chứa vùng bản lề. Nguồn globulin miễn dịch gốc của Fc nguyên gốc tốt hơn là, nhưng không bắt buộc, có nguồn gốc từ người và có thể là globulin miễn dịch bất kỳ, mặc dù IgG1 và IgG2 được ưu tiên. IgG4 cũng có thể được sử dụng. Phân tử Fc nguyên gốc được tạo thành từ các polypeptit monome mà có thể được liên kết thành dạng dime hoặc multime bằng cách liên kết cộng hóa trị (tức là, liên kết disulfua) và liên kết không cộng hóa trị. Số lượng liên kết disulfua liên phân tử giữa các tiểu đơn vị monome của phân tử Fc nguyên gốc nằm trong khoảng từ 1 đến 4 tùy thuộc vào lớp (ví dụ, IgG, IgA và IgE) hoặc phân lớp (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgGA2). Một ví dụ về Fc nguyên gốc là dime được liên kết disulfua thu được bằng cách phân giải IgG bằng papain (xem tài liệu Ellison et al., 1982, Nucleic Acid Res. 10: 4071-9). Thuật ngữ "Fc nguyên gốc" trong bản mô tả này là thuật ngữ chung cho các dạng monome, dime và multime. Ví dụ về trình tự polypeptit Fc được thể hiện trong SEQ ID NO:11, mà có nguồn gốc từ phân tử IgG1 của người. Fc nguyên gốc có thể chứa, nhưng không bắt buộc, metionin đầu amino, mà có thể được đưa vào bằng cách thiết kế hoặc là kết quả của quy trình biểu hiện ở vi khuẩn; phân tử Fc này cũng được coi là phân tử "Fc nguyên gốc".

Thuật ngữ "biến thể Fc" chỉ phân tử hoặc trình tự được cải biến từ Fc nguyên gốc nhưng vẫn chứa vị trí liên kết cho thụ thể cứu trợ, FcRn (thụ thể Fc mới sinh). Các công bố đơn quốc tế số WO 97/34631 và WO 96/32478 mô tả các biến thể Fc tiêu biểu, cũng như sự tương tác

với thụ thể cứu trợ, và được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Như vậy, thuật ngữ "biến thể Fc" có thể bao gồm phân tử hoặc trình tự được nhân hóa (humanized) từ Fc nguyên gốc không phải của người. Ngoài ra, Fc nguyên gốc còn bao gồm vùng có thể được loại bỏ vì chúng tạo ra đặc điểm cấu trúc hoặc hoạt tính sinh học không cần thiết cho phân tử dung hợp của FGF21 đột biến theo sáng chế. Như vậy, thuật ngữ "biến thể Fc" bao gồm phân tử hoặc trình tự thiếu một hoặc nhiều vị trí hoặc gốc Fc nguyên gốc, hoặc trong đó một hoặc nhiều vị trí hoặc gốc Fc đã được cải biến, mà ảnh hưởng hoặc liên quan đến: (1) sự tạo thành liên kết disulfua, (2) tính không tương thích với tế bào chủ được chọn, (3) tính không đồng nhất đầu N khi biểu hiện ở tế bào chủ được chọn, (4) sự glycosyl hoá, (5) sự tương tác với bổ thể, (6) liên kết với thụ thể Fc không phải là thụ thể cứu trợ, hoặc (7) khả năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Biến thể Fc được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Biến thể Biến thể Fc có thể chứa, nhưng không bắt buộc, metionin đầu amino, mà có thể được đưa vào bằng cách thiết kế hoặc là kết quả của quy trình biểu hiện ở vi khuẩn; phân tử Fc này cũng được coi là "biến thể Fc".

Thuật ngữ "miền Fc" bao gồm Fc nguyên gốc và biến thể Fc và trình tự như được xác định ở trên. Như đối với các biến thể Fc và phân tử Fc nguyên gốc, thuật ngữ "miền Fc" bao gồm phân tử ở dạng monome hoặc multime, mà được phân giải từ kháng thể nguyên vẹn hoặc được tạo ra theo cách khác. Theo một số phương án của sáng chế, miền Fc có thể được dung hợp với FGF21 hoặc FGF21 đột biến (bao gồm dạng cắt cụt của FGF21 hoặc FGF21 đột biến) thông qua, ví dụ, liên kết cộng hóa trị giữa miền Fc và trình tự FGF21. Protein dung hợp này có thể tạo thành multime thông qua việc kết hợp miền Fc và cả protein dung hợp và multime của chúng đều là các khía cạnh của sáng chế. Miền Fc có thể chứa, nhưng không bắt buộc, metionin đầu amino, mà có thể được đưa vào bằng cách thiết kế hoặc là kết quả của quy trình biểu hiện ở vi khuẩn.

2. FGF21 đột biến

Thuật ngữ "FGF21 đột biến" chỉ polypeptit FGF21 đột biến có trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của trình tự polypeptit FGF21 có trong tự nhiên, ví dụ, các SEQ ID NO:2, 4, 6 hoặc 8, bởi một hoặc nhiều axit amin. FGF21 đột biến có thể được tạo ra bằng cách

đưa vào một hoặc nhiều cải biến thế axit amin, bảo toàn hoặc không bảo toàn, và sử dụng axit amin có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên, ở vị trí cụ thể của polypeptit FGF21.

"Cải biến thế axit amin bảo toàn" có thể bao gồm cải biến thế gốc axit amin nguyên gốc (tức là, gốc được tìm thấy ở vị trí xác định của trình tự polypeptit FGF21 kiểu dại) bằng gốc không nguyên gốc (tức là, gốc không được tìm thấy ở vị trí xác định của trình tự polypeptit FGF21 kiểu dại) sao cho có ít hoặc không ảnh hưởng đến sự phân cực hoặc điện tích của gốc axit amin ở vị trí đó. Cải biến thế axit amin bảo toàn cũng bao gồm gốc axit amin không có trong tự nhiên mà thường được kết hợp vào bằng cách tổng hợp peptit hóa học chứ không phải là bằng cách tổng hợp trong hệ sinh học. Thuật ngữ này bao gồm thể bắt chước peptit và dạng đảo ngược hoặc nghịch đảo khác của gốc axit amin.

Các gốc có trong tự nhiên có thể được chia thành các nhóm dựa trên các tính chất chuỗi bên phổ biến:

(1) kỵ nước: norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr;

(3) có tính axit: Asp, Glu;

(4) có tính bazơ: Asn, Gln, His, Lys, Arg;

(5) gốc có ảnh hưởng đến sự định hướng chuỗi: Gly, Pro; và

(6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Cải biến thế bảo toàn có thể gồm có sự trao đổi thành viên thuộc một trong số các nhóm này bằng thành viên khác thuộc cùng nhóm. Cải biến thế không bảo toàn có thể gồm có sự trao đổi thành viên thuộc một trong số các nhóm này bằng thành viên thuộc nhóm khác.

Cải biến thế axit amin mong muốn (cho dù là bảo toàn hay không bảo toàn) có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tại thời điểm cải biến thế này được mong muốn. Danh sách làm ví dụ (nhưng không làm giới hạn) của các cải biến thế axit amin được nêu trong bảng 1.

Bảng 1

Các cải biến thế axit amin

Gốc ban đầu	Cải biến thế làm ví dụ
Ala	Val, Leu, Ile
Arg	Lys, Gln, Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg, Gln, Asn
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr, Ala, Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala

3. Polypeptit FGF21 dạng cắt cụt

Một phương án của sáng chế đề xuất dạng cắt cụt của polypeptit FGF21 trưởng thành hoặc FGF21 đột biến. Phương án này của sáng chế nảy sinh từ nỗ lực nhằm xác định polypeptit FGF21 dạng cắt cụt mà có khả năng tạo ra hoạt tính tương tự, và trong một số ví dụ là cao hơn, dạng không cắt cụt của polypeptit FGF21 trưởng thành.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "polypeptit FGF21 dạng cắt cụt" chỉ polypeptit FGF21 trong đó gốc axit amin đã được loại bỏ khỏi đầu amino (hoặc đầu N) của polypeptit FGF21, gốc axit amin đã được loại bỏ khỏi đầu carboxyl (hoặc đầu C) của polypeptit FGF21, hoặc gốc axit amin đã được loại bỏ khỏi cả đầu amino và đầu carboxyl của polypeptit FGF21. Các cải biến cắt cụt khác nhau nêu trong bản mô tả này được tạo ra như được mô tả trong các ví dụ 3 và 6 trong bản mô tả này.

Hoạt tính của polypeptit FGF21 dạng cắt cụt đầu N và polypeptit FGF21 dạng cắt cụt đầu C có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm ELK-luxiferaza *in vitro* như được mô tả trong ví dụ 4. Chi tiết cụ thể về thử nghiệm *in vitro* mà có thể được sử dụng để kiểm tra hoạt tính của polypeptit FGF21 dạng cắt cụt có thể được tìm thấy ở ví dụ 4.

Hoạt tính của polypeptit FGF21 dạng cắt cụt theo sáng chế cũng có thể được đánh giá trong thử nghiệm *in vivo*, như chuột nhắt db/db hoặc chuột nhắt ob/ob như được thể hiện trong các ví dụ 5 và 7. Thông thường, để đánh giá hoạt tính *in vivo* của polypeptit FGF21 dạng cắt cụt, polypeptit FGF21 dạng cắt cụt này có thể được dùng cho động vật thử nghiệm theo đường trong màng bụng. Sau khoảng thời gian ủ mong muốn (ví dụ, một giờ hoặc lâu hơn), mẫu máu có thể được lấy, và lượng glucoza trong máu có thể được đo. Chi tiết cụ thể về thử nghiệm in vivo mà có thể được sử dụng để kiểm tra hoạt tính của polypeptit FGF21 dạng cắt cụt có thể được tìm thấy ở các ví dụ 5 và 7.

a. Cải biến cắt cụt đầu N

Theo một số phương án của sáng chế, cải biến cắt cụt đầu N bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8 gốc axit amin từ đầu N của polypeptit FGF21 trưởng thành hoặc FGF21 đột biến. Như đã được chứng minh trong, ví dụ, ví dụ 5 và Fig.3, polypeptit FGF21 dạng cắt cụt có cải biến cắt cụt đầu N gồm ít hơn 9 gốc axit amin giữ lại được khả năng làm giảm glucoza trong máu ở cá thể của polypeptit FGF21 trưởng thành. Do đó, theo các phương án cụ thể, sáng chế bao gồm dạng cắt cụt của polypeptit FGF21 trưởng thành hoặc polypeptit FGF21 đột biến có cải biến cắt cụt đầu N gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8 gốc axit amin.

b. Cải biến cắt cụt đầu C

Theo một số phương án của sáng chế, cải biến cắt cụt đầu C bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 hoặc 12 gốc axit amin từ đầu C của polypeptit FGF21 trưởng thành. Như đã được chứng minh trong, ví dụ, ví dụ 4 và Fig.1B, polypeptit FGF21 dạng cắt cụt có cải biến cắt cụt đầu C gồm ít hơn 13 gốc axit amin thể hiện hiệu quả bằng ít nhất 50% hiệu quả của FGF21 kiểu dại trong thử nghiệm ELK-luxiferaza *in vitro*, cho thấy rằng FGF21 đột biến này giữ lại được khả năng làm giảm glucoza trong máu ở cá thể của polypeptit FGF21 trưởng thành. Do đó, theo các phương án cụ thể, sáng chế bao gồm dạng cắt cụt của polypeptit FGF21 trưởng

thành hoặc polypeptit FGF21 đột biến có cải biến cắt cụt đầu C gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 hoặc 12 gốc axit amin.

c. Cải biến cắt cụt đầu N và đầu C

Theo một số phương án của sáng chế, polypeptit FGF21 dạng cắt cụt có thể chứa tổ hợp của các cải biến cắt cụt đầu N và đầu C. Polypeptit FGF21 dạng cắt cụt chứa tổ hợp của các cải biến cắt cụt đầu N và đầu C cũng có hoạt tính của polypeptit FGF21 dạng cắt cụt tương ứng mà chỉ có cải biến cắt cụt đầu N hoặc đầu C đơn lẻ. Nói cách khác, polypeptit FGF21 dạng cắt cụt có cả cải biến cắt cụt đầu N gồm ít hơn 9 gốc axit amin và cải biến cắt cụt đầu C gồm ít hơn 13 gốc axit amin có hoạt tính sinh học tương tự hoặc lớn hơn, ví dụ, hoạt tính làm giảm glucoza trong máu, so với polypeptit FGF21 dạng cắt cụt có cải biến cắt cụt đầu N gồm ít hơn 9 gốc axit amin hoặc polypeptit FGF21 dạng cắt cụt có cải biến cắt cụt đầu C gồm ít hơn 13 gốc axit amin. Do đó, theo các phương án cụ thể, sáng chế bao gồm dạng cắt cụt của polypeptit FGF21 trưởng thành hoặc polypeptit FGF21 đột biến có cả cải biến cắt cụt đầu N gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8 gốc axit amin và cải biến cắt cụt đầu C gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 hoặc 12 gốc axit amin.

Như đối với tất cả các FGF21 đột biến theo sáng chế, polypeptit FGF21 dạng cắt cụt và FGF21 đột biến có thể tùy ý chứa gốc metionin đầu amino, mà có thể được đưa vào bằng cách gây đột biến định hướng hoặc là kết quả của quy trình biểu hiện ở vi khuẩn.

Polypeptit FGF21 dạng cắt cụt theo sáng chế có thể được tạo ra như được mô tả trong các ví dụ 3 và 6. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, mà đã quen với các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn, có thể ứng dụng hiểu biết đó, kết hợp với bản mô tả này, để tạo ra và sử dụng polypeptit FGF21 dạng cắt cụt theo sáng chế. Các kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng cho ADN tái tổ hợp, tổng hợp oligonucleotit, nuôi cấy mô và biến nạp (ví dụ, xung điện, chuyển nhiễm qua liposom). Xem tài liệu, ví dụ, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, nêu trên, tài liệu này được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn cho mục đích bất kỳ. Phản ứng enzym và kỹ thuật tinh chế có thể được tiến hành theo mô tả của nhà sản xuất, như thường được thực hiện trong lĩnh vực này, hoặc như được nêu trong bản mô tả này. Trừ khi có định nghĩa cụ thể khác, các danh pháp được sử dụng liên quan đến, và các quy trình và kỹ thuật phòng thí nghiệm về, hóa học phân tích, hóa

học hữu cơ tổng hợp và hóa dược và y tế nêu trong bản mô tả này là đã biết và thường được sử dụng trong lĩnh vực. Các kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng để tổng hợp hóa học; phân tích hóa học; điều chế, bào chế và đưa dược phẩm vào cơ thể; và điều trị bệnh nhân.

Polypeptit FGF21 dạng cắt cụt theo sáng chế cũng có thể được dung hợp với thực thể khác, mà có thể mang lại tính chất bổ sung cho polypeptit FGF21 dạng cắt cụt này. Theo một phương án của sáng chế, polypeptit FGF21 dạng cắt cụt này có thể được dung hợp với trình tự Fc. Sự dung hợp này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp sinh học phân tử đã biết và/hoặc hướng dẫn nêu trong bản mô tả này. Lợi ích của polypeptit dung hợp này, cũng như phương pháp tạo ra polypeptit dung hợp này, được thảo luận chi tiết hơn trong bản mô tả này.

4. FGF21 đột biến kháng phân giải protein

Như được mô tả trong ví dụ 8, FGF21 trưởng thành được phát hiện thấy là trải qua sự phân hủy *in vivo*, mà cuối cùng được xác định là bắt nguồn từ sự tấn công phân giải protein. Sự phân hủy *in vivo* của FGF21 trưởng thành được phát hiện thấy là dẫn đến thời gian bán hủy hiệu dụng ngắn hơn, mà có thể ảnh hưởng bất lợi đến tiềm năng trị liệu của phân tử. Do đó, nghiên cứu định hướng được tiến hành để xác định FGF21 đột biến mà thể hiện tính kháng phân giải protein. Kết quả của nghiên cứu này là, các vị trí trong polypeptit FGF21 trưởng thành mà được xác định là đặc biệt mẫn cảm với sự phân giải protein bao gồm liên kết peptit giữa các gốc axit amin ở các vị trí 4-5, 20-21, 151-152, 171-172 và 178-181.

Nghiên cứu rộng nhưng có định hướng và tập trung được tiến hành để xác định cải biến thế cụ thể mà loại bỏ hiệu quả phân giải protein quan sát được trong khi không ảnh hưởng đến hoạt tính của protein đến mức độ không chấp nhận được. Các bảng 8 và 11 nêu rõ một số thể đột biến mà được tạo ra và được thử nghiệm. Như được mô tả trong, ví dụ, các ví dụ 13 và 14, không phải tất cả các FGF21 đột biến đều thể hiện profin lý tưởng; một số thể đột biến mang lại tính kháng phân giải protein nhưng giá phải trả là hoạt tính FGF21 suy giảm. Các thể đột biến khác giữ lại được hoạt tính FGF21 nhưng không mang lại tính kháng phân giải protein. Một số thể đột biến, bao gồm, ví dụ, FGF21 P171G, giữ lại được mức hoạt tính tương tự như FGF21 kiểu dại trong khi cũng thể hiện tính kháng đối với sự phân hủy phân giải protein.

Một tiêu chí chọn lọc để xác định FGF21 đột biến kháng phân giải protein mong muốn là hoạt tính của FGF21 đột biến này về cơ bản phải giống như, hoặc lớn hơn, hoạt tính của FGF21 kiểu dại. Do đó, phương án khác của sáng chế đề xuất FGF21 đột biến có tính kháng phân giải protein và vẫn giữ lại được hoạt tính mà về cơ bản giống như, hoặc lớn hơn, FGF21 kiểu dại. Mặc dù ít được mong muốn hơn, trong một số trường hợp, FGF21 đột biến có tính kháng phân giải protein nhưng thể hiện hoạt tính giảm một chút cũng tạo thành phương án khác của sáng chế. Trong một số trường hợp, có thể mong muốn duy trì mức độ phân giải protein, và do đó, FGF21 đột biến mà cho phép mức độ phân giải protein nào đó diễn ra cũng tạo thành phương án khác của sáng chế.

Như đối với tất cả các FGF21 đột biến được đề xuất trong bản mô tả này, FGF21 đột biến kháng phân giải protein theo sáng chế có thể được tạo ra như được nêu trong bản mô tả này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, người đã quen với các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn, có thể ứng dụng hiểu biết đó, kết hợp với bản mô tả này, để tạo ra và sử dụng FGF21 đột biến kháng phân giải protein được bộc lộ trong bản mô tả này. Các kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng cho ADN tái tổ hợp, tổng hợp oligonucleotit, nuôi cấy mô và biến nạp (ví dụ, xung điện, chuyển nhiễm qua liposom). Xem tài liệu, ví dụ, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, nêu trên, tài liệu này được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn cho mục đích bất kỳ. Phản ứng enzym và kỹ thuật tinh chế có thể được tiến hành theo mô tả của nhà sản xuất, như thường được thực hiện trong lĩnh vực này, hoặc như được nêu trong bản mô tả này. Trừ khi có định nghĩa cụ thể khác, các danh pháp được sử dụng liên quan đến, và các quy trình và kỹ thuật phòng thí nghiệm về, hóa học phân tích, hóa học hữu cơ tổng hợp và hóa dược và y tế nêu trong bản mô tả này là đã biết và thường được sử dụng trong lĩnh vực. Các kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng để tổng hợp hóa học; phân tích hóa học; điều chế, bào chế và đưa dược phẩm vào cơ thể; và điều trị bệnh nhân.

FGF21 đột biến kháng phân giải protein theo sáng chế có thể được dung hợp với thực thể khác, mà có thể mang lại tính chất bổ sung cho FGF21 đột biến kháng phân giải protein này. Theo một phương án của sáng chế, FGF21 đột biến kháng phân giải protein có thể được dung hợp với trình tự IgG Fc, ví dụ, SEQ ID NO:11. Sự dung hợp này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp sinh học phân tử đã biết và/hoặc hướng dẫn nêu trong

bản mô tả này. Lợi ích của polypeptit dung hợp này, cũng như phương pháp tạo ra polypeptit dung hợp này, là đã biết và được thảo luận chi tiết hơn trong bản mô tả này.

5. FGF21 đột biến giảm kết tụ

Như được mô tả trong ví dụ 15, một tính chất của polypeptit FGF21 kiểu dại là xu hướng kết tụ. Ở nồng độ lớn hơn khoảng 5 mg/mL, tốc độ kết tụ là cao ở nhiệt độ phòng. Như được thể hiện và mô tả ở đây, tốc độ kết tụ của polypeptit FGF21 kiểu dại phụ thuộc vào cả nồng độ và nhiệt độ.

Sự kết tụ có thể là một thách thức khi làm việc với FGF21 kiểu dại ở các nồng độ này, như trong bối cảnh bào chế chất trị liệu. Do đó, nghiên cứu định hướng được tiến hành để xác định FGF21 đột biến mà thể hiện sự kết tụ FGF21 giảm. Sau đó, FGF21 đột biến thu được được thử nghiệm về xu hướng kết tụ ở các nồng độ khác nhau.

Nghiên cứu rộng nhưng có định hướng và tập trung được tiến hành để xác định cải biến thế cụ thể mà loại bỏ hoặc làm giảm hiệu quả kết tụ quan sát được của FGF21 kiểu dại trong khi không ảnh hưởng đến hoạt tính của protein đến mức độ không chấp nhận được. Phương pháp xác định thể đột biến giảm kết tụ thích hợp được mô tả trong ví dụ 15. Bảng 16 nêu rõ một số thể đột biến mà được tạo ra và được thử nghiệm. Như được mô tả trong, ví dụ, ví dụ 17, không phải tất cả các FGF21 đột biến đều thể hiện profin lý tưởng. Một số thể đột biến, như FGF21 L58E, có hoạt tính FGF21 suy giảm và không được nghiên cứu thêm. Các thể đột biến khác, như FGF21 A134E, giữ lại được hoạt tính FGF21 nhưng không mang lại tính chất giảm kết tụ. Một số thể đột biến, như FGF21 L98R, giữ lại được hoạt tính FGF21 và cũng thể hiện sự kết tụ giảm. Một thể đột biến, FGF21 A45K, bất ngờ thể hiện hoạt tính FGF21 tăng trong khi cũng thể hiện tính chất giảm kết tụ.

Một tiêu chí chọn lọc để xác định FGF21 đột biến giảm kết tụ mong muốn là hoạt tính của FGF21 đột biến này về cơ bản phải tương tự với, hoặc lớn hơn, hoạt tính của FGF21 kiểu dại. Do đó, phương án khác của sáng chế đề xuất FGF21 đột biến có tính chất giảm kết tụ trong khi vẫn giữ lại được hoạt tính FGF21 mà tương tự với, hoặc lớn hơn, FGF21 kiểu dại. Mặc dù ít được mong muốn hơn, trong một số trường hợp, FGF21 đột biến có tính chất giảm kết tụ nhưng thể hiện hoạt tính FGF21 giảm một chút cũng tạo thành phương án khác của sáng

chế. Trong một số trường hợp, có thể mong muốn duy trì mức độ kết tụ, và do đó, FGF21 đột biến mà cho phép mức độ kết tụ nào đó diễn ra cũng tạo thành phương án khác của sáng chế.

Như đối với tất cả các FGF21 đột biến được đề xuất trong bản mô tả này, FGF21 đột biến giảm kết tụ được đề xuất trong bản mô tả này có thể được tạo ra như được nêu trong bản mô tả này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, mà đã quen với các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn, có thể ứng dụng hiểu biết đó, kết hợp với bản mô tả này, để tạo ra và sử dụng FGF21 đột biến giảm kết tụ theo sáng chế. Các kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng cho ADN tái tổ hợp, tổng hợp oligonucleotit, nuôi cấy mô và biến nạp (ví dụ, xung điện, chuyển nhiễm qua liposom). Xem tài liệu, ví dụ, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, nêu trên, tài liệu này được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn cho mục đích bất kỳ. Phản ứng enzym và kỹ thuật tinh chế có thể được tiến hành theo mô tả của nhà sản xuất, như thường được thực hiện trong lĩnh vực này, hoặc như được nêu trong bản mô tả này. Trừ khi có định nghĩa cụ thể khác, các danh pháp được sử dụng liên quan đến, và các quy trình và kỹ thuật phòng thí nghiệm về, hóa học phân tích, hóa học hữu cơ tổng hợp và hóa dược và y tế nêu trong bản mô tả này là đã biết và thường được sử dụng trong lĩnh vực. Các kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng để tổng hợp hóa học; phân tích hóa học; điều chế, bào chế và đưa dược phẩm vào cơ thể; và điều trị bệnh nhân.

FGF21 đột biến giảm kết tụ theo sáng chế có thể được dung hợp với thực thể khác, mà có thể mang lại tính chất bổ sung cho FGF21 đột biến giảm kết tụ này. Theo một phương án của sáng chế, FGF21 đột biến giảm kết tụ có thể được dung hợp với trình tự IgG Fc, ví dụ, SEQ ID NO:11. Sự dung hợp này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp sinh học phân tử đã biết và/hoặc hướng dẫn nêu trong bản mô tả này. Lợi ích của polypeptit dung hợp này, cũng như phương pháp tạo ra polypeptit dung hợp này, được thảo luận chi tiết hơn trong bản mô tả này.

6. FGF21 đột biến kết hợp

Như được nêu trong bản mô tả này, trình tự FGF21 kiểu dại có một số tính chất mà có thể gây ra các thách thức đáng kể khi FGF21 được sử dụng làm phân tử trị liệu. Các thách thức trong số này là tính mẫn cảm của protein đối với sự phân hủy và xu hướng kết tụ của nó ở nồng độ cao. Sau nỗ lực toàn diện để xác định polypeptit FGF21 mà vượt qua từng thách

thức này, nghiên cứu định hướng được tiến hành để xác định xem liệu cải biến thế axit amin mang lại tính kháng phân giải protein và cải biến thế axit amin mang lại tính chất làm giảm sự kết tụ có thể được kết hợp theo kiểu cộng hợp hoặc hiệp đồng trong một trình tự polypeptit đơn lẻ trong khi vẫn giữ được mức hoạt tính bằng hoặc lớn hơn hoạt tính của FGF21 kiểu dại hay không. Điều này là một thách thức đáng kể, vì đã biết trong lĩnh vực này rằng việc đưa nhiều đột biến vào một polypeptit xác định đôi khi có thể tác động bất lợi đến sự biểu hiện, hoạt tính và việc sản xuất protein sau đó.

Bất ngờ là, như được chứng minh trong, ví dụ, các ví dụ 19 và 20, phát hiện thấy rằng các tính chất mong muốn của một số FGF21 đột biến có thể thực sự được kết hợp theo kiểu cộng hợp hoặc hiệp đồng để tạo ra FGF21 đột biến có các tính chất dược lý tăng cường. FGF21 đột biến có tính kháng phân giải protein, có tốc độ kết tụ giảm và vẫn giữ lại được hoạt tính giống như, hoặc lớn hơn, FGF21 kiểu dại được bộc lộ trong bản mô tả này.

Một tiêu chí chọn lọc để xác định FGF21 đột biến kết hợp mong muốn là hoạt tính của FGF21 đột biến này phải tương tự với, hoặc lớn hơn, hoạt tính của FGF21 kiểu dại. Do đó, phương án khác của sáng chế đề xuất FGF21 đột biến có tính chất kháng phân giải protein và giảm kết tụ trong khi vẫn giữ lại được hoạt tính FGF21 mà tương tự với, hoặc lớn hơn, FGF21 kiểu dại. Mặc dù ít được mong muốn hơn, trong một số trường hợp, FGF21 đột biến có tính chất kháng phân giải protein và giảm kết tụ nhưng thể hiện hoạt tính FGF21 giảm một chút cũng tạo thành phương án khác của sáng chế. Trong một số trường hợp, có thể mong muốn duy trì mức độ phân giải protein và/hoặc kết tụ, và do đó, FGF21 đột biến mà cho phép mức độ phân giải protein và/hoặc kết tụ nào đó cũng tạo thành phương án khác của sáng chế.

Như đối với tất cả các FGF21 đột biến theo sáng chế, FGF21 đột biến kết hợp theo sáng chế có thể được tạo ra như được nêu trong bản mô tả này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, mà đã quen với các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn, có thể ứng dụng hiểu biết đó, kết hợp với bản mô tả này, để tạo ra và sử dụng FGF21 đột biến kết hợp theo sáng chế. Các kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng cho ADN tái tổ hợp, tổng hợp oligonucleotit, nuôi cấy mô và biến nạp (ví dụ, xung điện, chuyển nhiễm qua liposom). Xem tài liệu, ví dụ, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, nêu trên, tài liệu này được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn cho mục đích bất kỳ. Phản

ứng enzym và kỹ thuật tinh chế có thể được tiến hành theo mô tả của nhà sản xuất, như thường được thực hiện trong lĩnh vực này, hoặc như được nêu trong bản mô tả này. Trừ khi có định nghĩa cụ thể khác, các danh pháp được sử dụng liên quan đến, và các quy trình và kỹ thuật phòng thí nghiệm về, hóa học phân tích, hóa học hữu cơ tổng hợp và hóa dược và y tế nêu trong bản mô tả này là đã biết và thường được sử dụng trong lĩnh vực. Các kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng để tổng hợp hóa học; phân tích hóa học; điều chế, bào chế và đưa dược phẩm vào cơ thể; và điều trị bệnh nhân.

FGF21 đột biến kết hợp theo sáng chế có thể được dung hợp với thực thể khác, mà có thể mang lại tính chất bổ sung cho FGF21 đột biến kết hợp này. Theo một phương án của sáng chế, FGF21 đột biến kết hợp có thể được dung hợp với trình tự IgG Fc, ví dụ, SEQ ID NO:11. Sự dung hợp này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp sinh học phân tử đã biết và/hoặc hướng dẫn nêu trong bản mô tả này. Lợi ích của polypeptit dung hợp này, cũng như phương pháp tạo ra polypeptit dung hợp này, được thảo luận chi tiết hơn trong bản mô tả này.

7. Protein dung hợp FGF21

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "polypeptit dung hợp FGF21" hoặc "protein dung hợp FGF21" chỉ việc dung hợp một hoặc nhiều gốc axit amin (như protein hoặc peptit khác loại) ở đầu N hoặc đầu C của polypeptit FGF21 đột biến bất kỳ nêu trong bản mô tả này.

Peptit và polypeptit khác loại bao gồm, nhưng không giới hạn ở, epitop để cho phép phát hiện và/hoặc phân lập polypeptit FGF21 đột biến; protein thụ thể xuyên màng hoặc một phần của nó, như miền ngoại bào hoặc miền nội bào và xuyên màng; phối tử hoặc một phần của nó mà liên kết với protein thụ thể xuyên màng; enzym hoặc một phần của nó mà có hoạt tính xúc tác; polypeptit hoặc peptit mà thúc đẩy sự oligome hóa, như miền khóa kéo leuxin; polypeptit hoặc peptit mà làm tăng độ ổn định, như vùng cố định globulin miễn dịch (ví dụ, miền Fc); trình tự kéo dài thời gian bán hủy chứa tổ hợp của hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 5, 10, 15, 20, 25, v.v.) axit amin tích điện và/hoặc không tích điện có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên (ví dụ, serin, glyxin, axit glutamic hoặc axit aspartic) được thiết kế để tạo thành đối tác dung hợp chủ yếu là ưa nước hoặc chủ yếu là kỵ nước cho FGF21 đột biến; kháng thể có chức năng hoặc không có chức năng, hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của nó; và polypeptit

có hoạt tính, như hoạt tính trị liệu, khác với polypeptit FGF21 đột biến theo sáng chế. Sáng chế cũng bao gồm FGF21 đột biến được dung hợp với albumin huyết thanh người (HSA).

Protein dung hợp FGF21 có thể được tạo ra bằng cách dung hợp trình tự khác loại ở đầu N hoặc ở đầu C của polypeptit FGF21 đột biến. Như được nêu trong bản mô tả này, trình tự khác loại có thể là trình tự axit amin hoặc polyme không chứa axit amin. Trình tự khác loại có thể được dung hợp trực tiếp vào polypeptit FGF21 đột biến hoặc thông qua nhóm liên kết hoặc phân tử gá lắp (adapter). Nhóm liên kết hoặc phân tử gá lắp có thể là một hoặc nhiều gốc axit amin (hoặc -me), ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 hoặc 9 gốc (hoặc -me), tốt hơn là từ 10 đến 50 gốc axit amin (hoặc -me), ví dụ, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 hoặc 50 gốc (hoặc -me), và tốt hơn nữa là từ 15 đến 35 gốc axit amin (hoặc -me). Nhóm liên kết hoặc phân tử gá lắp cũng có thể được thiết kế có vị trí phân cắt đối với endonucleaza giới hạn ADN hoặc đối với proteaza để cho phép tách các gốc được dung hợp.

a. Thể dung hợp Fc

Theo một phương án của sáng chế, polypeptit FGF21 đột biến được dung hợp với miền Fc, ví dụ, một hoặc nhiều miền của vùng Fc của IgG của người. Kháng thể gồm có hai phần độc lập về mặt chức năng, đó là miền biến đổi được gọi là "Fab", miền này liên kết với kháng nguyên, và miền cố định được gọi là "Fc", miền này tham gia vào chức năng tác động như hoạt hóa bổ thể và tấn công bởi tế bào thực bào. Fc có thời gian bán hủy trong huyết thanh dài, trong khi Fab có thời gian sống ngắn (Capon et al., 1989, Nature 337: 525-31). Khi được liên kết với protein trị liệu, miền Fc có thể tạo ra thời gian bán hủy dài hơn hoặc tích hợp các chức năng như liên kết thụ thể Fc, liên kết protein A, cố định bổ thể, và thậm chí có thể chuyển qua nhau thai (Capon *et al.*, 1989).

Phân tích dược động học *in vivo* cho thấy rằng FGF21 của người có thời gian bán hủy ngắn khoảng 1 giờ ở chuột nhắt do sự phân hủy *in vivo* và sự thanh thải nhanh. Do đó, để kéo dài thời gian bán hủy của FGF21, trình tự Fc nguyên gốc được dung hợp vào đầu N hoặc đầu C của polypeptit FGF21. Việc dung hợp trình tự Fc vào FGF21 kiểu dại, cụ thể là Fc được dung hợp vào đầu N của FGF21 kiểu dại, không làm kéo dài thời gian bán hủy như mong đợi, tuy nhiên, quan sát này đã dẫn đến việc nghiên cứu sự phân hủy phân giải protein FGF21 *in vivo* và xác định FGF21 đột biến mà kháng sự phân hủy này. Thể đột biến như vậy được mô

tả trong, ví dụ, các ví dụ 9 và 11, và thể hiện thời gian bán hủy dài hơn so với FGF21 kiểu dại. Các protein dung hợp FGF21 này và các protein dung hợp FGF21 khác tạo thành các phương án của sáng chế.

Trong bản mô tả này, Fc-FGF21 chỉ protein dung hợp trong đó trình tự Fc được dung hợp vào đầu N của FGF21. Tương tự, trong bản mô tả này, FGF21-Fc chỉ protein dung hợp trong đó trình tự Fc được dung hợp vào đầu C của FGF21.

Protein dung hợp FGF21 thu được có thể được tinh chế, ví dụ, bằng cách sử dụng cột ái lực protein A. Peptit và protein được dung hợp với vùng Fc đã được phát hiện thấy là thể hiện thời gian bán hủy *in vivo* về cơ bản là lớn hơn so với phiên bản đối chiếu không được dung hợp. Ngoài ra, việc dung hợp với vùng Fc cho phép dime hóa/multime hóa polypeptit dung hợp. Vùng Fc có thể là vùng Fc có trong tự nhiên, hoặc có thể được thay đổi để cải thiện chất lượng nhất định, như chất lượng trị liệu, thời gian tuần hoàn hoặc giảm kết tụ.

Các cải biến hữu dụng của chất trị liệu protein bằng cách dung hợp với miền "Fc" của kháng thể được thảo luận chi tiết trong công bố đơn quốc tế số WO 00/024782, tài liệu này được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

b. Liên kết protein dung hợp

Khi tạo thành protein dung hợp theo sáng chế, nhóm liên kết có thể, nhưng không bắt buộc, được sử dụng. Khi có mặt, cấu trúc hóa học của nhóm liên kết có thể không có tính quyết định, vì nó đóng vai trò chủ yếu là phần đệm. Nhóm liên kết này có thể được tạo thành từ các axit amin được liên kết với nhau bằng liên kết peptit. Theo một số phương án của sáng chế, nhóm liên kết này được tạo thành từ 1 đến 20 axit amin được liên kết bằng liên kết peptit, trong đó axit amin này được chọn từ 20 axit amin có trong tự nhiên. Theo các phương án khác nhau, 1 đến 20 axit amin này được chọn từ các axit amin gồm glyxin, serin, alanin, prolin, asparagin, glutamin và lysin. Theo một số phương án, nhóm liên kết này được tạo thành chủ yếu từ các axit amin mà không bị cản trở về mặt không gian, như glyxin và alanin. Theo một số phương án, nhóm liên kết là polyglyxin (như $(Gly)_4$ (SEQ ID NO:29) và $(Gly)_5$ (SEQ ID NO:30)), polyalanin, tổ hợp của glyxin và alanin (như poly(Gly-Ala)) hoặc tổ hợp của glyxin và serin (như poly(Gly-Ser)). Nhóm liên kết thích hợp khác bao gồm: $(Gly)_5$-Ser-$(Gly)_3$-Ser-$(Gly)_4$-Ser (SEQ ID NO:28), $(Gly)_4$-Ser-$(Gly)_4$-Ser-$(Gly)_4$-Ser (SEQ ID NO:31), $(Gly)_3$-Lys-

$(Gly)_4$ (SEQ ID NO:32), $(Gly)_3$-Asn-Gly-Ser-$(Gly)_2$ (SEQ ID NO:33), $(Gly)_3$-Cys-$(Gly)_4$ (SEQ ID NO:34) và Gly-Pro-Asn-Gly-Gly (SEQ ID NO:35). Mặc dù nhóm liên kết gồm 15 gốc axit amin đã được thấy là hoạt động đặc biệt tốt đối với protein dung hợp FGF21, nhưng sáng chế cũng dự tính đến các nhóm liên kết có chiều dài hoặc thành phần bất kỳ. Khi nhóm liên kết được sử dụng để nối trình tự khác loại, như miền Fc, và polypeptit FGF21 hoặc FGF21 đột biến, thì nhóm liên kết này được thể hiện trong dấu ngoặc đơn.

Các nhóm liên kết nêu trong bản mô tả này là để làm ví dụ, và các nhóm liên kết dài hơn nhiều và bao gồm các gốc khác được bao hàm bởi sáng chế. Nhóm liên kết không phải peptit cũng được bao hàm bởi sáng chế. Ví dụ, nhóm liên kết alkyl như $–NH–(CH_2)_s–C(O)–$, trong đó s = từ 2 đến 20, có thể được sử dụng. Nhóm liên kết alkyl này có thể còn được thế bằng nhóm không gây cản trở về mặt không gian bất kỳ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, alkyl bậc thấp (ví dụ, C1–C6), axyl bậc thấp, halogen (ví dụ, Cl, Br), CN, NH_2 hoặc phenyl. Nhóm liên kết không phải peptit làm ví dụ là nhóm liên kết polyetylen glycol, trong đó nhóm liên kết này có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 100 đến 5000 kD, ví dụ, từ 100 đến 500 kD.

8. FGF21 đột biến được cải biến về mặt hóa học

Dạng cải biến về mặt hóa học của polypeptit FGF21 đột biến nêu trong bản mô tả này, bao gồm dạng cắt cụt của FGF21 nêu trong bản mô tả này, có thể được tạo ra bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, dựa vào phần bộc lộ nêu trong bản mô tả này. FGF21 đột biến được cải biến về mặt hóa học này được thay đổi sao cho FGF21 đột biến được cải biến về mặt hóa học này khác với FGF21 đột biến không được cải biến, về loại hoặc vị trí của phân tử được gắn tự nhiên vào FGF21 đột biến. FGF21 đột biến được cải biến về mặt hóa học có thể bao gồm phân tử được tạo thành bằng cách làm khuyết một hoặc nhiều nhóm hóa học được gắn tự nhiên.

Theo một phương án, polypeptit FGF21 đột biến theo sáng chế có thể được cải biến bằng cách gắn cộng hóa trị một hoặc nhiều polyme. Ví dụ, polyme được chọn thường là tan được trong nước sao cho protein mà nó được gắn vào không kết tủa trong môi trường nước, như môi trường sinh lý. Hỗn hợp của các polyme cũng thuộc phạm vi của polyme thích hợp. Tốt hơn là, để sử dụng chế phẩm cuối trong trị liệu, polyme này là dược dụng. Polyme không

tan được trong nước được liên hợp với polypeptit FGF21 đột biến theo sáng chế cũng tạo thành một khía cạnh của sáng chế.

Mỗi polyme làm ví dụ có thể có phân tử lượng bất kỳ và có thể phân nhánh hoặc không phân nhánh. Mỗi polyme thường có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ khoảng 2 kDa đến khoảng 100 kDa (thuật ngữ "khoảng" thể hiện rằng trong chế phẩm polyme tan được trong nước, một số phân tử sẽ nặng hơn và một số sẽ nhẹ hơn so với phân tử lượng được nêu). Phân tử lượng trung bình của mỗi polyme tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 5 kDa đến khoảng 50 kDa, tốt hơn nữa là từ khoảng 12 kDa đến khoảng 40 kDa, và tốt nhất là từ khoảng 20 kDa đến khoảng 35 kDa.

Polyme tan được trong nước thích hợp hoặc hỗn hợp của chúng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cacbon hydrat liên kết tại N hoặc liên kết tại O, đường, phosphat, polyetylen glycol (PEG) (bao gồm các dạng PEG đã được sử dụng để tạo dẫn xuất protein, bao gồm mono-(C_1-C_{10}), alkoxy- hoặc aryloxy-polyetylen glycol), monometoxy-polyetylen glycol, dextran (như dextran phân tử lượng thấp, ví dụ, khoảng 6 kD), xenluloza hoặc polyme gốc cacbon hydrat khác, poly-(N-vinyl pyrolidon) polyetylen glycol, propylen glycol homopolyme, co-polyme polypropylen oxit/etylen oxit, rượu polyoxyetylat polyhydric (ví dụ, glyxerol) và rượu polyvinyl. Sáng chế cũng bao gồm phân tử liên kết ngang hai chức mà có thể được sử dụng để tạo ra multime polypeptit FGF21 đột biến được gắn cộng hóa trị. Sáng chế cũng bao gồm FGF21 đột biến được gắn cộng hóa trị với axit polysialic.

Theo một số phương án của sáng chế, FGF21 đột biến được cải biến cộng hóa trị, hoặc hóa học, để bao gồm một hoặc nhiều polyme tan được trong nước, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), polyoxyetylen glycol hoặc polypropylen glycol. Xem tài liệu, ví dụ, patent Mỹ số 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 và 4,179,337. Theo một số phương án của sáng chế, FGF21 đột biến bao gồm một hoặc nhiều polyme, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, monometoxy-polyetylen glycol, dextran, xenluloza, polyme gốc cacbon hydrat khác, poly-(N-vinyl pyrolidon)-polyetylen glycol, propylen glycol homopolyme, co-polyme polypropylen oxit/etylen oxit, rượu polyoxyetylat polyhydric (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinyl, hoặc hỗn hợp của các polyme này.

Theo một số phương án của sáng chế, FGF21 đột biến được cải biến cộng hóa trị với tiểu đơn vị PEG. Theo một số phương án, một hoặc nhiều polyme tan được trong nước được liên kết ở một hoặc nhiều vị trí đặc hiệu (ví dụ, ở đầu N) của FGF21 đột biến. Theo một số phương án, một hoặc nhiều polyme tan được trong nước được gắn một cách ngẫu nhiên vào một hoặc nhiều chuỗi bên của FGF21 đột biến. Theo một số phương án, PEG được sử dụng để cải thiện khả năng trị liệu của FGF21 đột biến. Một số phương pháp như vậy được thảo luận, ví dụ, trong patent Mỹ số 6,133,426, tài liệu này được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn cho mục đích bất kỳ.

Theo các phương án của sáng chế trong đó polyme là PEG, nhóm PEG có thể có phân tử lượng thích hợp bất kỳ, và có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Phân tử lượng trung bình của nhóm PEG tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 2 kD đến khoảng 100 kDa, và tốt hơn nữa là từ khoảng 5 kDa đến khoảng 50 kDa, ví dụ, 10, 20, 30, 40 hoặc 50 kDa. Nhóm PEG thường được gắn với FGF21 đột biến qua quá trình axyl hóa hoặc alkyl hóa khử thông qua nhóm có khả năng phản ứng trên gốc PEG (ví dụ, nhóm aldehyt, amino, thiol hoặc este) với nhóm có khả năng phản ứng trên FGF21 đột biến (ví dụ, nhóm aldehyt, amino hoặc este).

Sự PEG hóa polypeptit, bao gồm FGF21 đột biến theo sáng chế, có thể được thực hiện một cách cụ thể bằng cách sử dụng phản ứng PEG hóa bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Các phản ứng này được mô tả, ví dụ, trong các tài liệu tham khảo sau: Francis et al., 1992, Focus on Growth Factors 3: 4-10; patent châu Âu số 0 154 316 và 0 401 384; và patent Mỹ số 4,179,337. Ví dụ, sự PEG hóa có thể được tiến hành qua phản ứng axyl hóa hoặc phản ứng alkyl hóa với phân tử polyetylen glycol có khả năng phản ứng (hoặc polyme tan được trong nước có khả năng phản ứng tương tự) như được nêu trong bản mô tả này. Đối với phản ứng axyl hóa, polyme được chọn cần có một nhóm este có khả năng phản ứng đơn lẻ. Đối với quá trình alkyl hóa khử, polyme được chọn cần có một nhóm aldehyt có khả năng phản ứng đơn lẻ. Aldehyt có khả năng phản ứng là, ví dụ, polyetylen glycol propionaldehyt, mà ổn định trong nước, hoặc dẫn xuất mono C_1-C_{10} alkoxy hoặc aryloxy của nó (xem tài liệu, ví dụ, patent Mỹ số 5,252,714).

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp hữu dụng để gắn nhóm PEG vào polypeptit bao gồm bước kết hợp, thông qua sự tạo thành mối liên kết liên hợp trong dung

dịch, peptit và gốc PEG, mỗi loại mang nhóm chức đặc biệt mà có khả năng phản ứng qua lại với nhau. Peptit có thể được tạo ra một cách dễ dàng bằng kỹ thuật tổng hợp pha rắn thông thường. Peptit "được hoạt hóa trước" với nhóm chức thích hợp ở vị trí đặc hiệu. Các tiền chất được tinh chế và được xác định đặc điểm đầy đủ trước khi cho phản ứng với gốc PEG. Sự nối peptit với PEG thường xảy ra trong pha nước và có thể được theo dõi một cách dễ dàng bằng kỹ thuật HPLC phân tích pha đảo. Peptit được PEG hóa có thể được tinh chế một cách dễ dàng bằng kỹ thuật HPLC điều chế và được xác định đặc điểm bằng kỹ thuật HPLC phân tích, phân tích axit amin và đo khối phổ giải hấp laze.

Polyme polysacarit là loại polyme tan được trong nước khác mà có thể được sử dụng để cải biến protein. Do đó, FGF21 đột biến theo sáng chế được dung hợp với polyme polysacarit tạo thành các phương án của sáng chế. Dextran là polyme polysacarit gồm các tiểu đơn vị glucoza riêng lẻ chủ yếu được liên kết bởi liên kết alpha 1-6. Bản thân dextran có sẵn ở nhiều khoảng giá trị phân tử lượng, và dễ dàng có sẵn ở phân tử lượng nằm trong khoảng từ khoảng 1 kD đến khoảng 70 kD. Dextran là polyme tan được trong nước thích hợp để sử dụng làm môi trường dẫn thuốc dựa trên chính nó hoặc ở dạng kết hợp với môi trường dẫn thuốc khác (ví dụ, Fc). Xem tài liệu, ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 96/11953. Việc sử dụng dextran được liên hợp với globulin miễn dịch dùng trong trị liệu hoặc chẩn đoán đã được báo cáo. Xem tài liệu, ví dụ, công bố patent châu Âu số 0 315 456, tài liệu này được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng dextran có phân tử lượng nằm trong khoảng từ khoảng 1 kD đến khoảng 20 kD.

Nhìn chung, cải biến hóa học có thể được tiến hành trong điều kiện thích hợp bất kỳ được sử dụng để cho protein phản ứng với phân tử polyme đã được hoạt hóa. Phương pháp tạo ra polypeptit được cải biến về mặt hóa học thường bao gồm các bước: (a) cho polypeptit phản ứng với phân tử polyme đã được hoạt hóa (như dẫn xuất este hoặc aldehyt có khả năng phản ứng của phân tử polyme) trong điều kiện trong đó polypeptit FGF21 đột biến được gắn vào một hoặc nhiều phân tử polyme, và (b) thu nhận sản phẩm phản ứng. Điều kiện phản ứng tối ưu được xác định dựa trên các thông số đã biết và kết quả mong muốn. Ví dụ là, tỷ lệ của phân tử polyme so với protein càng lớn, thì tỷ lệ phần trăm của phân tử polyme được gắn vào càng lớn. Theo một phương án của sáng chế, FGF21 đột biến được cải biến về mặt hóa học

có thể có một gốc phân tử polyme đơn lẻ ở đầu amino (xem tài liệu, ví dụ, patent Mỹ số 5,234,784).

Theo phương án khác của sáng chế, polypeptit FGF21 đột biến có thể được cộng hợp về mặt hóa học với biotin. Thể đột biến biotin/polypeptit FGF21 sau đó được cho liên kết với avidin, tạo ra thể đột biến avidin/biotin/polypeptit FGF21 hóa trị bốn. Polypeptit FGF21 đột biến cũng có thể được cộng hợp cộng hóa trị với dinitrophenol (DNP) hoặc trinitrophenol (TNP) và thể liên hợp thu được kết tủa với chất kháng DNP hoặc chất kháng TNP-IgM để tạo thành thể liên hợp decameric có hóa trị 10.

Nhìn chung, tình trạng bệnh mà có thể được làm thuyên giảm hoặc được điều biến bằng việc dùng FGF21 đột biến được cải biến về mặt hóa học được đề xuất bao gồm các tình trạng bệnh nêu trong bản mô tả này liên quan đến polypeptit FGF21 đột biến. Tuy nhiên, FGF21 đột biến được cải biến về mặt hóa học được đề xuất trong bản mô tả này có thể có hoạt tính bổ sung, hoạt tính sinh học tăng hoặc giảm hoặc các đặc tính khác, như thời gian bán hủy tăng hoặc giảm, so với FGF21 đột biến không được cải biến.

9. Dược phẩm chứa FGF21 đột biến và cách dùng

Dược phẩm chứa FGF21 đột biến thuộc phạm vi của sáng chế, và được bao hàm một cách cụ thể trong việc xác định một số trình tự FGF21 đột biến mà thể hiện tính chất được tăng cường. Dược phẩm chứa FGF21 đột biến này có thể chứa lượng có hiệu quả trị liệu của polypeptit FGF21 đột biến ở dạng hỗn hợp với tá dược bào chế dược dụng hoặc có thể chấp nhận được về mặt sinh lý được chọn để phù hợp với cách thức dùng.

Tá dược bào chế có thể chấp nhận được tốt hơn là không độc đối với đối tượng nhận ở liều lượng và nồng độ được sử dụng.

Dược phẩm này có thể chứa (các) tá dược bào chế để thay đổi, duy trì hoặc bảo quản, ví dụ, độ pH, độ thẩm thấu, độ nhớt, độ trong, màu sắc, độ đẳng trương, mùi, độ vô trùng, độ ổn định, tốc độ hòa tan hoặc giải phóng, mức độ hấp thụ hoặc mức độ thâm nhập của dược phẩm. Tá dược bào chế thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axit amin (như glyxin, glutamin, asparagin, arginin hoặc lysin), chất kháng khuẩn, chất chống oxy hóa (như axit ascorbic, natri sulfit hoặc natri hydro-sulfit), chất đệm (như borat, bicacbonat, Tris-HCl, xitrat,

phosphat hoặc axit hữu cơ khác), chất tạo khối (như manitol hoặc glyxin), chất càng hóa (như axit etylendiamin tetraaxetic (EDTA)), chất tạo phức (như cafein, polyvinylpyrolidon, beta-xyclodextrin hoặc hydroxypropyl-beta-xyclodextrin), chất độn, monosacarit, disacarit và cacbon hydrat khác (như glucoza, manoza hoặc dextrin), protein (như albumin huyết thanh, gelatin hoặc globulin miễn dịch), chất tạo màu, chất tạo hương và chất pha loãng, chất nhũ hóa, polyme ưa nước (như polyvinylpyrolidon), polypeptit phân tử lượng thấp, đối ion tạo muối (như natri), chất bảo quản (như benzalkoni clorua, axit benzoic, axit salixylic, thimerosal, rượu phenetylic, metylparaben, propylparaben, clohexidin, axit sorbic hoặc hydro peroxit), dung môi (như glyxerin, propylen glycol hoặc polyetylen glycol), rượu đường (như manitol hoặc sorbitol), chất tạo huyền phù, chất hoạt động bề mặt hoặc chất thấm ướt (như pluronic; PEG; sorbitan este; polysorbat như polysorbat 20 hoặc polysorbat 80; triton; trometamin; lexitin; cholesterol hoặc tyloxapal), chất làm tăng độ ổn định (như sucroza hoặc sorbitol), chất làm tăng trương lực (như halogenua kim loại kiềm – tốt hơn là natri hoặc kali clorua – hoặc manitol sorbitol), môi trường đưa thuốc vào cơ thể, chất pha loãng, tá dược và/hoặc chất phụ gia dược phẩm (xem tài liệu, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), và các phiên bản tiếp theo của tài liệu này, được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn cho mục đích bất kỳ.

Dược phẩm tối ưu sẽ được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tùy thuộc vào, ví dụ, đường dùng dự kiến, dạng đưa vào cơ thể và liều lượng mong muốn (xem tài liệu, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, nêu trên). Dược phẩm như vậy có thể ảnh hưởng đến trạng thái vật lý, độ ổn định, tốc độ giải phóng *in vivo* và tốc độ thanh thải *in vivo* của polypeptit FGF21 đột biến.

Môi trường dẫn thuốc hoặc chất mang chính trong dược phẩm có thể có bản chất là nước hoặc không phải là nước. Ví dụ, môi trường dẫn thuốc hoặc chất mang thích hợp để tiêm có thể là nước, dung dịch nước muối sinh lý hoặc dịch não tủy nhân tạo, có thể được bổ sung nguyên liệu khác phổ biến trong dược phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa. Nước muối đệm trung tính hoặc nước muối được trộn với albumin huyết thanh là các môi trường dẫn thuốc làm ví dụ khác. Dược phẩm làm ví dụ khác chứa chất đệm Tris có độ pH bằng khoảng 7,0-8,5 hoặc chất đệm axetat có độ pH bằng khoảng 4,0-5,5, mà có thể còn chứa sorbitol hoặc chất

thay thế thích hợp. Theo một phương án của sáng chế, dược phẩm chứa polypeptit FGF21 đột biến có thể được bào chế để bảo quản bằng cách trộn dược phẩm được chọn có độ tinh khiết mong muốn với tá dược bào chế tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences, nêu trên) ở dạng bánh đông khô hoặc dung dịch nước. Ngoài ra, sản phẩm chứa polypeptit FGF21 đột biến có thể được bào chế dưới dạng chất đông khô bằng cách sử dụng tá dược thích hợp như sucroza.

Dược phẩm chứa polypeptit FGF21 đột biến có thể được chọn để đưa vào cơ thể qua đường ngoài đường tiêu hóa. Theo cách khác, dược phẩm này có thể được chọn để xông hít hoặc để đưa vào cơ thể qua đường tiêu hóa, như qua đường miệng. Việc bào chế dược phẩm như vậy là thuộc kỹ năng trong lĩnh vực này.

Các thành phần bào chế có mặt với nồng độ có thể chấp nhận được đối với vị trí dùng dược phẩm. Ví dụ, chất đệm được sử dụng để duy trì dược phẩm ở độ pH sinh lý hoặc ở độ pH thấp đôi chút, thường nằm trong khoảng độ pH từ khoảng 5 đến khoảng 8.

Khi được dự định để dùng ngoài đường tiêu hóa, chế phẩm trị liệu để sử dụng theo sáng chế có thể là ở dạng dung dịch nước, không chứa chất gây sốt, có thể chấp nhận được ngoài đường tiêu hóa, chứa polypeptit FGF21 đột biến mong muốn trong môi trường dẫn thuốc dược dụng. Môi trường dẫn thuốc đặc biệt thích hợp để tiêm ngoài đường tiêu hóa là nước cất vô trùng trong đó polypeptit FGF21 đột biến được bào chế dưới dạng dung dịch vô trùng, đẳng trương, được bảo quản thích hợp. Cách bào chế khác nữa có thể bao gồm việc bào chế phân tử mong muốn với chất, như hạt vi cầu có thể tiêm được, hạt có thể ăn mòn sinh học, hợp chất polyme (như axit polylactic hoặc axit polyglycolic), hạt tròn hoặc liposom, mà tạo ra khả năng giải phóng có kiểm soát hoặc duy trì liên tục cho sản phẩm để sau đó có thể được đưa vào cơ thể bằng cách tiêm ở dạng dự trữ (depot). Axit hyaluronic cũng có thể được sử dụng, và nó có thể có tác dụng tăng cường khoảng thời gian duy trì liên tục trong tuần hoàn. Phương tiện thích hợp khác để đưa phân tử mong muốn vào bao gồm dụng cụ đưa thuốc vào cơ thể có thể cấy được.

Theo một phương án, dược phẩm có thể được bào chế để xông hít. Ví dụ, polypeptit FGF21 đột biến có thể được bào chế dưới dạng bột khô để xông hít. Dung dịch xông hít chứa polypeptit FGF21 đột biến cũng có thể được bào chế với chất đẩy để đưa sol khí vào cơ thể.

Theo phương án khác nữa, dung dịch có thể được tạo khí dung. Việc dùng qua đường phổi còn được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 94/20069, tài liệu này mô tả việc đưa protein được cải biến về mặt hóa học vào cơ thể qua đường phổi.

Sáng chế cũng dự định rằng các dược phẩm nhất định có thể được dùng qua đường miệng. Theo một phương án của sáng chế, polypeptit FGF21 đột biến mà được dùng theo cách này có thể được bào chế cùng với hoặc không cùng với chất mang thường được sử dụng trong sản xuất sản phẩm dạng liều rắn như viên nén và viên nang. Ví dụ, viên nang có thể được thiết kế để giải phóng phần có hoạt tính của chế phẩm trong đường dạ dày-ruột tại thời điểm khi sinh khả dụng đạt lớn nhất và sự phân hủy tiền toàn thân là nhỏ nhất. Các chất bổ sung có thể được đưa vào để thúc đẩy sự hấp thu polypeptit FGF21 đột biến. Chất pha loãng, chất tạo hương, sáp có nhiệt độ nóng chảy thấp, dầu thực vật, chất làm trơn, chất tạo huyền phù, chất gây rã viên nén và chất liên kết cũng có thể được sử dụng.

Dược phẩm khác có thể chứa lượng có hiệu quả của polypeptit FGF21 đột biến ở dạng hỗn hợp với tá dược không độc mà thích hợp để sản xuất viên nén. Bằng cách hòa tan viên nén trong nước vô trùng, hoặc môi trường dẫn thuốc thích hợp khác, dung dịch có thể được bào chế ở dạng liều đơn vị. Tá dược thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất pha loãng trơ, như canxi cacbonat, natri cacbonat hoặc bicacbonat, lactoza hoặc canxi phosphat; hoặc chất liên kết, như tinh bột, gelatin hoặc acacia; hoặc chất làm trơn như magie stearat, axit stearic hoặc bột talc.

Dược phẩm chứa polypeptit FGF21 đột biến khác nữa sẽ được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm dược phẩm chứa polypeptit FGF21 đột biến ở dạng bào chế đưa vào cơ thể theo cách duy trì liên tục hoặc có kiểm soát. Kỹ thuật bào chế các loại phương tiện đưa vào cơ thể theo cách duy trì liên tục hoặc có kiểm soát khác, như chất mang liposom, vi hạt có thể ăn mòn sinh học hoặc hạt tròn rỗng và chế phẩm tiêm dự trữ (depot), cũng là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật (xem tài liệu, ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 93/15722, tài liệu này mô tả khả năng giải phóng có kiểm soát của vi hạt polyme xốp để đưa dược phẩm vào cơ thể, và Wischke & Schwendeman, 2008, Int. J. Pharm. 364: 298-327 và Freiberg & Zhu, 2004, Int. J. Pharm. 282: 1-18, tài liệu này đề cập đến chế phẩm vi cầu/vi hạt và ứng dụng). Như được nêu trong bản mô tả này,

hydrogel là một ví dụ về dạng bào chế đưa vào cơ thể theo cách duy trì liên tục hoặc có kiểm soát.

Ví dụ bổ sung về chế phẩm giải phóng duy trì liên tục bao gồm nền polyme bán thấm ở dạng vật phẩm được tạo hình, ví dụ, màng hoặc vi nang. Nền giải phóng duy trì liên tục có thể bao gồm polyeste, hydrogel, polylactit (patent Mỹ số 3,773,919 và patent châu Âu số 0 058 481), copolyme của axit L-glutamic và gamma etyl-L-glutamat (Sidman et al., 1983, Biopolymers 22: 547-56), poly(2-hydroxyetyl-metacrylat) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 và Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105), etylen vinyl axetat (Langer et al., nêu trên) hoặc axit poly-D(-)-3-hydroxybutyric (patent châu Âu số 0 133 988). Chế phẩm giải phóng duy trì liên tục cũng có thể bao gồm liposom, mà có thể được bào chế bằng phương pháp bất kỳ trong số một số phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 3688-92; và các patent châu Âu số 0 036 676, 0 088 046 và 0 143 949.

Dược phẩm chứa polypeptit FGF21 đột biến để sử dụng *in vivo* thường cần phải vô trùng. Điều này có thể được thực hiện bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Khi chế phẩm được làm đông khô, việc khử trùng bằng cách sử dụng phương pháp này có thể được tiến hành trước, hoặc sau khi, làm đông khô và hoàn nguyên. Chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được bảo quản ở dạng đông khô hoặc trong dung dịch. Ngoài ra, chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa thường được đặt vào vật chứa có cửa vào vô trùng, ví dụ, túi dung dịch dùng qua đường tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có nút có thể chọc thủng bằng kim tiêm dưới da.

Khi dược phẩm đã được bào chế, nó có thể được bảo quản trong lọ nhỏ vô trùng dưới dạng dung dịch, hỗn dịch, gel, nhũ tương, chất rắn, hoặc dưới dạng bột khử nước hoặc đông khô. Dược phẩm như vậy có thể được bảo quản ở dạng dùng sẵn hoặc ở dạng cần được hoàn nguyên (ví dụ, đông khô) trước khi dùng.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất kit để tạo ra đơn vị dùng liều đơn lẻ. Mỗi kit này có thể gồm có cả vật chứa thứ nhất chứa protein được làm khô và vật chứa thứ hai chứa chế phẩm nước. Sáng chế cũng bao gồm kit gồm có ống tiêm được nạp sẵn có một ngăn hoặc nhiều ngăn (ví dụ, ống tiêm chứa chất lỏng và ống tiêm chứa chất đông khô).

Lượng có hiệu quả của dược phẩm chứa polypeptit FGF21 đột biến được sử dụng để trị liệu sẽ phụ thuộc vào, ví dụ, hoàn cảnh và mục đích trị liệu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hiểu rõ rằng mức liều thích hợp để điều trị theo đó sẽ thay đổi tùy thuộc, một phần, vào phân tử được đưa vào cơ thể, chỉ định bệnh mà polypeptit FGF21 đột biến được sử dụng để điều trị, đường dùng và kích thước (trọng lượng cơ thể, bề mặt cơ thể hoặc kích thước cơ quan) và tình trạng (độ tuổi và sức khỏe tổng quát) của bệnh nhân. Theo đó, bác sĩ lâm sàng có thể chuẩn độ liều dùng và thay đổi đường dùng để thu được tác dụng trị liệu tối ưu. Liều thông thường có thể nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 µg/kg lên đến khoảng 100 mg/kg hoặc lớn hơn, tùy thuộc vào các yếu tố đã được đề cập ở trên. Theo các phương án khác, liều này có thể nằm trong khoảng từ 0,1 µg/kg đến khoảng 100 mg/kg; hoặc 1 µg/kg đến khoảng 100 mg/kg; hoặc 5 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 35 µg/kg, 40 µg/kg, 45 µg/kg, 50 µg/kg, 55 µg/kg, 60 µg/kg, 65 µg/kg, 70 µg/kg, 75 µg/kg đến khoảng 100 mg/kg. Theo các phương án khác nữa, liều này có thể là 50 µg/kg, 100 µg/kg, 150 µg/kg, 200 µg/kg, 250 µg/kg, 300 µg/kg, 350 µg/kg, 400 µg/kg, 450 µg/kg, 500 µg/kg, 550 µg/kg, 600 µg/kg, 650 µg/kg, 700 µg/kg, 750 µg/kg, 800 µg/kg, 850 µg/kg, 900 µg/kg, 950 µg/kg, 100 µg/kg, 200 µg/kg, 300 µg/kg, 400 µg/kg, 500 µg/kg, 600 µg/kg, 700 µg/kg, 800 µg/kg, 900 µg/kg, 1000 µg/kg, 2000 µg/kg, 3000 µg/kg, 4000 µg/kg, 5000 µg/kg, 6000 µg/kg, 7000 µg/kg, 8000 µg/kg, 9000 µg/kg hoặc 10 mg/kg.

Tần suất dùng liều sẽ phụ thuộc vào các thông số dược động học của polypeptit FGF21 đột biến trong chế phẩm được sử dụng. Thông thường, bác sĩ lâm sàng sẽ cho dùng dược phẩm cho đến khi đạt được liều mà đạt được tác dụng mong muốn. Do đó, dược phẩm có thể được dùng dưới dạng liều đơn, dưới dạng hai hoặc nhiều liều (mà có thể có hoặc không chứa cùng lượng của phân tử mong muốn) theo thời gian, hoặc dưới dạng truyền liên tục qua dụng cụ cấy hoặc ống thông. Việc tinh chỉnh liều thích hợp hơn nữa thường được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và nằm trong phạm vi nhiệm vụ thường được thực hiện bởi họ. Liều thích hợp có thể được xác nhận thông qua việc sử dụng dữ liệu đáp ứng liều thích hợp.

Đường dùng dược phẩm là phù hợp với các phương pháp đã biết, ví dụ, qua đường miệng; bằng cách tiêm qua đường trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong não (trong nhu

mô), trong não thất, trong cơ, trong mắt, trong động mạch, trong cửa hoặc trong thương tổn; bằng hệ giải phóng duy trì liên tục (mà cũng có thể được tiêm); hoặc bằng dụng cụ cấy. Khi mong muốn, dược phẩm có thể được dùng bằng cách tiêm liều lớn (bolus) hoặc liên tục bằng cách truyền, hoặc bằng dụng cụ cấy.

Theo cách khác hoặc ngoài ra, dược phẩm có thể được dùng tại chỗ bằng cách cấy màng, bọt xốp hoặc vật liệu thích hợp khác mà phân tử mong muốn đã được hấp thụ hoặc được bao nang lên đó. Khi dụng cụ cấy được sử dụng, dụng cụ này có thể được cấy vào mô hoặc cơ quan thích hợp bất kỳ, và việc đưa phân tử mong muốn vào cơ thể có thể là thông qua sự khuếch tán, viên liều lớn giải phóng theo thời gian hoặc dùng liên tục.

Để đưa thuốc, ví dụ, FGF21 đột biến nêu trong bản mô tả này, vào cơ thể ở tốc độ đã định trước sao cho nồng độ thuốc có thể được duy trì ở mức có hiệu quả trị liệu mong muốn trong khoảng thời gian kéo dài, có thể sử dụng nhiều phương pháp khác nhau. Trong một ví dụ, hydrogel chứa polyme như gelatin (ví dụ, gelatin bò, gelatin người hoặc gelatin từ nguồn khác) hoặc polyme có trong tự nhiên hoặc được tạo ra bằng cách tổng hợp có thể được sử dụng. Tỷ lệ phần trăm bất kỳ của polyme (ví dụ, gelatin) có thể được sử dụng trong hydrogel, như 5, 10, 15 hoặc 20%. Việc chọn nồng độ thích hợp có thể phụ thuộc vào nhiều yếu tố, như profin trị liệu mong muốn và profin dược động học của phân tử trị liệu.

Ví dụ về polyme mà có thể được kết hợp vào hydrogel bao gồm polyetylen glycol ("PEG"), polyetylen oxit, polyetylen oxit-co-polypropylen oxit, khối co-polyetylen oxit hoặc copolyme ngẫu nhiên, rượu polyvinyl, poly(vinyl pyrolidinon), poly(axit amin), dextran, heparin, polysacarit, polyete và dạng tương tự.

Yếu tố khác mà có thể được cân nhắc khi tạo chế phẩm hydrogel là mức độ liên kết ngang trong hydrogel và chất liên kết ngang. Theo một phương án, liên kết ngang có thể đạt được thông qua phản ứng metacryl hóa có liên quan đến metacrylic anhydrit. Trong một số trường hợp, mức độ liên kết ngang cao có thể là điều mong muốn, mặc dù trong các trường hợp khác, mức độ liên kết ngang thấp hơn được ưu tiên. Trong một số trường hợp, mức độ liên kết ngang cao hơn tạo ra sự giải phóng duy trì liên tục lâu hơn. Mức độ liên kết ngang cao hơn có thể tạo ra hydrogel chắc chắn hơn và thời gian đưa thuốc vào cơ thể dài hơn.

Tỷ lệ bất kỳ của polyme với chất liên kết ngang (ví dụ, metacrylic anhydrit) có thể được sử dụng để tạo ra hydrogel với các tính chất mong muốn. Ví dụ, tỷ lệ của polyme với chất liên kết ngang có thể là, ví dụ, 8:1, 16:1, 24:1 hoặc 32:1. Ví dụ, khi polyme hydrogel là gelatin và chất liên kết ngang là metacrylat, thì tỷ lệ metyacrylic anhydrit:gelatin là 8:1, 16:1, 24:1 hoặc 32:1 có thể được sử dụng.

10. Ứng dụng trị liệu của polypeptit FGF21 đột biến

Polypeptit FGF21 đột biến có thể được sử dụng để điều trị, chẩn đoán, cải thiện hoặc ngăn ngừa một số bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, rối loạn chuyển hóa. Theo một phương án, rối loạn chuyển hóa cần điều trị là bệnh đái tháo đường, ví dụ, bệnh đái tháo đường typ 2. Theo phương án khác, rối loạn chuyển hóa là bệnh béo phì. Các phương án khác bao gồm tình trạng bệnh hoặc rối loạn chuyển hóa như rối loạn lipit huyết; chứng tăng huyết áp; bệnh gan nhiễm mỡ, như bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH); bệnh tim mạch, như bệnh xơ vữa động mạch; và chứng lão hóa.

Khi ứng dụng, rối loạn hoặc tình trạng bệnh như bệnh đái tháo đường hoặc bệnh béo phì có thể được điều trị bằng cách dùng polypeptit FGF21 đột biến nêu trong bản mô tả này cho bệnh nhân cần điều trị với lượng tạo ra liều có hiệu quả trị liệu. Việc dùng có thể được tiến hành như được nêu trong bản mô tả này, như bằng cách tiêm trong tĩnh mạch (IV), tiêm trong màng bụng, tiêm trong cơ hoặc qua đường miệng dưới dạng viên nén hoặc dạng lỏng. Trong hầu hết các trường hợp, liều mong muốn có thể được xác định bởi bác sĩ lâm sàng, như được nêu trong bản mô tả này, và có thể là liều có hiệu quả trị liệu của polypeptit FGF21 đột biến. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hiểu rõ rằng liều có hiệu quả trị liệu của polypeptit FGF21 đột biến sẽ phụ thuộc vào, không kể các yếu tố khác, lịch trình dùng liều, liều đơn vị của chất được dùng, cho dù phân tử axit nucleic hoặc polypeptit được dùng kết hợp với chất trị liệu khác hay không, tình trạng miễn dịch và sức khỏe của đối tượng nhận. Thuật ngữ "liều có hiệu quả trị liệu" trong bản mô tả này chỉ lượng của polypeptit FGF21 đột biến mà tạo ra đáp ứng sinh học hoặc y tế ở hệ mô, động vật hoặc người được tìm kiếm bởi nhà nghiên cứu, bác sĩ hoặc bác sĩ lâm sàng khác, bao gồm sự giảm nhẹ triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn đang được điều trị.

11. Kháng thể

Kháng thể và mảnh kháng thể liên kết đặc hiệu với polypeptit FGF21 đột biến theo sáng chế nhưng không liên kết đặc hiệu với polypeptit FGF21 kiểu dại được bao hàm và thuộc phạm vi của sáng chế. Kháng thể này có thể là đa dòng, bao gồm đa dòng đặc hiệu đơn; đơn dòng (MAb); tái tổ hợp; khảm; được nhân hóa, như được ghép vùng quyết định bổ thể (CDR); của người; chuỗi đơn; và/hoặc đặc hiệu kép; cũng như mảnh; biến thể; hoặc phân tử được cải biến về mặt hóa học của chúng. Mảnh kháng thể bao gồm phần của kháng thể mà liên kết đặc hiệu với epitop trên polypeptit FGF21 đột biến. Ví dụ về mảnh này bao gồm mảnh Fab và mảnh F(ab') được tạo ra bằng cách phân cắt kháng thể nguyên chiều dài bằng enzym. Các mảnh liên kết khác bao gồm mảnh được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, như kỹ thuật biểu hiện plasmit tái tổ hợp chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi kháng thể.

Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" khi được sử dụng trong lĩnh vực kháng thể có nghĩa là kháng thể liên kết với đích của nó trong điều kiện có mặt quần thể protein khác loại và/hoặc vật liệu sinh học khác. Cụ thể hơn, khi kháng thể liên kết đặc hiệu với đích của nó, điều này có nghĩa là trong điều kiện thử nghiệm miễn dịch đã định trước, kháng thể này liên kết với đích của nó và không liên kết ở mức độ đáng kể với các protein khác có mặt trong mẫu. Dạng thử nghiệm miễn dịch thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng để xác định kháng thể mà liên kết đặc hiệu với đích của nó, ví dụ, thử nghiệm miễn dịch ELISA pha rắn. Xem tài liệu, ví dụ, Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York. Kháng thể đa dòng nhắm tới polypeptit FGF21 đột biến thường được tạo ra ở động vật (ví dụ, thỏ hoặc chuột nhắt) bằng cách tiêm polypeptit FGF21 đột biến và chất bổ trợ nhiều lần dưới da hoặc trong màng bụng. Có thể hữu dụng nếu liên hợp polypeptit FGF21 đột biến với protein mang mà có khả năng gây miễn dịch ở loài cần được gây miễn dịch, như keyhole limpet hemocyanin, huyết thanh, albumin, thyroglobulin bò hoặc chất ức chế trypsin đậu tương. Ngoài ra, chất kết tụ như phèn cũng được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch. Sau khi gây miễn dịch, các con vật được lấy máu và huyết thanh được thử nghiệm về hiệu giá kháng thể kháng FGF21 đột biến.

Kháng thể đơn dòng nhắm tới polypeptit FGF21 đột biến có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ mà sản xuất phân tử kháng thể bằng dòng tế bào liên tục trong môi trường nuôi cấy. Ví dụ về phương pháp thích hợp để tạo ra kháng thể đơn dòng bao gồm các phương pháp tế bào lai được mô tả trong tài liệu Kohler et al., 1975, Nature 256: 495-97

và phương pháp tế bào lai tế bào B của người (Kozbor, 1984, J. Immunol. 133: 3001; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). Sáng chế cũng đề xuất dòng tế bào lai mà sản xuất kháng thể đơn dòng có khả năng phản ứng với polypeptit FGF21 đột biến.

Kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được cải biến để sử dụng làm chất trị liệu. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng là kháng thể "khảm" trong đó một phần của chuỗi nặng (H) và/hoặc chuỗi nhẹ (L) là giống với hoặc tương đồng với trình tự tương ứng ở kháng thể có nguồn gốc từ loài cụ thể hoặc thuộc nhóm hoặc phân nhóm kháng thể cụ thể, trong khi đó phần còn lại của (các) chuỗi là giống với hoặc tương đồng với trình tự tương ứng ở kháng thể có nguồn gốc từ loài khác hoặc thuộc nhóm hoặc phân nhóm kháng thể khác. Sáng chế cũng bao gồm mảnh của kháng thể này, miễn là nó thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn. Xem tài liệu, ví dụ, patent Mỹ số 4,816,567; Morrison et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851-55.

Theo phương án khác, kháng thể đơn dòng theo sáng chế là kháng thể "được nhân hóa". Các phương pháp nhân hóa kháng thể không phải của người đã được biết rõ trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, patent Mỹ số 5,585,089 và 5,693,762. Nhìn chung, kháng thể được nhân hóa có một hoặc nhiều gốc axit amin được đưa vào nó từ nguồn không phải của người. Việc nhân hóa có thể được tiến hành, ví dụ, bằng cách sử dụng các phương pháp đã được mô tả trong lĩnh vực (xem tài liệu, ví dụ, Jones et al., 1986, Nature 321: 522-25; Riechmann et al., 1998, Nature 332: 323-27; Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534-36), bằng cách thay thế ít nhất một phần của vùng quyết định bổ thể của loài gặm nhấm cho vùng tương ứng của kháng thể của người.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể của người mà liên kết với polypeptit FGF21 đột biến theo sáng chế. Bằng cách sử dụng động vật chuyển gen (ví dụ, chuột nhắt) có khả năng sản xuất kho kháng thể của người mà không sản xuất globulin miễn dịch nội sinh, có thể tạo ra kháng thể này bằng cách gây miễn dịch bằng kháng nguyên có nguồn gốc từ FGF21 đột biến (tức là, có ít nhất 6 axit amin tiếp giáp), tùy ý được kết hợp vào chất mang. Xem tài liệu, ví dụ, Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 2551-55; Jakobovits et al., 1993, Nature 362: 255-58; Bruggermann et al., 1993, Year in Immuno. 7: 33. Trong một phương

pháp, động vật chuyển gen như vậy được tạo ra bằng cách làm bất hoạt locus nội sinh mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch ở đó, và cài xen locus mã hóa protein chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người vào hệ gen của chúng. Động vật được cải biến một phần, tức là động vật không được bổ sung đầy đủ các cải biến, sau đó được lai chéo để thu được động vật có tất cả các cải biến hệ miễn dịch mong muốn. Khi được cho dùng chất sinh miễn dịch, động vật chuyển gen này sản xuất ra kháng thể có trình tự axit amin của người (chứ không phải là của, ví dụ, chuột), bao gồm vùng biến đổi mà đặc hiệu miễn dịch đối với kháng nguyên này. Xem tài liệu, ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 96/33735 và WO 94/02602. Các phương pháp khác được mô tả trong patent Mỹ số 5,545,807, trong công bố đơn quốc tế số WO 91/10741 và WO 90/04036, và trong patent châu Âu số 0 546 073. Kháng thể của người cũng có thể được sản xuất bằng cách biểu hiện ADN tái tổ hợp ở tế bào chủ hoặc bằng cách biểu hiện ở tế bào lai như được nêu trong bản mô tả này.

Theo phương án khác, kháng thể của người cũng có thể được sản xuất từ thư viện biểu hiện thể thực khuẩn (xem tài liệu, ví dụ, Hoogenboom et al., 1991, J. Mol. Biol. 227: 381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581). Quy trình này bắt chước sự chọn lọc miễn dịch thông qua việc biểu hiện kho kháng thể trên bề mặt của thể thực khuẩn sợi, và sau đó chọn lọc thể thực khuẩn theo liên kết của chúng với kháng nguyên lựa chọn.

Kháng thể khảm, được ghép CDR và được nhân hóa thường được sản xuất bằng phương pháp tái tổ hợp. Axit nucleic mã hóa kháng thể được đưa vào tế bào chủ và được biểu hiện bằng cách sử dụng vật liệu và quy trình nêu trong bản mô tả này. Theo một phương án, kháng thể này được tạo ra ở tế bào chủ động vật có vú, như tế bào CHO. Kháng thể đơn dòng (ví dụ, của người) có thể được tạo ra bằng cách biểu hiện ADN tái tổ hợp ở tế bào chủ hoặc bằng cách biểu hiện ở tế bào lai như được nêu trong bản mô tả này.

Kháng thể kháng FGF21 đột biến theo sáng chế có thể được sử dụng trong phương pháp thử nghiệm đã biết bất kỳ, như thử nghiệm liên kết cạnh tranh, thử nghiệm kiểu bánh kẹp trực tiếp và gián tiếp, và thử nghiệm kết tủa miễn dịch (xem tài liệu, ví dụ, Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques 147-158 (CRC Press, Inc., 1987), tài liệu này được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn) để phát hiện và định lượng

polypeptit FGF21 đột biến. Kháng thể này liên kết với polypeptit FGF21 đột biến với ái lực thích hợp đối với phương pháp thử nghiệm được sử dụng.

Để ứng dụng trong chẩn đoán, theo các phương án nhất định, kháng thể kháng FGF21 đột biến có thể được đánh dấu bằng gốc có thể phát hiện được. Gốc có thể phát hiện được có thể là gốc bất kỳ có khả năng tạo ra, trực tiếp hoặc gián tiếp, tín hiệu có thể phát hiện được. Ví dụ, gốc có thể phát hiện được có thể là chất đồng vị phóng xạ, như ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{125}I, ^{99}Tc, ^{111}In hoặc ^{67}Ga; hợp chất phát huỳnh quang hoặc phát quang hóa học, như floresxein isothioxyanat, rodamin hoặc luxiferin; hoặc enzym, như phosphataza kiềm, β-galactosidaza hoặc peroxidaza cải ngựa (Bayer et al., 1990, Meth. Enz. 184: 138-63).

Thử nghiệm liên kết cạnh tranh dựa vào khả năng của chất chuẩn được đánh dấu (ví dụ, polypeptit FGF21 đột biến hoặc phần có khả năng phản ứng miễn dịch của nó) trong việc cạnh tranh với chất phân tích mẫu thử nghiệm (ví dụ, polypeptit FGF21 đột biến) để liên kết với lượng giới hạn của kháng thể kháng FGF21 đột biến. Lượng polypeptit FGF21 đột biến trong mẫu thử nghiệm tỷ lệ nghịch với lượng của chất chuẩn mà sẽ được liên kết với kháng thể. Để tạo thuận lợi cho việc xác định lượng chất chuẩn sẽ được liên kết, kháng thể thường được làm cho không tan được trước hoặc sau khi cạnh tranh, sao cho chất chuẩn và chất phân tích mà được liên kết với kháng thể có thể được tách một cách thuận lợi ra khỏi chất chuẩn và chất phân tích mà không được liên kết.

Thử nghiệm kiểu bánh kẹp thường bao gồm việc sử dụng hai kháng thể, mỗi kháng thể có khả năng liên kết với phần có khả năng gây miễn dịch khác nhau, hoặc epitop, của protein cần được phát hiện và/hoặc định lượng. Trong thử nghiệm kiểu bánh kẹp, chất phân tích mẫu thử nghiệm thường được liên kết bởi kháng thể thứ nhất được giữ cố định trên nền đỡ rắn, và sau đó kháng thể thứ hai liên kết với chất phân tích này, từ đó tạo thành phức hợp ba phần không tan được. Xem tài liệu, ví dụ, patent Mỹ số 4,376,110. Bản thân kháng thể thứ hai có thể được đánh dấu bằng gốc có thể phát hiện được (thử nghiệm kiểu bánh kẹp trực tiếp) hoặc có thể được đo bằng cách sử dụng kháng thể kháng globulin miễn dịch được đánh dấu bằng gốc có thể phát hiện được (thử nghiệm kiểu bánh kẹp gián tiếp). Ví dụ, một loại thử nghiệm kiểu bánh kẹp là thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), trong đó gốc có thể phát hiện được là enzym.

Kháng thể kháng FGF21 đột biến theo sáng chế cũng hữu dụng để chụp ảnh *in vivo*. Kháng thể được đánh dấu bằng gốc có thể phát hiện được có thể được dùng cho động vật, tốt hơn là vào dòng máu, và sự có mặt và vị trí của kháng thể được đánh dấu trong vật chủ được thử nghiệm. Kháng thể này có thể được đánh dấu bằng gốc bất kỳ mà có thể phát hiện được ở động vật, bằng kỹ thuật cộng hưởng từ hạt nhân, phóng xạ hoặc các kỹ thuật phát hiện khác đã biết trong lĩnh vực.

Kháng thể FGF21 đột biến theo sáng chế có thể được sử dụng làm chất trị liệu. Chất trị liệu này thường là chất chủ vận hoặc chất đối kháng, trong đó chúng tăng cường hoặc làm giảm, một cách tương ứng, ít nhất một trong số các hoạt tính sinh học của polypeptit FGF21 đột biến. Theo một phương án, kháng thể đối kháng theo sáng chế là kháng thể hoặc mảnh liên kết của chúng mà có khả năng liên kết đặc hiệu với polypeptit FGF21 đột biến và có khả năng ức chế hoặc loại bỏ hoạt tính chức năng của polypeptit FGF21 đột biến *in vivo* hoặc *in vitro*. Theo một số phương án, kháng thể đối kháng ức chế hoạt tính chức năng của polypeptit FGF21 đột biến ít nhất khoảng 50%, và tốt hơn là ít nhất khoảng 80%. Theo phương án khác, kháng thể kháng FGF21 đột biến có khả năng gây ảnh hưởng tới sự tương tác giữa polypeptit FGF21 đột biến và thụ thể FGF, từ đó ức chế hoặc loại bỏ hoạt tính polypeptit FGF21 đột biến *in vitro* hoặc *in vivo*. Kháng thể kháng FGF21 đột biến chủ vận và đối kháng được xác định bằng thử nghiệm sàng đã biết rõ trong lĩnh vực.

Sáng chế cũng đề cập tới kit chứa kháng thể FGF21 đột biến và chất phản ứng khác hữu dụng để phát hiện lượng polypeptit FGF21 đột biến trong mẫu sinh học. Chất phản ứng này có thể bao gồm chất đánh dấu có thể phát hiện được, huyết thanh phong bế, mẫu đối chứng dương và âm và chất phản ứng phát hiện.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây minh họa cho các phương án cụ thể của sáng chế và các ứng dụng khác nhau của chúng. Các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Ví dụ 1

Tạo cấu trúc biểu hiện FGF21

Trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit FGF21 trưởng thành được thu nhận bằng cách khuếch đại phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) sử dụng các đoạn mồi có trình tự nucleotit tương ứng với các đầu 5' và 3' của trình tự FGF21 trưởng thành. Bảng 2 liệt kê các đoạn mồi được sử dụng để khuếch đại trình tự FGF21 trưởng thành.

Bảng 2

Các đoạn mồi PCR dùng để tạo cấu trúc FGF21

Đoạn mồi	Trình tự	SEQ ID NO:
Có nghĩa	5'-AGGAGGAATAACATATGCATCCAATTCCAGATTCTTCTCC-3'	12
Đối nghĩa	5'-TAGTGAGCTCGAATTCTTAGGAAGCGTAGCTGG-3'	13

Các đoạn mồi được sử dụng để tạo cấu trúc biểu hiện FGF21 trưởng thành có tích hợp các vị trí endonucleaza giới hạn (vị trí NdeI cũng có metionin đầu N để biểu hiện ở vi khuẩn) để tách dòng có định hướng trình tự vào vectơ biểu hiện thích hợp (ví dụ, pET30 (Novagen/EMD Biosciences; San Diego, CA) hoặc pAMG33 (Amgen; Thousand Oaks, CA)). Vectơ biểu hiện pAMG33 chứa điểm khởi đầu sao chép R-100 có số lượng bản sao thấp, trình tự khởi đầu *lac* được cải biến và gen kháng kanamyxin. Vectơ biểu hiện pET30 chứa điểm khởi đầu sao chép có nguồn gốc từ pBR322, trình tự khởi đầu T7 cảm ứng và gen kháng kanamyxin. Mặc dù sự biểu hiện từ pAMG33 được phát hiện thấy là cao hơn, nhưng pET30 được phát hiện thấy là vectơ tách dòng đáng tin cậy hơn. Do đó, phần lớn các cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này trước tiên được tạo ra ở pET30 và sau đó được sàng lọc về tính hiệu quả. Các trình tự được chọn sau đó được chuyển vào pAMG33 để khuếch đại tiếp.

Trình tự FGF21 được khuếch đại trong hỗn hợp phản ứng chứa 40,65 µL dH_2O, 5 µL chất đệm phản ứng PfuUltra II (10x), 1,25 µL hỗn hợp dNTP (40 mM – 4 x 10 mM), 0,1 µL khuôn (100 ng/mL), 1 µL đoạn mồi 1 (10 µM), 1 µL đoạn mồi 2 (10 µM) và 1 µL PfuUltra II dung hợp HS ADN Polymeaza (Stratagene; La Jolla, CA). Các phản ứng khuếch đại được tiến hành bằng cách gia nhiệt trong 2 phút ở 95°C; sau đó là mười chu kỳ ở 95°C trong 20 giây, 60°C trong 20 giây (trừ thêm 1°C mỗi chu kỳ) và 72°C trong 15 giây/kilobazơ của sản phẩm

mong muốn; sau đó là 20 chu kỳ ở 94°C trong 20 giây, 55°C trong 20 giây và 72°C trong 15 giây/kilobazơ của sản phẩm mong muốn; sau đó là 72°C trong 3 phút. Các sản phẩm khuếch đại được phân giải bằng các endonucleaza giới hạn NdeI, DpnI và EcoRI; được nối vào vectơ thích hợp; và sau đó được biến nạp vào tế bào có đủ khả năng.

Ví dụ 2

Tinh chế protein FGF21 từ vi khuẩn

Trong các ví dụ sau đây, các protein FGF21 khác nhau, bao gồm polypeptit FGF21 kiểu dại, polypeptit FGF21 dạng cắt cụt, FGF21 đột biến và protein dung hợp FGF21, được biểu hiện ở hệ biểu hiện vi khuẩn. Sau khi biểu hiện, được mô tả dưới đây, các protein FGF21 này được tinh chế như được mô tả trong ví dụ này, trừ khi có quy định khác.

Để tinh chế polypeptit FGF21 kiểu dại, polypeptit FGF21 dạng cắt cụt và FGF21 đột biến từ các thể vùi vi khuẩn, các thể vùi được rửa hai lần (DWIB: double-washed inclusion body) được làm tan trong chất đệm hoà tan chứa guanidin hydroclorua và DTT trong chất đệm Tris ở độ pH 8,5. Sau đó, chúng được trộn trong một giờ ở nhiệt độ phòng, và hỗn hợp hoà tan được thêm vào chất đệm tái gấp nếp chứa ure, arginin, xystein và xystamin hydroclorua ở độ pH 9,5 và sau đó được trộn trong 24 giờ ở 5°C (xem tài liệu, ví dụ, Clarke, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 157-63; Mannall et al., 2007, Biotechnol. Bioeng. 97: 1523-34; Rudolph et al., 1997, "Folding proteins," Protein Function: A Practical Approach (Creighton, ed., New York, IRL Press) 57-99; và Ishibashi et al., 2005, Protein Expr. Purif. 42: 1-6).

Sau khi hoà tan và tái gấp nếp, hỗn hợp được lọc qua màng lọc loại 0,45 micromet. Phần gom tái gấp nếp sau đó được cô khoảng 10 lần bằng cat-xet Pall Omega có giới hạn phân tử lượng là 10 kD ở áp suất xuyên màng (TMP: transmembrane pressure) bằng 20 psi, và được lọc thẩm tách bằng 3 thể tích cột của Tris 20 mM, độ pH 8,0 ở TMP bằng 20 psi.

Mẫu được làm trong sau đó được đưa qua sắc ký trao đổi anion (AEX: anion exchange) bằng cách sử dụng nhựa Q Sepharoza HP. Gradien muối tuyến tính từ 0 đến 250 mM NaCl trong Tris 20 mM được chạy ở độ pH 8,0 ở 5°C. Các phân đoạn đỉnh được phân tích bằng SDS-PAGE và được gom lại.

Phần gom dịch rửa giải AEX sau đó được đưa qua sắc ký tương tác kỵ nước (HIC: hydrophobic interaction chromatography) bằng cách sử dụng nhựa Phenyl Sepharoza HP. Protein được rửa giải bằng cách sử dụng gradien tuyến tính giảm từ 0,7 M đến 0 M amoni sulfat ở độ pH 8,0 và nhiệt độ môi trường xung quanh. Các phân đoạn đỉnh được phân tích bằng SDS-PAGE (Laemmli, 1970, *Nature* 227: 680-85) và được gom lại.

Phần gom HIC được cô bằng cat-xet Pall Omega 0,2 m^2 có giới hạn phân tử lượng là 10 kD đến 7 mg/mL ở TMP bằng 20 psi. Phần cô được lọc thẩm tách bằng 5 thể tích cột của chất đệm bào chế ở TMP bằng 20 psi, và phần cô thu được được pha loãng đến 5 mg/mL. Cuối cùng, dung dịch được lọc qua màng Pall mini-Kleenpac 0,2 μM Posidyne.

Để tinh chế protein dung hợp FGF21 và protein dung hợp FGF21 đột biến từ các thể vùi vi khuẩn, các thể vùi được rửa hai lần (DWIB) được làm tan trong chất đệm hoà tan chứa guanidin hydroclorua và DTT trong chất đệm Tris ở độ pH 8,5 và sau đó được trộn trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, hỗn hợp hoà tan được thêm vào chất đệm tái gấp nếp chứa ure, arginin, xystein và xystamin hydroclorua ở độ pH 9,5 và sau đó được trộn trong 24 giờ ở 5°C (xem tài liệu, ví dụ, Clarke, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 157-63; Mannall et al., 2007, Biotechnol. Bioeng. 97: 1523-34; Rudolph et al., 1997, "Folding Proteins," Protein Function: A Practical Approach (Creighton, ed., New York, IRL Press) 57-99; và Ishibashi et al., 2005, Protein Expr. Purif. 42: 1-6).

Sau khi hoà tan và tái gấp nếp, hỗn hợp được thẩm tách bằng 5 thể tích của Tris 20 mM, độ pH 8,0 bằng cách sử dụng ống thẩm tách 10 kD. Độ pH của phần tái gấp nếp đã được thẩm tách được điều chỉnh đến 5,0 bằng axit axetic 50%, và sau đó được làm trong bằng cách ly tâm trong 30 phút ở 4K.

Mẫu được làm trong sau đó được đưa qua sắc ký trao đổi anion (AEX: anion exchange) bằng cách sử dụng nhựa Q Sepharoza HP. Gradien muối tuyến tính từ 0 đến 250 mM NaCl trong Tris 20 mM được chạy ở độ pH 8,0 ở 5°C. Các phân đoạn đỉnh được phân tích bằng SDS-PAGE (Laemmli, 1970, *Nature* 227: 680-85) và được gom lại.

Phần gom dịch rửa giải AEX sau đó được đưa qua sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) bằng cách sử dụng nhựa Phenyl Sepharoza HP. Protein được rửa giải bằng cách sử dụng

gradien tuyến tính giảm từ 0,6 M đến 0 M amoni sulfat ở độ pH 8,0 ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Các phân đoạn đỉnh được phân tích bằng SDS-PAGE và được gom lại.

Sau bước HIC, phần gom sau đó được thẩm tách bằng 60 thể tích của chất đệm bào chế. Phần gom đã được thẩm tách được cô đến 5 mg/mL bằng cách sử dụng Pall Jumbosep. Cuối cùng, dung dịch được lọc qua màng Pall mini-Kleenpac 0,2 µM Posidyne.

Ví dụ 3

Tạo và biểu hiện protein FGF21 dạng cắt cụt

Các cấu trúc mã hóa protein FGF21 dạng cắt cụt được liệt kê trong bảng 3 được tạo ra bằng cách khuếch đại PCR vectơ biểu hiện FGF21 kiểu dại như được nêu dưới đây (việc tạo cấu trúc vectơ biểu hiện FGF21 kiểu dại được mô tả trong ví dụ 1).

Bảng 3

Các cải biến cắt cụt của FGF21

Gốc axit amin	Số lượng gốc được cắt cụt*
Cải biến cắt cụt đầu C	
1 – 180	1
1 – 179	2
1 – 178	3
1 – 177	4
1 – 176	5
1 – 175	6
1 – 174	7
1 – 173	8
1 – 172	9
1 – 171	10
1 – 169	12
1 – 168	13
1 – 167	14
1 – 166	15
1 – 165	16
1 – 164	17
1 – 160	21
1 – 156	25
1 – 152	29
1 – 149	32
1 – 113	68

Gốc axit amin	Số lượng gốc được cắt cụt*
Cải biến cắt cụt đầu N	
2 – 181	1
3 – 181	2
4 – 181	3
5 – 181	4
6 – 181	5
7 – 181	6
8 – 181	7
9 – 181	8
Cải biến cắt cụt đầu C và N	
5 – 174	11
7 – 172	17
9 – 169	20
9 – 149	40
15 – 169	26
15 – 149	46
15 – 113	82

* so với polypeptit FGF21 trưởng thành

Các cấu trúc protein FGF21 dạng cắt cụt được tạo ra bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự tương đồng với các vùng ở phía trên và phía dưới của codon (hoặc các codon) cần được làm khuyết (tạo ra cải biến cắt cụt). Các đoạn mồi được sử dụng trong các phản ứng khuếch đại như vậy cũng tạo ra khoảng 15 nucleotit có trình tự gối chồng để cho phép tái tuần hoàn sản phẩm khuếch đại, tức là toàn bộ vectơ mà hiện đã có thể đột biến hoặc cải biến cắt cụt mong muốn.

Cấu trúc FGF21 dạng cắt cụt làm ví dụ, mà mã hóa protein FGF21 thiếu gốc histidin ở vị trí 1 của trình tự FGF21 trưởng thành (tức là, thể đột biến cắt cụt 2-181), được tạo ra bằng cách sử dụng các đoạn mồi được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4

Các đoạn mồi PCR dùng để tạo ra FGF21 đột biến cắt cụt làm ví dụ

Đoạn mồi	Trình tự	SEQ ID NO:
Có nghĩa	5'-GGAGATATACATATGCCAATTCCAGATTCTTCTCCATTATT-3'	14
Đối nghĩa	5'-CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAA-3'	15

Các đoạn mồi được thể hiện trong bảng 4 cho phép làm khuyết gốc histidin như được thể hiện dưới đây, trong đó trình tự trên cùng (SEQ ID NO:9) là một phần của polypeptit FGF21 trưởng thành chứa metionin đầu N, trình tự thứ hai là đoạn mồi có nghĩa (SEQ ID NO:14), các trình tự thứ ba và thứ tư (SEQ ID NO:17 và 18) là các phần của cấu trúc biểu hiện FGF21, và trình tự thứ năm là đoạn mồi đối nghĩa (SEQ ID NO:16):

MetHisProIleProAspSerSerProLeu

5'-GGAGATATACATATG---CCAATTCCAGATTCTTCTCCATTATT

TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG**CAT**CCAATTCCAGATTCTTCT CCATTATT

AAAACAAATTGAAATTCTTCCTCTATATGTATAC**GTA**GGTTAAGGTCTAAGAAG AGGTAATAA

AAAACAAATTGAAATTCTTCCTCTATATGTATAC-5'

Các cấu trúc protein FGF21 dạng cắt cụt được tạo ra bằng cách sử dụng về cơ bản là các điều kiện PCR được mô tả trong ví dụ 1. Sản phẩm khuếch đại được phân giải bằng endonucleaza giới hạn DpnI, và sau đó được biến nạp vào tế bào có đủ khả năng. Các dòng thu được được xác định trình tự để khẳng định không có lỗi do polymeaza gây ra.

Các protein FGF21 dạng cắt cụt được biểu hiện bằng cách biến nạp các tế bào BL21 (DE3) hoặc BL21 Star có đủ khả năng (Invitrogen; Carlsbad, CA) có cấu trúc mã hóa protein FGF21 dạng cắt cụt cụ thể. Các thể biến nạp được cho sinh trưởng qua đêm trong điều kiện

sục khí hạn chế trong môi trường TB được bổ sung 40 µg/mL kanamyxin, được sục khí vào sáng hôm sau, và sau khoảng thời gian phục hồi ngắn, được gây cảm ứng trong IPTG 0,4 mM. Các FGF21 đột biến được thu gom bằng cách ly tâm 18-20 giờ sau khi cảm ứng.

Ví dụ 4

Hoạt tính *in vitro* của protein FGF21 dạng cắt cụt

Các thử nghiệm được tiến hành để xác định protein FGF21 dạng cắt cụt mà giữ lại được hoạt tính FGF21 kiểu dại trong thử nghiệm ELK-luxiferaza *in vitro*. Bảng 5 tổng kết các kết quả thu được đối với các protein FGF21 chứa phần cắt cụt ở đầu N, đầu C, hoặc ở cả đầu N và đầu C. Các thử nghiệm ELK-luxiferaza được tiến hành bằng cách sử dụng hệ tế bào thận 293T tái tổ hợp của người, trong đó các tế bào 293T này biểu hiện quá mức các cấu trúc chỉ thị luxiferaza và β-Klotho. Các cấu trúc này còn chứa các trình tự mã hóa GAL4-ELK1 và 5xUAS-Luc, yếu tố chỉ thị luxiferaza được điều khiển bởi trình tự khởi đầu chứa năm bản sao nối tiếp của vị trí liên kết Gal4. β-Klotho là đồng thụ thể cần thiết cho FGF21 để hoạt hóa thụ thể FGF của nó và gây ra sự truyền tín hiệu nội bào, mà sau đó dẫn đến sự phosphoryl hóa Erk và ELK. Hoạt tính luxiferaza được điều hòa bởi mức Erk/ELK1 đã được phosphoryl hoá, và được sử dụng để gián tiếp theo dõi và định lượng hoạt tính FGF21.

Các thử nghiệm ELK-luxiferaza được tiến hành bằng cách nuôi cấy tế bào 293T trong điều kiện có mặt các nồng độ khác nhau của polypeptit FGF21 kiểu dại hoặc polypeptit FGF21 đột biến trong 6 giờ, và sau đó thử nghiệm dịch ly giải tế bào về hoạt tính luxiferaza. Các Fig.1A-1B thể hiện kết quả của thử nghiệm hoạt tính ELK-luxiferaza được thực hiện trên các FGF21 đột biến cắt cụt 7-181 và 8-181 (Fig.1A) và các FGF21 đột biến cắt cụt 1-172, 1-171, 1-169 và 1-164 (Fig.1B). Sự phát quang thu được trong các thử nghiệm ELK-luxiferaza đối với mỗi FGF21 đột biến cắt cụt 3-181, 4-181, 5-181, 7-181, 8-181, 1-180, 1-178, 1-177, 1-176, 1-175, 1-174, 1-173, 1-172, 9-181 và 1-149 được thể hiện trên Fig.2.

Các polypeptit FGF21 đột biến được so sánh với FGF21 kiểu dại chuẩn, và các thể đột biến thể hiện hiệu quả bằng ít nhất 50% hiệu quả của FGF21 kiểu dại được coi là không bị mất hoạt tính FGF21 và được ký hiệu là "+" trong bảng 5.

Bảng 5

Các protein FGF21 dạng cắt cụt: thử nghiệm *in vitro*

Cải biến cắt cụt đầu C		
Gốc axit amin	Hiệu quả	Hoạt tính (+/–)
1 – 180	93,2%	+
1 – 178	95,0%	+
1 – 177	112,0%	+
1 – 176	104,8%	+
1 – 174	104,6%	+
1 – 173	96,1%	+
1 – 172	97,5%	+
1 – 171	113,0%	+
1 – 169	84,9%	+
1 – 167	20%	–
1 – 166	20%	–
1 – 165	10%	–
Cải biến cắt cụt đầu N		
Gốc axit amin	Hiệu quả	Hoạt tính (+/–)
2 – 181	112,5%	+
3 – 181	130,3%	+
4 – 181	117,0%	+
5 – 181	119,6%	+
7 – 181	74,2%	+
8 – 181	24,9%	–
9 – 181	12,5%	–

Nói chung, các kết quả được trình bày trong bảng 5 cho thấy các cải biến khuyết đầu C gồm 14 gốc axit amin hoặc nhiều hơn (tức là, protein FGF21 dạng cắt cụt đầu C gồm các gốc axit amin 1-167 và các protein ngắn hơn) loại bỏ hoạt tính của FGF21. Ngoài ra, bảng 5 cho thấy rằng các cải biến khuyết đầu N gồm 7 gốc axit amin hoặc nhiều hơn (tức là, protein FGF21 dạng cắt cụt đầu N gồm các gốc axit amin 8-181 và các protein ngắn hơn) loại bỏ hoạt tính của FGF21. Không ngạc nghiên là, protein FGF21 dạng cắt cụt mang cả cải biến cắt cụt đầu N gồm từ 8 đến 14 gốc và cải biến cắt cụt đầu C gồm 12 hoặc 32 gốc được phát hiện thấy là không có hoạt tính trong thử nghiệm ELK-luxiferaza.

Phù hợp với dữ liệu được thể hiện trong bảng 5, các polypeptit FGF21 dạng cắt cụt có cải biến cắt cụt đầu N gồm ít hơn 7 gốc axit amin tạo thành các phương án của sáng chế.

Tương tự, các polypeptit FGF21 dạng cắt cụt có cải biến cắt cụt đầu C gồm ít hơn 13 gốc axit amin tạo thành các phương án của sáng chế.

Ví dụ 5

Hoạt tính *in vivo* của protein FGF21 dạng cắt cụt

FGF21 có một số hoạt tính sinh học, bao gồm khả năng làm giảm lượng glucoza, insulin, triglyxerit hoặc cholesterol trong máu; làm giảm trọng lượng cơ thể; hoặc cải thiện sự dung nạp glucoza, sự tiêu thụ năng lượng hoặc độ nhạy insulin. Các polypeptit FGF21 dạng cắt cụt còn được phân tích về hoạt tính FGF21 *in vivo*, bằng cách đưa các polypeptit FGF21 dạng cắt cụt này vào chuột nhắt ob/ob kháng insulin, và đo khả năng làm giảm glucoza trong máu của polypeptit FGF21 dạng cắt cụt cụ thể. Polypeptit FGF21 dạng cắt cụt cần được thử nghiệm được tiêm trong màng bụng vào chuột nhắt ob/ob 8 tuần tuổi (Jackson Laboratory), và các mẫu máu được thu tại các thời điểm khác nhau sau một lần tiêm đơn lẻ, ví dụ, 0, 6, 24, 72, 120 và 168 giờ sau khi tiêm. Lượng glucoza trong máu được đo bằng thiết bị OneTouch Glucometer (LifeScan, Inc. Milpitas, CA), và các kết quả được thể hiện dưới dạng % thay đổi của glucoza trong máu so với lượng ban đầu của glucoza trong máu (tức là, tại thời điểm 0).

Các kết quả của một thử nghiệm được thể hiện trên Fig.3, mà thể hiện lượng glucoza trong máu được phát hiện ở chuột nhắt được tiêm các FGF21 đột biến cắt cụt 8-181 và 9-181. Thử nghiệm này chứng tỏ rằng các protein dung hợp FGF21 dạng cắt cụt gồm các gốc axit amin 8-181 thể hiện hoạt tính làm giảm glucoza trong máu *in vivo*, tuy nhiên hoạt tính này nhỏ hơn một chút so với hoạt tính của FGF21 kiểu dại ở 3 và 6 giờ sau khi tiêm, còn các protein dung hợp FGF21 dạng cắt cụt gồm các gốc axit amin 9-181 không thể hiện hoạt tính này. Như vậy, việc phân tích các polypeptit FGF21 dạng cắt cụt *in vivo* cho thấy rằng cải biến khuyết lên đến 7 axit amin ra khỏi đầu N của FGF21 trưởng thành không làm mất hoạt tính sinh học của phân tử này (ngược lại với phân tích *in vitro*, mà cho thấy rằng cải biến khuyết 7 axit amin ra khỏi đầu N của FGF21 trưởng thành sẽ làm mất hoạt tính).

Các kết quả khác nhau thu được với các polypeptit FGF21 dạng cắt cụt đầu N cụ thể (ví dụ, FGF21 8-181) trong các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* có thể được giải thích bằng sự tương tác của FGF21 với thụ thể FGF và β-Klotho trong quá trình thực hiện việc truyền tín hiệu. Cụ thể, FGF21 hoạt hóa phức hợp thụ thể kép gồm đồng thụ thể β-Klotho và thụ thể

FGF (FGFR), việc này khởi động thác truyền tín hiệu liên quan đến tyrosin kinaza. Đầu N của FGF21 đã được cho thấy là tham gia vào việc liên kết và hoạt hóa FGFR trong khi đầu C của FGF21 là cần thiết cho sự tương tác β-Klotho (Yie et al., 2009 FEBS Lett. 583:19-24). Thử nghiệm ELK-luxiferaza *in vitro* được tiến hành ở các tế bào thận 293 trong đó đồng thụ thể β-Klotho được biểu hiện quá mức và FGFR được biểu hiện ở mức độ bình thường. Lượng của FGFR là thấp so với lượng của β-Klotho và do đó tỷ lệ của β-Klotho với FGFR trong các tế bào 293 không mang tính sinh lý, mà có thể ảnh hưởng đến sự tạo thành phức hợp thụ thể và cuối cùng là sự liên kết phối tử và sự kích hoạt FGFR. Hệ 293 *in vitro* có vẻ dễ bị tổn thương hơn đối với các polypeptit FGF21 dạng cắt cụt đầu N và do đó có thể gây ra sự mất hoạt tính đối với một số ít thể đột biến cắt cụt đầu N được thử nghiệm, như FGF21 8-181. Như vậy, trong việc xác định xem liệu FGF21 đột biến cắt cụt đầu N cụ thể có giữ lại được hoạt tính FGF21 kiểu dại hay không, thì hoạt tính của FGF21 đột biến đó trong thử nghiệm *in vivo* được coi là mang tính quyết định. Do đó, các polypeptit FGF21 dạng cắt cụt có cải biến cắt cụt đầu N gồm ít hơn 8 gốc axit amin được bao hàm bởi sáng chế.

Ví dụ 6

Tạo và biểu hiện protein dung hợp FGF21 dạng cắt cụt

Vì thời gian bán hủy của protein có thể được làm tăng lên bằng cách dung hợp protein với trình tự Fc, nên các protein dung hợp chứa polypeptit FGF21 dạng cắt cụt được tạo ra và được phân tích. Các protein dung hợp FGF21 dạng cắt cụt được liệt kê trong bảng 6 được tạo ra từ các trình tự FGF21 được khuếch đại bằng PCR SOEing (ghép nối gen bằng cách kéo dài chồng lặp). Các protein dung hợp FGF21 được tạo ra sao cho phần Fc của gen IgG1 globulin miễn dịch của người (SEQ ID NO:11) được dung hợp vào đầu N hoặc đầu C của protein FGF21.

Bảng 6

Các protein dung hợp FGF21 dạng cắt cụt

Gốc axit amin	Vị trí Fc	Nhóm liên kết
Cải biến cắt cụt đầu C		
1 – 178	-NH_2	15
1 – 175	-NH_2	14
1 – 175	-COOH	15

Gốc axit amin	Vị trí Fc	Nhóm liên kết
1 – 171	-NH_2	15
1 – 171	-COOH	15
1 – 170	-COOH	15
Cải biến cắt cụt đầu N		
5 – 181	-NH_2	15
5 – 181	-COOH	15
7 – 181	-NH_2	15
7 – 181	-COOH	15
Cải biến cắt cụt đầu C và N		
5 – 175	-NH_2	15
5 – 175	-COOH	15
5 – 171	-NH_2	15
5 – 171	-COOH	15
6 – 170	-COOH	15
7 – 178	-COOH	35
7 – 175	-NH_2	15
7 – 175	-COOH	15
7 – 174	-COOH	35
7 – 172	-COOH	35
7 – 171	-NH_2	15
7 – 171	-COOH	35
7 – 171	-COOH	15

Cụ thể, các cấu trúc protein dung hợp FGF21 (bao gồm các cấu trúc mã hóa các protein dung hợp FGF21 dạng cắt cụt) được tạo ra trong một chuỗi gồm ba phản ứng khuếch đại bằng cách sử dụng về cơ bản là các điều kiện phản ứng được mô tả trong ví dụ 1. Trong phản ứng thứ nhất, cặp đoạn mồi được thiết kế để tạo ra trình tự chứa vị trí tách dòng NdeI (chứa metionin đầu N để biểu hiện ở vi khuẩn), vùng Fc và trình tự liên kết. Trong phản ứng thứ hai, cặp đoạn mồi được thiết kế để tạo ra trình tự chứa phần chồng lặp của nhóm liên kết, một phần của trình tự mã hoá FGF21 và vị trí tách dòng EcoRI. Cuối cùng, trong phản ứng thứ ba, cặp đoạn mồi được thiết kế nhằm mục đích liên kết các sản phẩm của hai phản ứng đầu tiên. Bộ đoạn mồi làm ví dụ dùng để tạo cấu trúc Fc-FGF21 1-181 được liệt kê trong bảng 7.

Bảng 7

Các đoạn mồi PCR dùng để tạo cấu trúc protein dung hợp FGF21 làm ví dụ

Đoạn mồi	Trình tự	SEQ ID NO:
Phản ứng 1		
Có nghĩa	5'-AGGAGGAATAACATATGGACAAAACTCACACATG-3'	19
Đối nghĩa	5'-GGATCCACCACCACCGCTACCAC-3'	20
Phản ứng 2		
Có nghĩa	5'-GGTGGTGGTGGATCCCATCCAATTCCAGATTCTTCTCCA-3'	21
Đối nghĩa	5'-TAGTGAGCTCGAATTCTTAGGAAGCGTAGCTGG-3'	22
Phản ứng 3		
Có nghĩa	5'-AGGAGGAATAACATATGGACAAAACTCACACATG-3'	19
Đối nghĩa	5'-TAGTGAGCTCGAATTCTTAGGAAGCGTAGCTGG-3'	22

Sản phẩm của phản ứng cuối cùng được phân giải bằng các endonucleaza giới hạn NdeI và EcoRI, được nối vào vectơ pET30, và sau đó được biến nạp vào tế bào có đủ khả năng. Các dòng thu được được xác định trình tự để khẳng định không có lỗi do polymeaza gây ra.

Ví dụ 7

Hoạt tính *in vivo* của protein dung hợp FGF21 dạng cắt cụt

Các protein dung hợp chứa trình tự FGF21 dạng cắt cụt được dung hợp với trình tự Fc được tạo ra và được thử nghiệm về hoạt tính *in vivo*. Các protein dung hợp FGF21 dạng cắt cụt được tạo ra bằng cách dung hợp phân tử IgG1 Fc vào đầu N hoặc đầu C của protein FGF21 dạng cắt cụt để tạo thành một trình tự liên tục đơn lẻ. Để phân biệt giữa các thể dung hợp đầu N và đầu C, các protein dung hợp FGF21 trong đó phân tử Fc được dung hợp vào đầu N của protein FGF21 được gọi là Fc-FGF21, và các protein dung hợp trong đó phân tử Fc được dung hợp vào đầu C của protein FGF21 được gọi là FGF21-Fc.

FGF21 có một số hoạt tính sinh học, bao gồm khả năng làm giảm lượng glucoza, insulin, triglyxerit hoặc cholesterol trong máu; làm giảm trọng lượng cơ thể; hoặc cải thiện sự dung nạp glucoza, sự tiêu thụ năng lượng hoặc độ nhạy insulin. Để đánh giá hoạt tính FGF21 *in vivo*, các polypeptit FGF21, polypeptit FGF21 đột biến và polypeptit dung hợp FGF21 được đưa vào chuột nhắt ob/ob kháng insulin, và khả năng làm giảm lượng glucoza trong máu của protein FGF21 cụ thể được đo. Polypeptit FGF21, polypeptit FGF21 đột biến hoặc polypeptit dung hợp FGF21 cần được thử nghiệm được tiêm trong màng bụng vào các con chuột nhắt ob/ob 8 tuần tuổi (Jackson Laboratory), và các mẫu máu được thu tại các thời điểm khác nhau sau một lần tiêm đơn lẻ, ví dụ, 0, 6, 24, 72, 120 và 168 giờ sau khi tiêm. Lượng glucoza trong máu được đo bằng thiết bị OneTouch Glucometer (LifeScan, Inc. Milpitas, CA), và các kết quả được thể hiện dưới dạng % thay đổi của glucoza trong máu so với lượng ban đầu của glucoza trong máu (tức là, tại thời điểm 0).

Các kết quả của một thử nghiệm được trình bày trên Fig.4, mà thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu được quan sát thấy ở chuột nhắt được tiêm đối chứng PBS, đối chứng Fc-FGF21 kiểu dại chứa các gốc axit amin 1-181, hoặc các protein dung hợp Fc-FGF21 dạng cắt cụt chứa các gốc axit amin 5-181 hoặc 7-181. Thử nghiệm này chứng tỏ rằng các protein dung hợp Fc-FGF21 dạng cắt cụt chứa các gốc axit amin 5-181 hoặc 7-181 thể hiện hoạt tính làm giảm glucoza trong máu tương tự với hoạt tính của Fc-FGF21 kiểu dại tại thời điểm 6 giờ sau khi tiêm. Như vậy, việc phân tích các polypeptit FGF21 dạng cắt cụt *in vivo* cho thấy rằng cải biến khuyết lên đến 6 axit amin ra khỏi đầu N của FGF21 trưởng thành không ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của phân tử này. Tuy nhiên, phân tích *in vivo* cũng chỉ ra rằng khả năng làm giảm glucoza trong máu của các polypeptit FGF21 dạng cắt cụt bị giảm đi và lượng glucoza trong máu trở về mức ban đầu tại thời điểm 24 giờ sau khi tiêm (các kết quả tương tự cũng được thu với FGF21 kiểu dại). Hoạt tính *in vivo* ngắn được phát hiện thấy là do sự phân hủy phân giải protein FGF21, như được mô tả trong ví dụ 8.

Các kết quả của thử nghiệm khác được trình bày trên Fig.5, mà thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu được quan sát thấy ở chuột nhắt được tiêm đối chứng PBS, đối chứng FGF21-Fc kiểu dại chứa các gốc axit amin 1-181, protein dung hợp FGF21-Fc dạng cắt cụt chứa các gốc 1-175 hoặc protein Fc-FGF21 dạng cắt cụt chứa các gốc axit amin 1-171. Thử nghiệm này chứng tỏ rằng FGF21-Fc kiểu dại chứa các gốc axit amin 1-181 có hoạt tính làm

giảm glucoza được duy trì, dẫn đến sự giảm lượng glucoza trong máu khoảng 30% trong khoảng thời gian từ 24 giờ đến 120 giờ sau khi tiêm. Protein Fc-FGF21 dạng cắt cụt chứa các gốc axit amin 1-171 thể hiện hoạt tính làm giảm glucoza trong máu chậm, chỉ rõ ràng tại thời điểm 72 giờ sau khi tiêm. Tuy nhiên, hoạt tính quan sát được là giống như hoạt tính của FGF21-Fc kiểu dại. Protein dung hợp FGF21-Fc dạng cắt cụt chứa các gốc 1-175 không có hoạt tính *in vivo* trong việc làm giảm glucoza trong máu.

Nói chung, các thử nghiệm cắt cụt được mô tả ở đây chứng tỏ rằng các protein dung hợp FGF21 dạng cắt cụt có cải biến cắt cụt đầu N thể hiện hoạt tính làm giảm glucoza trong máu tương tự với hoạt tính này của protein dung hợp FGF21 kiểu dại, và ngoài ra, các protein dung hợp FGF21 dạng cắt cụt trong đó phân tử Fc được dung hợp vào đầu N của protein FGF21 dạng cắt cụt thể hiện hoạt tính cao hơn so với các protein dung hợp trong đó phân tử Fc được dung hợp vào đầu C của protein FGF21 dạng cắt cụt.

Ví dụ 8

Sự phân hủy *in vivo* quan sát được của FGF21

Sự phân hủy FGF21 được quan sát thấy trước tiên với các cấu trúc protein dung hợp FGF21 Fc như được mô tả trong ví dụ 7. Phân tích dược động học *in vivo* cho thấy rằng FGF21 của người có thời gian bán hủy ngắn khoảng 1 giờ ở chuột nhắt do sự phân hủy *in vivo* và sự thanh thải nhanh. Do đó, để kéo dài thời gian bán hủy của FGF21, trình tự Fc được dung hợp vào đầu N hoặc đầu C của polypeptit FGF21. Tuy nhiên, việc dung hợp vùng Fc không giải quyết được hoàn toàn vấn đề về thời gian bán hủy vì các protein dung hợp trong đó trình tự Fc được dung hợp vào đầu N hoặc C của polypeptit FGF21 (và cụ thể là thể dung hợp Fc-FGF21, tức là trong đó trình tự Fc được dung hợp vào đầu N của FGF21 trưởng thành) không thể hiện hiệu quả *in vivo* mong đợi, và thay vào đó, được phát hiện thấy là chỉ duy trì hoạt tính làm giảm glucoza trong máu trong khoảng thời gian không dài hơn 24 giờ ở chuột nhắt ob/ob. Như được mô tả trên Fig.4, các protein dung hợp Fc-FGF21 làm giảm lượng glucoza trong máu khoảng 30-40% tại thời điểm 6 giờ sau khi tiêm, tuy nhiên lượng glucoza trong máu trở về lượng ban đầu tại thời điểm 24 giờ.

Sự phân hủy phân giải protein FGF21 kiểu dại sau đó được nghiên cứu, và sự mất hoạt tính *in vivo* nhanh với các protein dung hợp Fc-FGF21 được phát hiện thấy là do sự phân hủy

in vivo của FGF21. Sự phân hủy phân giải protein làm giảm hoạt tính sinh học của phân tử *in vivo* và do đó thời gian bán hủy hiệu dụng ngắn hơn, và sự phân hủy này ảnh hưởng bất lợi đến ứng dụng trị liệu của phân tử đó. Do đó, sự phân hủy quan sát được của các protein dung hợp FGF21 Fc dẫn đến việc nghiên cứu sự phân hủy phân giải protein FGF21 *in vivo* và xác định các FGF21 đột biến có khả năng kháng lại sự phân hủy này.

Để xác định các vị trí phân hủy, phân tích LC-MS và xác định trình tự Edman được thực hiện trên FGF21 kiểu dại của người và các protein dung hợp FGF21 Fc thu được tại các thời điểm khác nhau sau khi tiêm vào chuột nhắt C57B6 đực. Việc xác định trình tự Edman giúp xác nhận xem liệu đầu N hoặc đầu C của protein có trải qua sự phân hủy hay không. Khi trình tự Fc được dung hợp vào đầu N của FGF21 của người, sự phân hủy được phát hiện thấy là xảy ra ở liên kết peptit giữa các gốc axit amin 151 và 152 và giữa các gốc axit amin 171 và 172 của phần FGF21 của người của phân tử dung hợp (việc đánh số gốc trên đây là dựa trên trình tự FGF21 trưởng thành và không bao gồm phần Fc của protein dung hợp). Sự phân hủy ở 171-172 được phát hiện thấy là xảy ra trước tiên, và sau đó là sự phân hủy ở 151-152. Sự phân hủy ở 171-172 có vẻ là bước giới hạn tốc độ và đóng vai trò trong thời gian bán hủy của phân tử. Khi trình tự Fc được dung hợp vào đầu C của FGF21, sự phân hủy được phát hiện thấy là xảy ra ở liên kết peptit giữa các gốc axit amin 4 và 5 và giữa các gốc axit amin 20 và 21. Theo đó, trong thử nghiệm này, xác định được rằng trình tự Fc có vẻ bảo vệ phần trình tự FGF21 mà liền kề với trình tự Fc khỏi bị phân hủy. Phân tích về sự phân hủy *in vivo* của FGF21 kiểu dại và các protein dung hợp Fc-FGF21 cũng được tiến hành ở khỉ cynomolgus. Các nghiên cứu này khẳng định rằng vị trí phân cắt của FGF21 ở các gốc axit amin 171-172 là vị trí phân hủy chính ở khỉ và vị trí phân hủy này được bảo toàn giữa chuột và linh trưởng.

Ví dụ 9

Xác định FGF21 đột biến kháng phân giải protein

Các FGF21 đột biến thích hợp được xác định bằng cách xác định thực nghiệm các vị trí của trình tự FGF21 kiểu dại mà là các vị trí hoạt tính phân giải protein chính, và các cải biến thế axit amin cụ thể được đưa vào các vị trí này. Các cải biến thế axit amin được dựa trên mức độ bảo toàn trình tự FGF21 với các loài khác (như được mô tả trong ví dụ 8) và mức độ bảo toàn sinh hóa với các gốc axit amin khác. Danh sách các cải biến thế axit amin được đưa

vào hoặc có thể được đưa vào protein FGF21 kiểu dại được trình bày trong bảng 8, mặc dù bảng 8 chỉ là ví dụ và các cải biến thế khác cũng có thể được tạo ra. Số của các vị trí được nêu trong bảng 8 tương ứng với vị trí gốc trong protein FGF21 trưởng thành, mà bao gồm 181 gốc axit amin.

Bảng 8

Các gốc FGF21 được gây đột biến

Vị trí axit amin	Gốc nguyên gốc	Đột biến
19	Arg	Gln, Ile, Lys
20	Tyr	His, Leu, Phe
21	Leu	Ile, Phe, Tyr, Val
22	Tyr	Ile, Phe, Val
150	Pro	Ala, Arg
151	Gly	Ala, Val
152	Ile	His, Leu, Phe, Val
170	Gly	Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Pro, Ser
171	Pro	Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Lys, Ser, Thr, Trp, Tyr
172	Ser	Leu, Thr
173	Gln	Arg, Glu

Ví dụ 10

Phân tích sự phân hủy của Fc-FGF21 và FGF21-Fc *in vivo*

Độ ổn định của các protein dung hợp FGF21 Fc *in vivo* được xác định bằng cách tiêm chuột nhắt bằng protein dung hợp, lấy máu từ chuột nhắt tại các thời điểm khác nhau, và phân tích huyết thanh bằng kỹ thuật sắc ký lỏng - khối phổ (LC-MS). Cụ thể, chuột nhắt được tiêm trong màng bụng 10 mg/kg Fc-(G5)-FGF21 (SEQ ID NO:107) (được biểu hiện ở *E. coli* và được tinh chế như được mô tả trong ví dụ 2) hoặc FGF21-(G3)-Fc (SEQ ID NO:105) (được biểu hiện ở tế bào động vật có vú và được tinh chế theo các phương pháp tiêu chuẩn). Máu được lấy từ chuột nhắt tại thời điểm 6, 24 và 48 giờ sau khi tiêm (bảng 9) và được thu gom vào các ống EDTA đã được xử lý trước bằng hỗn hợp chất ức chế proteaza (Roche Diagnostics). Huyết tương được tách bằng cách ly tâm mẫu ở 12.000x*g* trong 10 phút. Các

protein FGF21 được tinh chế dựa vào ái lực ra khỏi máu bằng cách sử dụng nhựa agaroza kháng Fc của người.

Bảng 9

Các mẫu FGF21

Mẫu	Protein được dùng	Lấy máu
D6	Fc-(G5)-FGF21	6 giờ
D24	Fc-(G5)-FGF21	24 giờ
D48	Fc-(G5)-FGF21	48 giờ
E6	FGF21-(G3)-Fc	6 giờ
E24	FGF21-(G3)-Fc	24 giờ
E48	FGF21-(G3)-Fc	48 giờ

Trước khi phân tích các mẫu đã được tinh chế dựa vào ái lực bằng LC-MS, các protein chuẩn Fc-(G5)-FGF21 và FGF21-(G3)-Fc được phân tích làm tham chiếu. Các protein chuẩn được khử bằng tris[2-carboxyetyl] phosphin (TCEP) hoặc không được khử. Các chất chuẩn đã được khử và không được khử được phân tích bằng LC-MS bằng cách sử dụng cột ACE cyano 0,3 mm x 30 cm với dòng chảy ra khỏi cột được phun vào thiết bị đo khối phổ bẫy ion LCQ Classic. Vì phổ được giải chập của các mẫu được khử sạch hơn, nên các mẫu được tinh chế dựa vào ái lực được khử trước khi phân tích LC-MS.

Các khối lượng quan sát được đối với chất chuẩn Fc-(G5)-FGF21 đã được khử và các mẫu D6, D24 và D48 được thể hiện trên các Fig.6A-6D. Các khối lượng quan sát được đối với chất chuẩn FGF21-(G3)-Fc đã được khử và các mẫu E6, E24 và E48 được thể hiện trên các Fig.7A-7D. Một số dịch rửa giải của các chất chuẩn và mẫu được xác định trình tự Edman để xác nhận đầu N của các protein và các mảnh như được xác định bằng LC-MS. Kết quả phân tích LC-MS của các chất chuẩn và mẫu được trình bày trong bảng 10.

Bảng 10

Kết quả phân tích LC-MS và các mảnh được dự đoán

Mẫu FGF21	Khối lượng quan sát được chủ yếu	Mảnh	Đầu N nguyên vẹn?
Chuẩn Fc-(G5)-FGF21	45.339 Da	1-414	Có

Mẫu FGF21	Khối lượng quan sát được chủ yếu	Mảnh	Đầu N nguyên vẹn?
D6	45.338 Da 44.317 Da	1-414 1-404	Có
D24	44.321 Da	1-404	Có
D48	44.327 Da 42.356 Da	1-404 ?	Có
Chuẩn FGF21-(G3)-Fc	46.408 Da (được glycosyl hóa, G0F) 44.964 Da (không được glycosyl hóa)	1-410 1-410	Có
E6	45.963 Da (được glycosyl hóa, G0F) 44.516 Da (không được glycosyl hóa)	5-410 5-410	Không
E24	45.963 Da (được glycosyl hóa, G0F) 44.526 Da (không được glycosyl hóa) 44.130 Da (được glycosyl hóa, G0F)	5-410 5-410 21-410	Không
E48	45.984 Da 44.130 Da 44.022 Da	5-410? 21-410 ?	Không

Như được chỉ ra trong bảng 10, tất cả các mẫu được tinh chế dựa vào ái lực đều thể hiện mức độ phân hủy nhất định chỉ sau 6 giờ tuần hoàn. Sau 24 giờ tuần hoàn, sản phẩm chính của Fc-(G5)-FGF21 là mảnh gồm các gốc axit amin 1-404, mà được thấy trong cả hai mẫu D và E. Tuy nhiên, trong mẫu E, sản phẩm chính của FGF21-(G3)-Fc là mảnh gồm các gốc axit amin 5-410. Đối với cả hai protein dung hợp được thử nghiệm, phần FGF21 của protein dung hợp mẫn cảm đối với sự phân hủy hơn so với phần Fc của protein.

Ví dụ 11

Tạo và biểu hiện FGF21 đột biến và protein dung hợp kháng phân giải protein

Các cấu trúc mã hóa FGF21 đột biến được liệt kê trong bảng 11 được tạo ra bằng cách khuếch đại PCR vectơ biểu hiện FGF21 kiểu dại như được nêu dưới đây (việc tạo cấu trúc vectơ biểu hiện FGF21 kiểu dại được mô tả trong ví dụ 1). Khi nhóm liên kết được chứa trong cấu trúc này, thì nhóm liên kết được sử dụng là GGGGGSGGGSGGGGS ("L15", SEQ ID NO:28). Mục đích của các thử nghiệm này là nhằm tạo ra các FGF21 đột biến có khả năng kháng lại sự phân giải protein và thể hiện thời gian bán hủy dài hơn.

Bảng 11

Các FGF21 đột biến kháng phân giải protein

Đột biến	Fc	Nhóm liên kết
R19I		
R19I	-COOH	L15
R19K		
R19K	-COOH	L15
R19Q		
R19Q	-COOH	L15
R19K, Y20H		
R19K, Y20H	-COOH	L15
R19K, L21I		
R19K, L21I	-COOH	L15
R19K, Y20H, L21I		
R19K, Y20H, L21I	-COOH	L15
Y20F		
Y20F	-COOH	L15
Y20H		
Y20H	-COOH	L15
Y20L		
Y20L	-COOH	L15
Y20H, L21I		
Y20H, L21I	-COOH	L15
L21I		
L21I	-COOH	L15
L21F		
L21F	-COOH	L15
L21V		
L21V	-COOH	L15
L21Y		
L21Y	-COOH	L15
Y22F		
Y22F	-COOH	L15
Y22I		
Y22I	-COOH	L15
Y22V		
Y22V	-COOH	L15
P150A		
P150A	$-NH_2$	L15
P150R	$-NH_2$	L15
P150A, G151A		
P150A, G151A	$-NH_2$	L15

Đột biến	Fc	Nhóm liên kết
P150A, I152V		
P150A, I152V	-NH_2	L15
P150A, G151A, I152V		
P150A, G151A, I152V	-NH_2	L15
G151A		
G151A	-NH_2	L15
G151V		
G151V	-NH_2	L15
G151A, I152V		
G151A, I152V	-NH_2	L15
I152F		
I152F	-NH_2	L15
I152H		
I152H	-NH_2	L15
I152L		
I152L	-NH_2	L15
I152V		
G170A		
G170A	-NH_2	L15
G170C		
G170C	-NH_2	L15
G170D		
G170D	-NH_2	L15
G170E		
G170E	-NH_2	L15
G170N		
G170N	-NH_2	L15
G170P		
G170P	-NH_2	L15
G170Q		
G170Q	-NH_2	L15
G170S		
G170S	-NH_2	L15
G170E, P171A		
G170E, P171A	-NH_2	L15
G170E, S172L		
G170E, S172L	-NH_2	L15
G170E, P171A, S172L		
G170E, P171A, S172L	-NH_2	L15
P171A		
P171A	-NH_2	L15
P171C	-NH_2	L15

Đột biến	Fc	Nhóm liên kết
P171D	-NH_2	L15
P171E	-NH_2	L15
P171G	-NH_2	L15
P171H	-NH_2	L15
P171K	-NH_2	L15
P171N	-NH_2	L15
P171Q	-NH_2	L15
P171S	-NH_2	L15
P171T	-NH_2	L15
P171W	-NH_2	L15
P171Y	-NH_2	L15
P171A, S172L		
P171A, S172L	-NH_2	L15
S172L	-NH_2	L15
S172T		
S172T	-NH_2	L15
Q173E		
Q173E	-NH_2	L15
Q173R		
Q173R	-NH_2	L15

Các cấu trúc FGF21 đột biến được tạo ra bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự tương đồng với các vùng ở phía trên và phía dưới của codon (hoặc các codon) cần được gây đột biến. Các đoạn mồi được sử dụng trong các phản ứng khuếch đại như vậy cũng tạo ra khoảng 15 nucleotit có trình tự gối chồng để cho phép tái tuần hoàn sản phẩm khuếch đại, tức là toàn bộ vectơ mà hiện đã có thể đột biến mong muốn.

Cấu trúc FGF21 đột biến làm ví dụ, mà mã hóa FGF21 đột biến có gốc axit glutamic ở vị trí 170 thay cho gốc glyxin nguyên gốc (tức là, thể đột biến G170E), được tạo ra bằng cách sử dụng các đoạn mồi được thể hiện trong bảng 12.

Bảng 12

Các đoạn mồi PCR dùng để tạo FGF21 đột biến làm ví dụ

Đoạn mồi	Trình tự	SEQ ID NO:
Có nghĩa	5'-ATGGTGGAACCTTCCCAGGGCCGAAGC-3'	23
Đối nghĩa	5'-GGAAGGTTCCACCATGCTCAGAGGGTCCGA-3'	24

Các đoạn mồi được thể hiện trong bảng 12 cho phép thế gốc glyxin bằng gốc axit glutamic như được thể hiện dưới đây, trong đó trình tự trên cùng là đoạn mồi có nghĩa (SEQ ID NO:23), các trình tự thứ hai và thứ ba (các SEQ ID NO:25 và 27) là các phần của cấu trúc biểu hiện FGF21, và trình tự thứ tư là đoạn mồi đối nghĩa (SEQ ID NO:26):

5'-ATGGTGG**A**ACCTTCCCAGGGCCGAAGC

CTCCTCGGACCCTCTGAGCATGGTG**GGA**CCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCA

GAGGAGCCTGGGAGACTCGTACCAC**CCT**GGAAGGGTCCCGGCTTCGGGGT

AGCCTGGGAGACTCGTACCACC**T**TGGAAGG-5'

Các cấu trúc FGF21 đột biến được tạo ra bằng cách sử dụng về cơ bản là các điều kiện PCR được mô tả trong ví dụ 1. Sản phẩm khuếch đại được phân giải bằng endonucleaza giới hạn DpnI, và sau đó được biến nạp vào tế bào có đủ khả năng. Các dòng thu được được xác định trình tự để khẳng định không có lỗi do polymeaza gây ra. Các protein dung hợp Fc-(L15)-FGF21 và FGF21-(L15)-Fc được tạo ra như được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ, trong ví dụ 6.

Các FGF21 đột biến được biểu hiện bằng cách biến nạp các tế bào BL21 (DE3) hoặc BL21 Star có đủ khả năng (Invitrogen; Carlsbad, CA) có cấu trúc mã hóa thể đột biến cụ thể. Các thể biến nạp được cho sinh trưởng qua đêm trong điều kiện sục khí hạn chế trong môi trường TB được bổ sung 40 µg/mL kanamyxin, được sục khí vào sáng hôm sau, và sau khoảng thời gian phục hồi ngắn, được gây cảm ứng trong IPTG 0,4 mM. Các polypeptit FGF21 đột biến được thu gom bằng cách ly tâm 18-20 giờ sau khi cảm ứng.

Các FGF21 đột biến cũng được phân tích về khả năng gây miễn dịch được dự đoán. Các đáp ứng miễn dịch đối với các protein được tăng cường bằng cách xử lý và trình diện kháng nguyên ở vị trí liên kết phức hợp tương thích mô chính (MHC: major histocompatability complex) nhóm II. Sự tương tác này là cần thiết cho sự trợ giúp của tế bào T trong sự trưởng thành của các kháng thể nhận biết protein. Vì vị trí liên kết của các phân tử MHC nhóm II đã được xác định đặc điểm, nên có thể dự đoán được liệu các protein có trình tự đặc hiệu mà có thể liên kết với một loạt các alen phổ biến ở người hay không. Các thuật toán máy tính được tạo ra dựa trên các tài liệu kỹ thuật và cấu trúc tinh thể MHC nhóm II để xác định xem liệu

trình tự peptit axit amin mạch thẳng có khả năng phá vỡ sự dung nạp miễn dịch hay không. Chương trình máy tính TEPITOPE được dùng để xác định xem liệu đột biến điểm trong FGF21 đột biến cụ thể có làm tăng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên ở phần lớn số người hay không. Dựa trên phân tích về trình tự protein mạch thẳng của mỗi FGF21 đột biến, không có thể đột biến nào được dự đoán là làm tăng khả năng gây miễn dịch.

Ví dụ 12

Ảnh hưởng của trình tự liên kết đối với sự phân hủy FGF21

Để xác định xem liệu sự có mặt của nhóm liên kết axit amin dài hơn giữa trình tự Fc và trình tự FGF21 có ảnh hưởng đến sự phân hủy FGF21 hay không, chuột nhắt được tiêm các protein dung hợp FGF21 trong đó vùng Fc được tách khỏi trình tự FGF21 bằng nhóm liên kết gồm 15 axit amin có trình tự GGGGGSGGGSGGGGS (ký hiệu là "L15", SEQ ID NO:28), máu được lấy từ chuột nhắt tại các thời điểm khác nhau, và huyết thanh được phân tích bằng LC-MS. Cụ thể, chuột nhắt được tiêm Fc-(L15)-FGF21 hoặc FGF21-(L15)-Fc (thu được từ *E. coli*) với liều là 23 mg/kg, máu được lấy ở 6, 24 và 48 giờ, và máu đã được lấy ra được tinh chế dựa vào ái lực bằng cách sử dụng nhựa agaroza kháng Fc của người.

Trước khi phân tích các mẫu đã được tinh chế bằng LC-MS, các protein chuẩn Fc-(L15)-FGF21 và FGF21-(L15)-Fc được phân tích làm tham chiếu. Các protein chuẩn được khử bằng TCEP hoặc không được khử. Cả chất chuẩn đã được khử và không được khử đều được phân tích bằng LC-MS bằng cách sử dụng cột ACE cyano 0,3 mm x 30 cm với dòng chảy ra khỏi cột được phun vào thiết bị đo khối phổ bẫy ion LCQ Classic. Vì phổ được giải chập của các mẫu được khử sạch hơn, nên các mẫu được tinh chế dựa vào ái lực được khử trước khi phân tích LC-MS.

Các khối lượng quan sát được đối với chất chuẩn Fc-(L15)-FGF21 đã được khử và các mẫu đã được tinh chế dựa vào ái lực tương ứng được lấy tại các thời điểm khác nhau được thể hiện trên các Fig.8A-8D. Các khối lượng quan sát được đối với chất chuẩn FGF21-(L15)-Fc đã được khử và các mẫu đã được tinh chế dựa vào ái lực tương ứng được lấy tại các thời điểm khác nhau được thể hiện trên các Fig.9A-9D. Một số dịch rửa giải của các chất chuẩn và mẫu được xác định trình tự Edman để xác nhận đầu N của các protein và hỗ trợ việc dự đoán độ

đồng nhất của các mảnh quan sát được bằng LC-MS. Kết quả phân tích LC-MS của các chất chuẩn và mẫu và và dấu hiệu của các mảnh được dự đoán được trình bày trong bảng 13.

Bảng 13

Kết quả phân tích LC-MS và các mảnh được dự đoán

Mẫu FGF21	Khối lượng quan sát được chủ yếu	% của tổng	Mảnh	Đầu N nguyên vẹn?
Chuẩn Fc-(L15)-FGF21	46.002 Da	100%	1-424	Có
Fc-(L15)-FGF21 6 giờ	46.000 Da 44.978 Da	65% 35%	1-424 1-414	Có
Fc-(L15)-FGF21 24 giờ	44.978 Da 43.022 Da	85% 15%	1-414 1-394	Có
Fc-(L15)-FGF21 48 giờ	44.976 Da 43.019 Da	60% 40%	1-414 1-394	Có
Chuẩn FGF21-(L15)-Fc	45.999 Da	100%	1-424	Có
FGF21-(L15)-Fc 6 giờ	45.870 Da	100%	1-423	Có
FGF21-(L15)-Fc 24 giờ	45.869 Da 45.301 Da 43.460 Da	40% 35% 25%	1-423 6-423 22-423	Đôi chút
FGF21-(L15)-Fc 48 giờ	45.870 Da 45.297 Da 43.461 Da	15% 20% 65%	1-423 6-423 22-423	Đôi chút

Như được chỉ ra trong bảng 13, tất cả các mẫu được tinh chế dựa vào ái lực đều thể hiện mức độ phân hủy nhất định chỉ sau 6 giờ tuần hoàn. Sau 24 giờ tuần hoàn, các sản phẩm chính của Fc-(L15)-FGF21 là các mảnh gồm các gốc axit amin 1-414 (85% của mẫu) và 1-394 (15% của mẫu), và các sản phẩm chính của FGF21(15)Fc là các mảnh gồm các gốc axit amin 1-423 (40% của mẫu), 6-423 (35% của mẫu) và 22-423 (25% của mẫu). Các điểm phân cắt được xác định đối với các protein Fc-(L15)-FGF21 và FGF21-(L15)-Fc được thể hiện trên các Fig.10A và 10B, một cách tương ứng.

Ví dụ 13

Hoạt tính *in vivo* của Fc-(L15)-FGF21 đột biến kháng phân giải protein tại thời điểm 1-7 ngày sau khi tiêm

Như được nêu trong bản mô tả này, sự phân cắt phân giải protein của các protein dung hợp FGF21 Fc phụ thuộc vào chiều hướng của trình tự Fc, trong đó đầu Fc của protein dung hợp ổn định hơn so với đầu FGF21 của protein dung hợp (tức là, phần đầu N của các protein dung hợp Fc-(L15)-FGF21 và phần đầu C của các protein dung hợp FGF21-(L15)-Fc được phát hiện thấy là ổn định hơn). Ví dụ, sự phân cắt được xác định ở các vị trí 5 và 21 của FGF21-(L15)Fc và các vị trí 151 và 171 của Fc-(L15)-FGF21.

Dựa trên các quan sát này, việc nghiên cứu được tiến hành để xác định FGF21 đột biến kháng phân giải protein. Phân tích LC-MS của Fc-(L15)-FGF21 chứng tỏ rằng sự phân hủy phân giải protein *in vivo* trước tiên xảy ra giữa các gốc axit amin 171-172, sau đó là sự phân hủy giữa các gốc axit amin 151-152. Bằng cách phong bế sự phân hủy phân giải protein ở vị trí 171, sự phân cắt ở vị trí 151 có thể được ngăn ngừa, kéo dài một cách hiệu quả thời gian bán hủy của phân tử. Tuy nhiên, các thể đột biến kháng phân giải protein trong đó sự phân cắt được ngăn ngừa ở vị trí 151 có thể vẫn mang gốc ở vị trí 171 mà mẫn cảm với sự tấn công của proteaza, nhờ đó dẫn đến phân tử bị mất 10 axit amin cuối cùng, mà đã biết là có liên quan đến sự liên kết của đồng thụ thể β-Klotho, là yếu tố quyết định của ái lực của phối tử thụ thể và hiệu lực *in vitro* và *in vivo*. Do đó, việc gây đột biến các gốc axit amin xung quanh vị trí 171 trong FGF21 trưởng thành có vẻ là quan trọng hơn để cải thiện độ ổn định, hiệu lực và hiệu quả *in vivo* của phân tử.

Hoạt tính *in vivo* của Fc-(L15)-FGF21 đột biến kháng phân giải protein cụ thể được thử nghiệm bằng cách tiêm trong màng bụng chuột nhắt ob/ob bằng FGF21 đột biến, lấy mẫu máu từ chuột nhắt được tiêm tại các thời điểm là 0, 0,25, 1, 3, 5 và 7 ngày sau khi tiêm, và sau đó đo lượng glucoza trong máu trong mẫu. Các kết quả của một thử nghiệm được trình bày trên Fig.11, mà thể hiện lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm đối chứng PBS, đối chứng Fc-(L15)-FGF21 (SEQ ID NO:49), hoặc các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 G170E (SEQ ID NO:51), Fc-(L15)-FGF21 P171A (SEQ ID NO:53), Fc-(L15)-FGF21 S172L (SEQ ID NO:55), Fc-(L15)-FGF21 (G170E, P171A, S172L) (SEQ ID NO:59) hoặc Fc-(L15)-FGF21 G151A (SEQ ID NO:61). Fig.12 thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu được xác định trong thử nghiệm này. Thử nghiệm này chứng tỏ rằng các thể đột biến Fc-(L15)-FGF21 G170E, Fc-(L15)-FGF21 P171A, Fc-(L15)-FGF21 S172L và Fc-(L15)-FGF21 (G170E, P171A, S172L) thể hiện hoạt tính làm giảm glucoza trong máu được duy trì

trong lên đến 5 ngày, cao hơn so với hoạt tính của Fc-(L15)-FGF21 kiểu dại. Thể đột biến Fc-(L15)-FGF21 G151A chỉ cải thiện một phần khoảng thời gian của hoạt tính làm giảm glucoza trong máu so với protein dung hợp Fc-(L15)-FGF21 kiểu dại. Bất ngờ là, mặc dù thể đột biến Fc-(L15)-FGF21 S172L không phải là thể đột biến kháng phân giải protein, và do đó có profin phân hủy tương tự như polypeptit Fc-(L15)-FGF21 kiểu dại, nhưng thể đột biến này được phát hiện thấy là thể hiện hiệu quả *in vivo* được cải thiện so với polypeptit Fc-(L15)-FGF21 kiểu dại.

Các kết quả của thử nghiệm khác được trình bày trên Fig.13, mà thể hiện lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm đối chứng PBS, đối chứng Fc-(L15)-FGF21, hoặc các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 (P150A, G151A, I152V) (SEQ ID NO:65), Fc-(L15)-FGF21 G170E (SEQ ID NO:51), Fc-(L15)-FGF21 (G170E, P171A) (SEQ ID NO:63) hoặc Fc-(L15)-FGF21 (G170E, S172L) (SEQ ID NO:67). Fig.14 thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu được xác định trong thử nghiệm này. Như trong thử nghiệm được mô tả trên đây, protein dung hợp Fc-FGF21 kiểu dại và thể đột biến Fc-(L15)-FGF21 (P150A, G151A, I152V) không thể hiện hoạt tính làm giảm glucoza trong máu được duy trì, có thể là do sự phân hủy ở vị trí 171 có thể vẫn xảy ra, và lượng glucoza trong máu ở động vật được tiêm các protein này trở về mức ban đầu tại thời điểm 24 giờ sau khi tiêm. Tuy nhiên, Fc-(L15)-FGF21 G170E, Fc-(L15)-FGF21 (G170E, P171A) hoặc Fc-(L15)-FGF21 (G170E, S172L) thể hiện hoạt tính làm giảm glucoza trong máu lớn nhất lên đến 5 ngày sau khi tiêm, cao hơn so với protein dung hợp Fc-(L15)-FGF21 kiểu dại và thể đột biến Fc-(L15)-FGF21 (P150A, G151A, I152V).

Các kết quả của thử nghiệm khác được trình bày trên Fig.15, mà thể hiện lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm đối chứng PBS hoặc các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 G170E (SEQ ID NO:51), Fc-(L15)-FGF21 G170A (SEQ ID NO:69), Fc-(L15)-FGF21 G170C (SEQ ID NO:71), Fc-(L15)-FGF21 G170D (SEQ ID NO:73), Fc-(L15)-FGF21 G170N (SEQ ID NO:75) hoặc Fc-(L15)-FGF21 G170S (SEQ ID NO:77). Fig.16 thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu được xác định trong thử nghiệm này. Tất cả các FGF21 đột biến được thử nghiệm trong thử nghiệm này đều thể hiện hoạt tính làm giảm glucoza trong máu được duy trì trong lên đến 5 ngày sau khi tiêm.

Các kết quả của thử nghiệm khác được trình bày trên Fig.17, mà thể hiện lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm PBS hoặc các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 G170E (SEQ ID NO:51), Fc-(L15)-FGF21 P171E (SEQ ID NO:79), Fc-(L15)-FGF21 P171H (SEQ ID NO:81), Fc-(L15)-FGF21 P171Q (SEQ ID NO:83), Fc-(L15)-FGF21 P171T (SEQ ID NO:85) hoặc Fc-(L15)-FGF21 P171Y (SEQ ID NO:87). Fig.18 thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu được xác định trong thử nghiệm này. Tất cả các FGF21 đột biến được thử nghiệm trong thử nghiệm này đều thể hiện hoạt tính làm giảm glucoza trong máu được cải thiện so với Fc-FGF21 kiểu dại.

Ví dụ 14

Sự phân hủy *in vivo* của Fc-(L15)-FGF21 đột biến kháng phân giải protein tại thời điểm 6-120 giờ sau khi tiêm

Độ ổn định *in vivo* của các FGF21 đột biến được chọn được phân tích bằng cách tiêm chuột nhắt bằng FGF21 đột biến, lấy máu từ chuột nhắt tại các thời điểm khác nhau, và phân tích huyết thanh bằng LC-MS. Cụ thể, chuột nhắt được tiêm thể đột biến Fc-(L15)-FGF21 G170E, Fc-(L15)-FGF21 P171A hoặc Fc-(L15)-FGF21 S172L (thu nhận từ *E. coli* như được mô tả trong ví dụ 2), mỗi thể đột biến này được pha loãng trong khoảng 180 µL HCl 10 mM trước khi tiêm, và máu được lấy tại các thời điểm là 6, 24, 48, 72 và 120 giờ. Các protein FGF21 được tinh chế dựa vào ái lực ra khỏi máu được lấy ra bằng cách sử dụng cột nhựa agaroza kháng Fc của người. Các mẫu được rửa giải ra khỏi cột bằng cách sử dụng HCl 10 mM. Tất cả các cấu trúc FGF21 đều chứa vùng Fc và nhóm liên kết gồm 15 axit amin ở đầu amino của protein FGF21. Chuột nhắt cũng được tiêm đối chứng FGF21 kiểu dại.

Trước khi phân tích các mẫu đã được tinh chế dựa vào ái lực bằng LC-MS, FGF21 kiểu dại không được xử lý và các FGF21 đột biến không được xử lý được phân tích làm tham chiếu. Tất cả các chất chuẩn và các mẫu theo thời điểm được khử bằng TCEP, và sau đó được phân tích bằng LC-MS bằng cách sử dụng cột ACE cyano 0,3 mm x 30 cm với dòng chảy ra khỏi cột được phun vào thiết bị đo khối phổ bẫy ion LCQ Classic. Các mẫu đã được tinh chế dựa vào ái lực được pha loãng bằng amoni axetat, được khử bằng TCEP, và sau đó được phân tích bằng LC-MS như được mô tả ở trên.

Các khối lượng quan sát được đối với Fc-(L15)-FGF21 kiểu dại tại các thời điểm là 0, 6, 24 và 48 giờ sau khi tiêm được thể hiện trên các Fig.19A-19D một cách tương ứng. Các khối lượng quan sát được đối với Fc-(L15)-FGF21 G170E tại các thời điểm là 0, 6, 24 và 48 giờ sau khi tiêm được thể hiện trên các Fig.20A-20D một cách tương ứng. Các khối lượng quan sát được đối với Fc-(L15)-FGF21 P171A tại các thời điểm là 0, 6, 24 và 48 giờ sau khi tiêm được thể hiện trên các Fig.21A-21D một cách tương ứng. Các khối lượng quan sát được đối với Fc-(L15)-FGF21 S172L tại các thời điểm là 0, 6, 24 và 48 giờ sau khi tiêm được thể hiện trên các Fig.22A-22D một cách tương ứng.

Tất cả các mẫu được lấy tại các thời điểm 72 và 120 giờ được phát hiện thấy là chứa thành phần có phân tử lượng cao (>200 kDa, bằng SDS-PAGE không khử) của fibrinogen, nhiều hơn nhiều so với protein dung hợp Fc-(L15)-FGF21 còn lại. Kết quả phân tích LC-MS của các chất chuẩn và mẫu còn lại được trình bày trong bảng 14.

Bảng 14

Kết quả phân tích LC-MS và các mảnh được dự đoán

Mẫu FGF21	Khối lượng quan sát được chủ yếu	% của tổng	Mảnh	Edman
Chuẩn Fc-(L15)-FGF21 WT	45.994 Da	100%	1-424	–
Fc-(L15)-FGF21 WT 6 giờ	46.001 Da 44.987 Da	80% 20%	1-424 1-414	Không
Fc-(L15)-FGF21 WT 24 giờ	44.979 Da	~100%	1-414	Không
Fc-(L15)-FGF21 WT 48 giờ	44.980 Da	~100%	1-414	–
Fc-(L15)-FGF21 G170E Chuẩn	46.068 Da	100%	1-424	–
Fc-(L15)-FGF21 G170E 6 giờ	46.078 Da	100%	1-424	Không
Fc-(L15)-FGF21 G170E 24 giờ	46.074 Da 45.761 Da	80% 20%	1-424 1-421	Không
Fc-(L15)-FGF21 G170E 48 giờ	46.072 Da 45.760 Da	~60% ~40%	1-424 1-421	Không
Fc-(L15)-FGF21 P171A Chuẩn	45.970 Da	100%	1-424	–
Fc-(L15)-FGF21 P171A 6 giờ	45.980 Da	100%	1-424	Không

Mẫu FGF21	Khối lượng quan sát được chủ yếu	% của tổng	Mảnh	Edman
Fc-(L15)-FGF21 P171A 24 giờ	45.973 Da 45.657 Da	~70% ~30%	1-424 1-421	Không
Fc-(L15)-FGF21 P171A 48 giờ	45.992 Da 45.673 Da	~50% ~50%	1-424 1-421	Không
Chuẩn Fc-(L15)-FGF21 S172L	46.022 Da	100%	1-424	–
Fc-(L15)-FGF21 S172L 6 giờ	46.027 Da	100%	1-424	Không
Fc-(L15)-FGF21 S172L 24 giờ	44.984 Da	100%	1-414	Không
Fc-(L15)-FGF21 S172L 48 giờ	44.985 Da	100%	1-414	Không

Như được chỉ ra trong bảng 14, sự phân hủy của Fc-(L15)-FGF21 kiểu dại và thể đột biến S172L có vẻ tương tự nhau, ở chỗ là sau 24 giờ tuần hoàn, sản phẩm chính của protein dung hợp là mảnh gồm các gốc axit amin 1-414. Các sản phẩm phân hủy của thể đột biến Fc-(L15)-FGF21 G170E và Fc-(L15)-FGF21 P171A cũng có vẻ tương tự nhau, ở chỗ là các mẫu được lấy sau 24 giờ tuần hoàn chứa 70-80% protein nguyên vẹn (các axit amin 1-424) và 20-30% của mảnh gồm các gốc axit amin 1-421. Thậm chí là sau 48 giờ, thể đột biến Fc-(L15)-FGF21 G170E và Fc-(L15)-FGF21 P171A vẫn giữ lại được protein nguyên vẹn, trong khi thể hiện sự tăng lượng mảnh gồm các gốc axit amin 1-421. Như quan sát được trong các phân tích trước đây về các cấu trúc Fc-FGF21, sự phân hủy phần FGF21 của protein dung hợp được phát hiện và phần Fc được phát hiện thấy là vẫn ổn định. Các vị trí phân cắt được xác định đối với kiểu dại, Fc-(L15)-FGF21 G170E, Fc-(L15)-FGF21 P171A và Fc-(L15)-FGF21 S172L được thể hiện trên các Fig.23A-23D một cách tương ứng.

Ví dụ 15

Xác định FGF21 đột biến giảm kết tụ

Một tính chất của FGF21 kiểu dại là xu hướng kết tụ của nó. Đối với tính chất này, mong muốn là tạo ra FGF21 đột biến giảm kết tụ. FGF21 đột biến giảm kết tụ được xác định dựa trên hai giả thuyết. Giả thuyết thứ nhất là, đối với FGF21, sự kết tụ (hoặc dime hóa) được khởi động bằng các tương tác kỵ nước và các tương tác van der Waals giữa các phân tử FGF21

gây ra bởi các gốc kỵ nước mà tiếp xúc với môi trường dung môi gốc nước ưa nước. Giả thuyết thứ hai là các gốc kỵ nước tiếp xúc này có thể được thế để tạo ra đột biến điểm giảm kết tụ trong trình tự axit amin FGF21 mà không ảnh hưởng đến hoạt tính FGF21.

Phương pháp thiết kế protein hợp lý có hệ thống được sử dụng để xác định các gốc kỵ nước tiếp xúc ở FGF21. Vì chưa biết cấu trúc tia X hoặc NMR của FGF21 mà có thể được sử dụng để xác định gốc kỵ nước tiếp xúc, nên cấu trúc tinh thể tia X có độ phân giải cao (1,3 Å) của FGF19 (1PWA) thu được từ Ngân hàng dữ liệu protein (PDB: Protein Databank) được sử dụng để tạo ra mô hình độ tương đồng 3D của FGF21 bằng cách sử dụng phần mềm tạo mô hình MOE (Molecular Operating Environment; Chemical Computing Group; Montreal, Quebec, Canada). FGF19 được chọn làm khuôn, vì trong số các protein được nộp lưu trong PDB, FGF19 là protein có liên quan gần nhất với FGF21 xét theo độ tương đồng trình tự axit amin.

Khả năng tiếp cận dung môi được tính toán bằng phương pháp nêu dưới đây bằng cách sử dụng MOE. Giá trị đo diện tích bề mặt thứ nhất (SA1) được xác định dưới dạng diện tích bề mặt có thể tiếp cận của gốc theo $Å^2$. Mặc dù gốc axit amin cụ thể xuất hiện trong trình tự cơ bản của protein nhiều lần, nhưng mỗi lần xuất hiện của gốc này có thể có diện tích bề mặt khác nhau do các khác biệt về, không kể các khác biệt khác, trạng thái lân cận của gốc với bề mặt protein, chiều hướng của chuỗi bên của gốc và vị trí không gian của các gốc axit amin liền kề. Do đó, giá trị đo diện tích bề mặt thứ hai (SA2) được tiến hành trong đó gốc được quan tâm được tách chiết ra khỏi cấu trúc protein cùng với gốc ở xung quanh hoặc liền kề với gốc đó. Các gốc liền kề về mặt không gian này được gây đột biến *in silico* thành glyxin để loại bỏ chuỗi bên của chúng, và sau đó SA2 đối với gốc được quan tâm được tính toán, để đưa ra giá trị đo tổng diện tích bề mặt có thể có đối với gốc đó ở cấu dạng cụ thể của nó. Tỷ lệ của SA1 với SA2 (SA1/SA2) sau đó có thể đưa ra giá trị đo tỷ lệ phần trăm của diện tích bề mặt có thể có đối với gốc tiếp xúc thực sự.

Một số gốc kỵ nước tiếp xúc mức độ cao với dung môi được chọn để phân tích tiếp, và đột biến điểm *in silico* được tạo ra đối với các gốc này để thay thế gốc được chọn bằng gốc axit amin có trong tự nhiên khác. Sự thay đổi về độ ổn định nhiệt của protein do các cải biến thế khác nhau được tính toán bằng cách sử dụng mô hình FGF21 và chương trình dựa trên

web tương tác CUPSAT (Cologne College Protein Stability Analysis Tools) theo hướng dẫn sử dụng được cung cấp trên trang web CUPSAT. Xem tài liệu Parthiban et al., 2006, Nucleic Acids Res. 34: W239-42; Parthiban et al., 2007, BMC Struct. Biol. 7:54. Đột biến kỵ nước và gây mất ổn định đáng kể được loại bỏ trong thiết kế các thể đột biến FGF21 đột biến điểm giảm kết tụ. Cải biến thế làm ổn định (hoặc, trong một số rất ít trường hợp, gây mất ổn định đôi chút) mà mang lại đặc tính ion và/hoặc ưa nước cải thiện được coi là ứng cử viên cho FGF21 đột biến giảm kết tụ.

Tổng kết dữ liệu được tạo ra thông qua phương pháp thiết kế protein hợp lý này được trình bày trong bảng 15, mà cũng liệt kê các FGF21 đột biến làm ví dụ được mong đợi là có sự kết tụ protein giảm và độ ổn định cải thiện.

Bảng 15

Tác dụng tính toán được của các FGF21 đột biến đối với độ ổn định

Gốc #	Gốc WT	Đột biến	Độ ổn định (Kcal/mol)
26	A	K	1,25
		E	1,54
		R	2,016
45	A	T	0,66
		Q	0,71
		K	1,8
		E	2,34
		R	1,59
52	L	T	-0,33
58	L	G	0,16
		S	-0,15
		C	1,0
		E	0,08
60	P	A	1,3
		K	1,51
		E	0,66
		R	1,31

Gốc #	Gốc WT	Đột biến	Độ ổn định (Kcal/mol)
78	P	A	0,14
		C	2,48
		R	0,08
		H	0,13
86	L	T	0,18
		C	4,1
88	F	A	2,52
		S	3,08
		K	2,88
		E	1,48
98	L	T	0,49
		Q	0,17
		K	-0,19
		C	3,08
		E	0,84
		R	3,4
99	L	C	7,34
		E	2,0
		D	1,01
		R	1,61
111	A	T	0,47
		K	-0,12
129	A	Q	3,93
		K	1,02
		N	3,76
		E	3,01
		D	3,76
		R	1,68
		H	2,9
134	A	K	5,37
		Y	4,32
		E	5,13
		R	6,18
		H	2,86

Ví dụ 16

Tạo và biểu hiện FGF21 đột biến và protein dung hợp giảm kết tụ

Các cấu trúc mã hóa FGF21 đột biến được liệt kê trong bảng 16 được tạo ra bằng cách khuếch đại PCR vectơ biểu hiện FGF21 kiểu dại như được mô tả trong ví dụ 11 (việc tạo cấu

trúc vectơ biểu hiện FGF21 kiểu dại được mô tả trong ví dụ 1). Các protein dung hợp được tạo ra như được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ, trong ví dụ 6. Khi nhóm liên kết được sử dụng, thì nhóm liên kết này là GGGGGSGGGSGGGGS ("L15", SEQ ID NO:28).

Bảng 16

Các FGF21 đột biến giảm kết tụ

Đột biến	Fc	Nhóm liên kết
A26E		
A26K		
A26R		
A45E		
A45K		
A45K	$-NH_2$	L15
A45R	$-NH_2$	L15
A45Q	$-NH_2$	L15
A45T	$-NH_2$	L15
A45K, L98R	$-NH_2$	L15
L52T		
L58C		
L58E		
L58G		
L58S		
P60A		
P60E		
P60K		
P60R		
P78A		
P78C		
P78H		
P78R		
L86C		
L86T		
F88A		
F88E		
F88K		
F88R		
F88S		
L98C		
L98E	$-NH_2$	L15
L98K	$-NH_2$	L15
L98Q	$-NH_2$	L15

Đột biến	Fc	Nhóm liên kết
L98R		
L98R	-NH_2	L15
L99C		
L99D		
L99E		
L99R		
A111K	-NH_2	L15
A111T		
A129D		
A129E	-NH_2	L15
A129H	-NH_2	L15
A129K		
A129N	-NH_2	L15
A129R	-NH_2	L15
A129Q		
A134E		
A134H	-NH_2	L15
A134K		
A134Y		

Sự kết tụ của các protein FGF21 khác nhau, bao gồm FGF21 kiểu dại, các polypeptit FGF21 dạng cắt cụt, các FGF21 đột biến và các protein dung hợp FGF21 được thử nghiệm bằng kỹ thuật sắc ký loại theo kích cỡ (SEC: size exclusion chromatography). Các mẫu cần được phân tích được ủ ở 4°C, nhiệt độ phòng hoặc 37°C trong các thời điểm khác nhau, và sau đó được phân tích bằng SEC. Các thử nghiệm được thực hiện trên hệ Beckman HPLC có trang bị cột SEC. Đối với FGF21 kiểu dại, cột SEC TOSOHAAS TSK-Gel G2000 được sử dụng với 2x PBS chứa rượu isopropylic 2% làm pha động. Đối với các protein dung hợp FGF21 Fc và các polypeptit FGF21 đột biến, cột SEC TOSOHAAS TSK-Gel G3000 được sử dụng với 2x PBS làm pha động.

Ví dụ 17

Hoạt tính *in vitro* của FGF21 đột biến giảm kết tụ

Các thử nghiệm được tiến hành để xác định thể đột biến giảm kết tụ mà giữ lại được hoạt tính FGF21 kiểu dại trong thử nghiệm ELK-luxiferaza *in vitro*. Các thử nghiệm ELK-luxiferaza được tiến hành như được mô tả trong ví dụ 4. Các Fig.24A-24C thể hiện kết quả

của thử nghiệm hoạt tính ELK-luxiferaza được thực hiện trên các FGF21 đột biến FGF21 L99R (SEQ ID NO:109), FGF21 L99D (SEQ ID NO:111) và FGF21 A111T (SEQ ID NO:113) (Fig.24A); các FGF21 đột biến FGF21 A129D (SEQ ID NO:115), FGF21 A129Q (SEQ ID NO:117) và FGF21 A134K (SEQ ID NO:119) (Fig.24B); và các FGF21 đột biến FGF21 A134Y (SEQ ID NO:121), FGF21 A134E (SEQ ID NO:123) và FGF21 A129K (SEQ ID NO:125) (Fig.24C). Kết quả của các thử nghiệm này chứng tỏ rằng một số đột biến giảm kết tụ không ảnh hưởng bất lợi đến hoạt tính FGF21 như được thử nghiệm trong các thử nghiệm ELK-luxiferaza.

Ví dụ 18

Tạo và biểu hiện Fc-(L15)-FGF21 đột biến kết hợp thể hiện thời gian bán hủy dài hơn và mức độ kết tụ thấp hơn

Các FGF21 đột biến kết hợp, chứa đột biến được cho thấy là làm giảm sự kết tụ cũng như làm tăng thời gian bán hủy bằng cách phá vỡ sự phân hủy phân giải protein, được tạo ra và liên hợp vào phân tử IgG1 Fc (SEQ ID NO:11). Các FGF21 đột biến này được tạo ra về cơ bản là như được mô tả trong ví dụ 11.

Ví dụ 19

Nghiên cứu *in vitro* về Fc-(L15)-FGF21 đột biến thể hiện thời gian bán hủy dài hơn và mức độ kết tụ thấp hơn

Các thử nghiệm được tiến hành để xác định FGF21 đột biến kết hợp mà giữ lại được hoạt tính FGF21 kiểu dại trong thử nghiệm ELK-luxiferaza *in vitro*. Các thử nghiệm ELK-luxiferaza được tiến hành như được mô tả trong ví dụ 4.

Các Fig.25A-25D thể hiện kết quả của thử nghiệm hoạt tính ELK-luxiferaza được thực hiện trên các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 P171G, Fc-(L15)-FGF21 P171S và Fc-(L15)-FGF21 P171T (Fig.25A); các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 P171Y, Fc-(L15)-FGF21 P171W và Fc-(L15)-FGF21 P171C (Fig.25B); Fc-(L15)-FGF21, Fc-(L15)-FGF21 (A45K, G170E) và FGF21 A45K (Fig.25C); và Fc-(L15)-FGF21, Fc-(L15)-FGF21 P171E và Fc-(L15)-FGF21 (A45K, G170E) (Fig.25D). Kết quả của các thử nghiệm này chứng tỏ rằng các đột biến nhằm cải thiện độ ổn định, hoặc cả độ ổn định và độ hòa tan, không ảnh

hưởng đến hoạt tính *in vitro* so với Fc-(L15)-FGF21 kiểu dại. Bất ngờ là, thể đột biến FGF21 A45K thể hiện hiệu lực cải thiện so với Fc-(L15)-FGF21 kiểu dại.

Fig.26A thể hiện % thay đổi sự kết tụ của đối chứng FGF21 (WT) và FGF21 A45K sau khi ủ 65 mg/mL protein ở 4°C trong 1, 2 và 4 ngày. Dữ liệu này cho thấy rằng đột biến A45K dẫn đến sự giảm kết tụ của protein này so với protein kiểu dại.

Fig.26B thể hiện % thay đổi sự kết tụ của đối chứng FGF21 (WT) và FGF21 P78C, FGF21 P78R, FGF21 L86T, FGF21 L86C, FGF21 L98C, FGF21 L98R, FGF21 A111T, FGF21 A129D, FGF21 A129Q, FGF21 A129K, FGF21 A134K, FGF21 A134Y và FGF21 A134E sau khi ủ 65 mg/mL protein ở 4°C trong 1, 6 và 10 ngày. Dữ liệu này cho thấy rằng FGF21 L86C, FGF21 L98C, FGF21 L98R, FGF21 A111T, FGF21 A129Q và FGF21 A129K dẫn đến sự giảm kết tụ của protein này so với protein kiểu dại.

Fig.27 thể hiện kết quả của thử nghiệm hoạt tính ELK-luxiferaza được thực hiện trên đối chứng FGF21 của người và các FGF21 đột biến FGF21 A45K, FGF21 L52T và FGF21 L58E. Thử nghiệm này chứng tỏ rằng thể đột biến FGF21 A45K giữ lại được hiệu quả đầy đủ của FGF21 kiểu dại và thể hiện hiệu lực thậm chí là lớn hơn so với FGF21 kiểu dại. Tuy nhiên, các thể đột biến FGF21 L52T và FGF21 L58E thể hiện hiệu lực và hiệu quả giảm so với FGF21 kiểu dại.

Các Fig.28A-28B thể hiện sự thay đổi mức độ kết tụ của các Fc-(L15)-FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 (6-181, G170E), Fc-(L15)-FGF21 (A45K, G170E), Fc-(L15)-FGF21 P171E, Fc-(L15)-FGF21 P171A, Fc-(L15)-FGF21 G170E và đối chứng FGF21 sau khi ủ ở 4°C trong 1, 4 và 8 ngày. Thử nghiệm này chứng tỏ rằng trong khoảng thời gian 8 ngày, thể đột biến Fc-(L15)-FGF21 (A45K, G170E) thể hiện sự kết tụ ít hơn so với các thể đột biến Fc-(L15)-FGF21 G170E hoặc Fc-(L15)-FGF21 P171E, nhưng cả ba thể đột biến này đều thể hiện sự kết tụ ít hơn so với đối chứng Fc-(L15)-FGF21. Bảng 17 thể hiện % kết tụ thu được đối với đối chứng Fc-(L15)-FGF21 và thể đột biến Fc-(L15)-FGF21 (A45K, G170E) sau khi ủ ở 4°C hoặc nhiệt độ phòng trong 0, 2, 3, 4 hoặc 7 ngày.

Bảng 17

% kết tụ của Fc-FGF21 và Fc-FGF21 đột biến

Mẫu		Ngày 0	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 7
Fc-(L15)-FGF21 WT	4°C	1,12	1,71	1,89	2,14	2,32
32 mg/mL	RT	1,12	6,09	7,94	9,57	12,59
Fc-(L15)-FGF21 (A45K, G170E)	4°C	0,45	0,77	0,88	1,03	1,24
33 mg/mL	RT	0,45	3,86	5,22	6,62	8,60

Ví dụ 20

Tạo và biểu hiện thể đột biến kết hợp dung hợp Fc-FGF21

Như được mô tả ở trên, độ ổn định và độ hòa tan của FGF21 có thể được điều biến bằng cách tạo cải biến cắt cụt và cải biến thế axit amin cụ thể. Ngoài ra, độ ổn định của FGF21 có thể được tăng cường hơn nữa bằng cách dung hợp protein FGF21 được cải biến như vậy với phần Fc của gen IgG1 globulin miễn dịch của người. Hơn nữa, bằng cách tạo ra dạng kết hợp của các cải biến nêu trên, các phân tử FGF21 có cả độ ổn định và độ hòa tan được tăng cường có thể được tạo ra. Các trình tự axit nucleic mã hóa FGF21 đột biến kết hợp được liệt kê trong bảng 18 được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả ở trên. Nhóm liên kết được sử dụng là nhóm liên kết L15, GGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:28).

Bảng 18

Các FGF21 đột biến kết hợp

Gốc axit amin	Đột biến phân giải protein		Đột biến kết tụ	Fc	Nhóm liên kết
1-181	G170E		A45K	-NH_2	L15
1-181	G170E		L98R	-NH_2	L15
1-181	G170E		A45K, L98R	-NH_2	L15
1-181	P171G		A45K	-NH_2	L15
1-181	P171S		A45K	-NH_2	L15
1-181	P171G		L98R	-NH_2	L15
1-181	P171S		L98R	-NH_2	L15
1-181	P171G		A45K, L98R	-NH_2	L15
1-178	G170E			-NH_2	L15
6-181	G170E			-NH_2	L15
6-181	G170E		A45K	-NH_2	L15
6-181	G170E		L98R	-NH_2	L15

Gốc axit amin	Đột biến phân giải protein		Đột biến kết tụ	Fc	Nhóm liên kết
6-181	P171G			$-NH_2$	L15
6-181	P171G		L98R	$-NH_2$	L15
7-181	G170E			$-NH_2$	L15

Fig.29 thể hiện lượng glucoza trong máu được đo ở chuột nhắt được tiêm các Fc-(L15)-FGF21 đột biến kết hợp Fc-(L15)-FGF21 (A45K, G170E), Fc-(L15)-FGF21 (A45K, P171G) hoặc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G).

Trong thử nghiệm khác, FGF21 đột biến Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) được nghiên cứu cùng với FGF21 trưởng thành kiểu dại và Fc-FGF21. Trong một thử nghiệm, dòng tế bào 293T tái tổ hợp được nuôi cấy trong điều kiện có mặt các nồng độ khác nhau của FGF21, Fc-(L15)-FGF21 hoặc Fc-(L15) FGF21 (L98R, P171G) trong 6 giờ. Dịch ly giải tế bào sau đó được thử nghiệm về hoạt tính luxiferaza. Như được thể hiện trên Fig.30, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) có hoạt tính tương tự với Fc-(L15)-FGF21, cho thấy rằng việc đưa hai đột biến điểm này vào không làm thay đổi hoạt tính *in vitro* của phân tử.

Trong thử nghiệm khác nữa, độ ổn định của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) ở 65 mg/mL được đánh giá trong chín ngày ở hai nhiệt độ khác nhau, cụ thể là nhiệt độ phòng và 4°C, cùng với FGF21 và Fc-(L15)-FGF21. Sau thời gian ủ, dịch ly giải tế bào sau đó được phân tích bằng SEC-HPLC để xác định profin kết tụ theo thời gian ở các nhiệt độ khác nhau. Dữ liệu được thể hiện trên Fig.31A và Fig.31B cho thấy rằng tốc độ tạo kết tụ giảm đáng kể ở Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) ở nhiệt độ phòng (hình tam giác đặc, đường nét đứt trên Fig.31A) và ở nhiệt độ 4°C (hình tam giác đặc, đường nét đứt trên Fig.31B).

Ví dụ 21

FGF21 đột biến kháng phân giải protein chứa đột biến đầu C

Độ ổn định *in vivo* của các thể đột biến kết hợp cũng được nghiên cứu. Cụ thể, độ ổn định *in vivo* của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) được so sánh với độ ổn định của Fc-(L15)-FGF21 ở các mô hình chuột và cynomolgus. Các kết quả được phát hiện thấy là tương tự ở cả hai loài. Trong nghiên cứu trên khỉ cynomolgus, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và Fc-(L15)-FGF21 được tiêm IV ở liều 23,5 mg/kg và các lượng nhỏ của huyết thanh và huyết

tương được thu gom tại các thời điểm trong vòng 840 giờ sau khi dùng thuốc. Các thời điểm trong vòng 168 giờ được phân tích. Các mẫu theo thời điểm được tinh chế dựa vào ái lực bằng cách sử dụng chất phản ứng kháng Fc, sau đó được phân tích bằng cách sử dụng kỹ thuật khối phổ MALDI. Các kết quả có tương quan chặt chẽ giữa hai phân tích.

Khi phân tích dữ liệu được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật ái lực miễn dịch-MALDI, nhận thấy rằng sự chia cắt ở vị trí P171 được loại bỏ ở phân tử Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) nhờ việc gây đột biến P171 thành P171G. Tuy nhiên, sự phân hủy nhỏ và chậm làm mất lên tới 3 gốc đầu C được quan sát thấy đối với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (Fig.32). Sự phân cắt nhỏ ở ba gốc đầu C cũng được quan sát thấy với các FGF21 đột biến khác sau khi vị trí phân cắt mẫn cảm hơn giữa các gốc axit amin 171 và 172 được phong bế như được thể hiện trên các Fig.20 và 21. Sự phân cắt 3 gốc đầu C có thể thể hiện sự ngừng phân cắt khỏi đầu C của phân tử bởi carboxypeptidaza theo kiểu tuần tự từng gốc một hoặc bởi sự tấn công của proteaza đặc hiệu ở các gốc axit amin 178 và 179 với sự chia cắt không đặc hiệu ở các gốc axit amin 179-180 và 180-181. Việc mất đi 2-3 axit amin ở đầu C có thể làm giảm liên kết β-Klotho và cuối cùng là làm giảm hiệu lực và hoạt tính in vivo của phân tử. Xem tài liệu, ví dụ, Yie et al., 2009, FEBS Lett. 583:19-24. Để giải quyết sự phân hủy rõ ràng của đầu C bởi carboxypeptidaza, ảnh hưởng của việc bổ sung "mũ" gốc axit amin vào các polypeptit FGF21 đột biến khác nhau được nghiên cứu. Các cấu trúc, bao gồm các cấu trúc được thể hiện trong bảng 19, được tạo ra và được thử nghiệm bằng cách sử dụng các kỹ thuật nêu trong bản mô tả này. Bảng 19 tổng kết các kết quả của thử nghiệm ELK luxiferaza *in vitro*.

Các mũ axit amin thích hợp có thể có chiều dài nằm trong khoảng từ 1 đến 15 axit amin, ví dụ, có chiều dài 1, 2, 3, 4, 5, 10 hoặc 15 axit amin. Số lượng và loại axit amin bất kỳ có thể được sử dụng làm mũ, ví dụ, một gốc prolin và một gốc glyxin, hai gốc glyxin, năm gốc glyxin, cũng như các tổ hợp khác. Các ví dụ khác về mũ được đề xuất trong ví dụ này và trong bảng 19.

Ngoài ra, để giải quyết sự tấn công rõ ràng của proteaza ở các gốc axit amin 178 và 179, việc gây đột biến gốc axit amin ở các vị trí 179, 180 và 181 được nghiên cứu. Một lần nữa, các cấu trúc, bao gồm các cấu trúc được thể hiện trong bảng 19, được tạo ra và được thử nghiệm bằng cách sử dụng các kỹ thuật nêu trong bản mô tả này. Ảnh hưởng của việc kết hợp

mũ và các đột biến ở các vị trí này cũng được nghiên cứu. Bảng 19 tổng kết các cấu trúc làm ví dụ mà được tạo ra và được nghiên cứu trong thử nghiệm ELK-luxiferaza *in vitro* mà được tiến hành như được nêu trong bản mô tả này. Thống nhất với thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này, hFc có nghĩa là trình tự Fc của người (tức là, SEQ ID NO:11), L15 chỉ nhóm liên kết L15 (tức là, GGGGGSGGGSGGGGS, SEQ ID NO:28).

Bảng 19

Hiệu quả và giá trị EC50 của các polypeptit FGF21 chứa cải biến đầu C

Cấu trúc	EC50 (nM)	Hiệu quả
huFGF21	0,4	100,0%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G)	2,5	76,1%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, Y179F)	2,6	78,3%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, 1-180)		
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, 1-179)	7,8	77,4%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, A180E)	1,9	79,6%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, S181K)	130	87,9%
GSGSGSGSGS-hFGF21 -(L15)-hFc		
MKEDD-hFGF21-(L15)-hFc	834	83,1%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, S181P, P182)	272	69,9%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, A180G)	3,25	76,9%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, S181G)	3,43	77,3%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, L182)		
hFGF21(L98R, P171G, G182)		
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, Y179P)	428	44,4%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, Y179G)	61	82,6%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, Y179S)	25,3	74,8%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, Y179A)	43,2	79,6%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, S181T)	3,07	77,6%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, S181A)	2,66	73,5%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, S181L)	3,46	72,6%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, S181P)	33,8	79,5%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, A180P)	617	77,1%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, A180S)	2,18	84,7%
hFGF21(L98R, P171G, GGGGG182-6)		
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, P182)	6,1	85,9%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, G182)	6,5	71,1%
hFc-(L15)-hFGF21(1-178, L98R, P171G)	167	63,9%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, GG182-3)	1941	84,2%
hFc-(L15)-hFGF21(L98R, P171G, GGGGG182-6)	4307	99,7%

Fig.33 thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu quan sát được ở chuột nhắt db/db mắc bệnh đái tháo đường (nền C57B6) được tiêm đối chứng PBS, FGF21 nguyên gốc kiểu dại, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và hai phân tử được gắn mũ mà gốc prolin hoặc glyxin được thêm vào đó ở đầu C, tức là Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182P) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182G). Khi gốc được thêm vào đầu C của polypeptit FGF21 kiểu dại hoặc polypeptit FGF21 đột biến, gốc này được gọi theo vị trí của nó trong protein tạo thành. Như vậy, "182G" thể hiện rằng gốc glyxin được thêm vào đầu C của protein kiểu dại hoặc đột biến gốc 181 trưởng thành. Fig.33 cho thấy rằng FGF21 nguyên gốc làm giảm lượng glucoza trong máu trong 6 giờ trong khi cả ba thể đột biến Fc-FGF21 được nghiên cứu đều thể hiện hoạt tính làm giảm glucoza trong máu được duy trì trong ít nhất 120 giờ. Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182P), là phân tử chứa cải biến bổ sung gốc prolin ở đầu C của thành phần FGF21 của phân tử dung hợp, có vẻ có hiệu lực nhất và dẫn đến lượng glucoza trong máu thấp nhất so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182G).

Trong thử nghiệm tiếp theo, hoạt tính *in vivo* của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182G) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182P) được nghiên cứu và được so sánh với hoạt tính *in vivo* của phân tử được gắn mũ chứa cải biến bổ sung hai glyxin ở đầu C, tức là Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182G, 183G). Fig.34 thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu quan sát được ở chuột nhắt ob/ob được tiêm đối chứng PBS, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182G, 183G), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182G) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182P).

Như được thể hiện trên Fig.34, tất cả các phân tử được nghiên cứu đều thể hiện hoạt tính làm giảm glucoza được duy trì so với đối chứng PBS. Thử nghiệm này xác nhận các kết quả trước đây (Fig.33) rằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182P) với cải biến bổ sung prolin ở đầu C thể hiện hiệu quả làm giảm glucoza tăng đôi chút so với phân tử không có mũ prolin, ví dụ, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G). Tuy nhiên, cải biến bổ sung hai gốc glyxin ở đầu C, ví dụ, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182G 183G), có vẻ làm giảm hiệu lực *in vivo* của phân tử và rút ngắn khoảng thời gian của tác dụng làm giảm glucoza *in vivo*.

Fig.35 thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu quan sát được ở chuột nhắt db/db mắc bệnh đái tháo đường (nền C57B6) được tiêm đối chứng PBS hoặc các polypeptit đột biến FGF21 Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, Y179S), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, Y179A), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180S) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180G). Tất cả các thể đột biến đều thể hiện hoạt tính làm giảm glucoza tương tự nhau với khoảng thời gian tác dụng tương tự nhau.

Fig.36 thể hiện % thay đổi của lượng glucoza trong máu quan sát được ở chuột nhắt db/db mắc bệnh đái tháo đường (nền C57B6) được tiêm đối chứng môi trường dẫn thuốc, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, Y179F) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E). So với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, Y179F) ít hiệu quả hơn trong việc làm giảm glucoza trong máu. Tuy nhiên, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E), trong đó alanin ở vị trí axit amin 180 được gây đột biến thành axit glutamic, có hiệu quả hơn so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và gây ra sự giảm lượng glucoza trong máu thêm 20% so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G). Dữ liệu này gợi ý rằng đột biến A180E có thể có làm giảm sự phân hủy đầu C *in vivo* và nhờ đó cải thiện hiệu lực và hiệu quả *in vivo* của phân tử.

Ví dụ 22

Nghiên cứu trên khỉ redut

Cấu trúc Fc-nhóm liên kết-FGF21 được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp nêu trong bản mô tả này. Cấu trúc này chứa trình tự IgG1 Fc (SEQ ID NO:11) được dung hợp ở đầu C với trình tự liên kết L15 $(Gly)_5$-Ser-$(Gly)_3$-Ser-$(Gly)_4$-Ser (SEQ ID NO:28) mà sau đó được dung hợp ở đầu C với đầu N của trình tự FGF21 trưởng thành (SEQ ID NO:4), mà hai đột biến, L98R và P171G, được đưa vào đó. Cấu trúc này sau đó được biểu hiện và được tinh chế như được nêu trong bản mô tả này. Dạng dime của protein được phân lập, được liên kết thông qua các liên kết disulfua liên phân tử giữa vùng Fc của mỗi monome. Phân tử này được gọi trong ví dụ 22 là "Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)" và có trình tự axit amin là SEQ ID NO:43 và được mã hóa bởi SEQ ID NO:42. Trong ví dụ này, FGF21 chỉ dạng trưởng thành của FGF21, cụ thể là SEQ ID NO:4.

22.1 Thiết kế nghiên cứu

Cấu trúc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) được sử dụng thường xuyên và qua đường dưới da ("SC": subcutaneously) cho khỉ redut đực không bị đái tháo đường có BMI > 35. Hai nhóm khỉ khác (n=10 mỗi nhóm) được điều trị bằng FGF21 trưởng thành (tức là, SEQ ID NO:4) hoặc đối chứng môi trường dẫn thuốc.

Các con vật được làm thích nghi với môi trường trong 42 ngày trước khi cho dùng hợp chất thử nghiệm bất kỳ và sau đó được chia thành các nhóm gồm 10 con và được cho sử dụng nhiều lần tiêm SC các hợp chất thử nghiệm hoặc chất đối chứng theo kiểu mù thí nghiệm, như được thể hiện bằng sơ đồ trên Fig.37. Một cách ngắn gọn, mỗi con vật được tiêm hợp chất hoặc môi trường dẫn thuốc mỗi ngày một lần. FGF21 được cho sử dụng hằng ngày, trong khi Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) được sử dụng hằng tuần. Liều Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và FGF21 được tăng lên sau mỗi 2 tuần, như được thể hiện trên Fig.37. Trọng lượng cơ thể và sự hấp thu thức ăn được theo dõi trong suốt nghiên cứu. CRO được để mù thí nghiệm đối với chất điều trị (không biết rõ chất dùng để điều trị).

Hai thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng (OGTT) được tiến hành trước khi bắt đầu việc điều trị. OGTT1 được sử dụng để phân loại các con vật thành ba nhóm tương đương có sự phân bố động vật tương tự dựa trên diện tích dưới đường cong (AUC) và trọng lượng cơ thể. Kết quả của OGTT thứ hai (OGTT2) được sử dụng để khẳng định sự phân loại trong OGTT thứ nhất (OGTT1). Các con khỉ có profin OGTT không thống nhất từ một thử nghiệm (OGTT1) với thử nghiệm sau (OGTT2) được loại trừ. Kết quả của các OGTT 1 và 2 được thể hiện trên các Fig.38A và 38B, với các giá trị đo AUC được thể hiện trên Fig.38C. Trọng lượng cơ thể ban đầu được thể hiện trên Fig.38D và bảng 20.

Các OGTT 3, 4 và 5 được tiến hành 2 tuần một lần khi kết thúc mỗi lần điều trị liều thấp, trung bình và cao. Các mẫu máu được thu hằng tuần từ các con vật ở trạng thái đói và được sử dụng để đo lượng glucoza, insulin, triglyxerit, cũng như lượng hợp chất thử nghiệm. Các mẫu máu cũng được thu hằng tuần trong khoảng thời gian đào thải kéo dài 3 tuần.

OGTT1 và OGTT2 ban đầu thể hiện profin glucoza mong đợi như được thấy ở các con vật bình thường, với glucoza tối đa trong huyết tương đạt được tại thời điểm 30 phút, và chứng tỏ AUC ổn định ở 3 nhóm khác nhau.

Các giá trị ban đầu ở trạng thái đói của hóa học huyết tương được thể hiện trong bảng 20. Các phép đo hóa học huyết tương được thực hiện trên các máu mẫu được thu trước khi bắt đầu việc điều trị.

Bảng 20

Giá trị ban đầu của trọng lượng cơ thể, lượng glucoza, insulin và triglyxerit trong huyết tương lúc đói của ba nhóm khỉ redut

	Môi trường dẫn thuốc	FGF21	Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
N	10	10	10
Trọng lượng cơ thể (kg)	8,5 ± 0,5	8,7 ± 0,4	8,5 ± 0,4
Glucoza trong huyết tương (mg/dL)	91,9 ± 4,8	94,8 ± 5,3	82,2 ± 3,7
Insulin (pg/mL)	942,6 ± 121,4	976,1 ±107,7	1023,4 ± 205,1
Triglyxerit (mg/dL)	44,4 ± 4,8	58,6 ± 5,2	71,7 ± 9,8

Ba mức liều khác nhau được chọn, liều thấp là 0,1 và 0,3 mg/kg, liều trung bình là 0,3 và 1 mg/kg và liều cao là 1 và 5 mg/kg đối với FGF21 và Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G), một cách tương ứng. Các mức liều được chọn dựa trên sự đáp ứng liều quan sát được ở chuột nhắt, với chế độ dùng liều dựa trên tần suất tiêm dự kiến ở người. Liều đẳng mol của FGF21 được sử dụng đối với liều thấp và trung bình, và liều cao của Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) được tăng đến 5 mg/kg (tức là, thay vì 3 mg/kg, mà đẳng mol với liều 1 mg/kg của FGF21).

22.2 Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đối với trọng lượng cơ thể

Trong thử nghiệm này, để xác định tác dụng của các hợp chất thử nghiệm đối với trọng lượng cơ thể được đo hằng tuần, % thay đổi trọng lượng cơ thể so với mức ban đầu được tính toán hằng tuần ở ba nhóm khỉ redut khác nhau. Trọng lượng cơ thể cũng được đo trong ba tuần của khoảng thời gian đào thải. Giá trị trọng lượng cơ thể ban đầu của mỗi nhóm được trình bày trong bảng 20.

Trọng lượng cơ thể được theo dõi trong suốt nghiên cứu, cả trước và sau khi dùng hợp chất thử nghiệm. % thay đổi trọng lượng cơ thể so với mức ban đầu của các con vật dùng môi trường dẫn thuốc tăng lên theo thời gian, trong khi trọng lượng cơ thể của các con vật được điều trị bằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và FGF21 giảm theo cách phụ thuộc liều qua

đợt điều trị kéo dài 6 tuần, như được thể hiện trên Fig.39. Như quan sát được trước đó ở loài gặm nhấm (Xu et al., Diabetes 58(1):250-9 (2009)), việc điều trị bằng FGF21 làm giảm trọng lượng cơ thể đáng kể về mặt thống kê. Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) có mức độ tiếp xúc lớn hơn so với FGF21 (Fig.48 và Fig.47, một cách tương ứng), đưa ra lời giải thích khả thi cho sự quan sát thấy rằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) thể hiện sự làm giảm trọng lượng cơ thể rõ rệt hơn so với FGF21.

22.3. Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đối với lượng insulin

Lượng insulin được đo trong các mẫu máu được thu sau khi để đói qua đêm hoặc sau bữa ăn chiều.

Lượng insulin trong huyết tương lúc đói được đo ở khỉ redut mỗi tuần ở các con vật được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc, FGF21 hoặc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và trong khoảng thời gian đào thải kéo dài 3 tuần. Các mẫu máu lúc đói được lấy khoảng năm ngày sau lần tiêm Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) cuối cùng và khoảng 21 giờ sau lần tiêm FGF21 cuối cùng.

Lượng insulin trong huyết tương lúc no được đo ở khỉ redut trong tuần điều trị thứ năm và thứ sáu bằng môi trường dẫn thuốc hoặc FGF21 trong đợt điều trị liều cao. Các mẫu máu lúc no được lấy khoảng ba ngày sau lần tiêm Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và khoảng 2 giờ sau lần tiêm FGF21 cuối cùng. Fig.40 thể hiện tác dụng của môi trường dẫn thuốc, FGF21 và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) đối với lượng insulin lúc đói trong toàn bộ chín tuần nghiên cứu, trong khi đó Fig.41 thể hiện lượng insulin lúc no được xác định từ các mẫu được lấy trong các tuần 5 và 6.

Tổng kết lại, ở hai liều cao nhất, cả FGF21 và Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) đều làm giảm đáng kể về mặt thống kê lượng insulin trong huyết tương lúc đói và lúc no. Sự quan sát thấy rằng lượng insulin của các con vật được điều trị bằng FGF21 và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) giảm đi mà không quan sát thấy lượng glucoza tăng lên là chỉ thị cho độ nhạy insulin tăng.

22.4 Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đối với OGTT (glucoza và insulin)

Ba OGTT (OGTT 3, 4 và 5) được tiến hành sau khi việc điều trị được bắt đầu. Profin lượng glucoza và insulin trong OGTT5 được đo ở các con vật được điều trị trong 6 tuần bằng môi trường dẫn thuốc, FGF21 hoặc Fc-FGF21 (L98R, P171G), tương ứng với hai tuần cuối cùng của chế độ tăng liều cao. OGTT5 được tiến hành khoảng 7 ngày sau lần tiêm Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) cuối cùng và khoảng 21 giờ sau lần tiêm FGF21 cuối cùng. Profin glucoza và insulin trong OGTT5 được thể hiện trên Fig.42 và Fig.43, một cách tương ứng. Các con vật được điều trị bằng Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) thể hiện mức độ thanh thải glucoza được cải thiện so với các con vật được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc chỉ ở liều cao nhất và tại thời điểm cuối cùng được đo, như được thể hiện trên Fig.42. Khi kết thúc liều cuối cùng, Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) thể hiện sự cải thiện mức độ thanh thải glucoza lớn nhất. FGF21 không thể hiện sự cải thiện mức độ thanh thải glucoza. Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) có mức độ tiếp xúc lớn hơn so với FGF21 (Fig.48 và Fig.47, một cách tương ứng), đưa ra lời giải thích khả thi cho sự quan sát thấy rằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) thể hiện tác dụng thanh thải glucoza rõ rệt hơn so với FGF21. Lượng insulin trong OGTT5 giảm đáng kể về mặt thống kê tại thời điểm đo cuối cùng ở các con vật được điều trị bằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) so với các con vật được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc.

% thay đổi AUC của glucoza so với mức ban đầu được tính toán cho ba OGTT (OGTT 3, 4 và 5) được tiến hành khi kết thúc mỗi liều thấp, trung bình và cao ở ba nhóm khỉ redut khác nhau như được thể hiện trên Fig.44. OGTT5 được tiến hành khoảng 7 ngày sau lần tiêm Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) cuối cùng và 21 giờ sau lần tiêm FGF21 cuối cùng và cho thấy rằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) làm giảm AUC5 đáng kể về mặt thống kê. Các giá trị OGTT ban đầu của mỗi nhóm được thể hiện trên Fig.38C.

Lượng glucoza trong huyết tương lúc đói được đo vào các ngày không tiến hành các OGTT. Không quan sát thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê nào về lượng glucoza trong huyết tương lúc đói đo được giữa ba nhóm động vật.

22.5 Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đối với lượng triglyxerit

% thay đổi lượng triglyxerit trong huyết tương lúc đói được tính toán ở khỉ redut mỗi tuần ở các con vật được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc, FGF21 hoặc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và trong khoảng thời gian đào thải kéo dài 3 tuần. Các mẫu máu lúc đói được

lấy khoảng năm ngày sau lần tiêm Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) cuối cùng và khoảng 21 giờ sau lần tiêm FGF21 cuối cùng. Lượng triglyxerit được đo mỗi tuần sau khi việc điều trị được bắt đầu và % thay đổi so với mức ban đầu được thể hiện trên Fig.45, các giá trị ban đầu ở trạng thái đói được thể hiện trong bảng 20.

Như được thể hiện trên Fig.45, các con vật được điều trị bằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) hoặc FGF21 thể hiện sự làm giảm lượng triglyxerit phụ thuộc vào liều, trong đó Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) có tác dụng làm giảm lớn nhất so với FGF21.

Fig.46 thể hiện lượng triglyxerit trong huyết tương trong các mẫu thu được từ khỉ redut ở trạng thái no, trong tuần điều trị thứ năm và thứ sáu bằng môi trường dẫn thuốc hoặc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) hoặc FGF21. Các mẫu máu lúc no được lấy khoảng 3 ngày sau lần tiêm Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và khoảng 2 giờ sau lần tiêm FGF21 cuối cùng. Lượng triglyxerit trong huyết tương lúc no của các con vật được điều trị bằng FGF21 và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) giảm đáng kể về mặt thống kê so với lượng triglyxerit của các con vật được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc (Fig.46).

22.6 Nồng độ của hợp chất thử nghiệm

Mức độ tiếp xúc của các hợp chất thử nghiệm được dùng ở các mức liều mol xấp xỉ tương đương được đánh giá trong suốt thời gian nghiên cứu. Nồng độ của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) được đo trước khi dùng liều và khoảng 5 ngày sau lần tiêm cuối cùng. Lượng FGF21 được đo trước khi dùng liều và tại các thời điểm là ngày 5, 12, 19 và 26. Các mẫu máu được lấy tại thời điểm khoảng 21 giờ sau lần tiêm cuối cùng.

Nồng độ riêng lẻ của các hợp chất thử nghiệm ở mỗi con khỉ được thể hiện trên các Fig.47 và 48. Như được thể hiện trên Fig.47, phần lớn các con vật trong nhóm được điều trị bằng FGF21 có nồng độ nằm dưới giới hạn định lượng. Fig.48 cho thấy rằng các con vật trong nhóm được điều trị bằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) có mức có thể phát hiện được của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) trong mỗi giai đoạn dùng liều (hai liều hằng tuần ở cùng cường độ liều). Nồng độ trung bình từ mỗi giai đoạn dùng liều tăng xấp xỉ tỷ lệ với liều từ 0,3 đến 5 mg/kg đối với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G). Có sự tích tụ tối thiểu như được chứng minh bởi nồng độ ổn định sau liều hằng tuần thứ nhất và thứ hai trong mỗi giai đoạn tăng liều đối với cả hai hợp chất. Trong giai đoạn không điều trị (giai đoạn đào thải), lượng Fc-(L15)-

FGF21 (L98R, P171G) là có thể phát hiện được lên đến khoảng ngày 47 (12 ngày sau liều cuối cùng) và nằm dưới giới hạn định lượng dưới (LLOQ) sau đó.

Mức độ tiếp xúc của các hợp chất thử nghiệm cũng được theo dõi trong mỗi OGTT. FGF21 không thể phát hiện được trong các OGTT 3 và 4, sau khi điều trị bằng FGF21 liều thấp và liều trung bình. Tuy nhiên, quan sát thấy lượng có thể đo được trong OGTT5, sau khi điều trị bằng liều cao. Sự tăng lượng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) tỷ lệ với liều được quan sát thấy qua OGTT thứ ba đến thứ năm với mức liều tăng, như được thể hiện trên Fig.49.

Dữ liệu về lượng hợp chất khẳng định rằng các con vật được tiếp xúc với lượng mong đợi của mỗi hợp chất, tức là FGF21 và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G), theo cách tăng liều. Mức độ thay đổi lớn được quan sát thấy ở lượng FGF21 đo được, đây là kết quả được dự đoán khi xem xét rằng việc lấy mẫu được tiến hành khoảng 21 giờ sau liều cuối cùng và thời gian bán hủy của FGF21 là khoảng 1 giờ.

22.7 Kết luận

FGF21 làm giảm lượng triglyxerit và insulin trong huyết tương lúc đói và lúc no và làm giảm trọng lượng cơ thể ở liều cao nhất. Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) cải thiện OGTT và làm giảm lượng insulin ở liều cao nhất, và làm giảm lượng triglyxerit trong huyết tương lúc đói và lúc no theo cách phụ thuộc liều cũng như trọng lượng cơ thể. Cả FGF21 và Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) đều làm giảm nhiều thông số chuyển hóa ở các con khỉ redut không bị đái tháo đường. Sự giảm lượng insulin và triglyxerit là giống nhau giữa FGF21 và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) khi lượng hợp chất tuần hoàn nằm trong phạm vi tương tự, ở trạng thái no. Do các tính chất được cải thiện của nó, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) tốt hơn so với FGF21 ở hầu hết các thông số đo được và có thể được dùng một lần một tuần để quan sát thấy hiệu quả đối với các thông số chuyển hóa.

Ví dụ 23

Phân tử dung hợp Fc Fc-(G4S)3-FGF21(L98R, P171G, A180E)

Thể dung hợp Fc chứa FGF21 đột biến, mà được kết hợp với thành phần IgG1 Fc bằng nhóm liên kết, được tạo ra. Thành phần FGF21 của thể dung hợp Fc chứa ba đột biến điểm được thiết kế ở trình tự polypeptit của FGF21, tức là L98R, P171G, A180E (việc đánh số dựa

trên dạng trưởng thành của FGF21, được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO:4). Phân tử này được tạo cấu trúc bằng cách liên hợp Fc của người (SEQ ID NO:11) với đầu N của FGF21 đột biến L98R, P171G, A180E (SEQ ID NO:39) thông qua nhóm liên kết gồm 15 axit amin chứa trình tự GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:31). Phân tử này được gọi là "Fc-(G4S)3-FGF21(L98R, P171G, A180E)" và trình tự axit amin nguyên chiều dài của nó được thể hiện trên Fig.50 và trong SEQ ID NO:47; nó được mã hóa bởi axit nucleic có SEQ ID NO:46. Thử nghiệm *in vitro* về Fc-(G4S)3-FGF21(L98R, P171G, A180E) cho thấy rằng nó là chất kích thích có hiệu lực đối với quá trình phosphoryl hóa Erk ở dòng tế bào tái tổ hợp biểu hiện quá mức β-Klotho. Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) cũng thể hiện ái lực liên kết β-Klotho tăng so với thể dung hợp Fc của FGF21 kiểu dại hoặc thể dung hợp Fc của FGF21-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:45). Khi được tiêm vào các mô hình động vật bị đái tháo đường, Fc-(G4S)3-FGF21(L98R, P171G, A180E) làm giảm lượng glucoza trong máu, làm giảm trọng lượng cơ thể, và thích hợp cho việc tiêm hai tuần một lần.

23.1 Hoạt tính *in vitro* của Fc-(G4S)3-FGF21(L98R, P171G, A180E)

Các thử nghiệm được tiến hành để kiểm tra xem liệu Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) có giữ lại được hoạt tính tương tự với thể dung hợp Fc của FGF21 kiểu dại hoặc FGF21 nguyên gốc kiểu dại trong thử nghiệm ELK-luxiferaza *in vitro* hay không.

Các thử nghiệm ELK-luxiferaza được tiến hành bằng cách sử dụng hệ tế bào thận 293T tái tổ hợp của người, trong đó các tế bào 293T này biểu hiện quá mức các cấu trúc chỉ thị luxiferaza và β-Klotho. β-Klotho là đồng thụ thể cần thiết cho FGF21 để hoạt hóa thụ thể FGF và gây ra sự truyền tín hiệu nội bào, bao gồm sự phosphoryl hóa Erk. Các cấu trúc chỉ thị Erk-luxiferaza chứa các trình tự mã hóa GAL4-ELK1 và yếu tố chỉ thị 5xUAS-Luxiferaza. Yếu tố chỉ thị 5xUAS-Luxiferaza được điều khiển bởi trình tự khởi đầu chứa năm bản sao nối tiếp của vị trí liên kết Gal4. Hoạt tính của yếu tố chỉ thị được điều hòa bởi mức Erk đã được phosphoryl hoá, và được sử dụng để gián tiếp theo dõi và định lượng hoạt tính FGF21.

Các thử nghiệm ELK-luxiferaza được tiến hành bằng cách nuôi cấy tế bào 293T trong điều kiện có mặt các nồng độ khác nhau của FGF21 kiểu dại, thể dung hợp Fc của FGF21 kiểu dại, Fc-L15-FGF21 (L98R, P171G, A180E) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) trong 6 giờ, và sau đó thử nghiệm dịch ly giải tế bào về hoạt tính luxiferaza. Mức phát quang

thu được trong các thử nghiệm ELK-luxiferaza đối với mỗi cấu trúc FGF21 được biểu diễn ở trục y và nồng độ của hợp chất được biểu diễn ở trục x.

Fig.51 thể hiện sự đáp ứng liều của các hợp chất được thử nghiệm trong thử nghiệm Erk-luxiferaza. Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) được giữ lại được hoạt tính tương tự so với thể dung hợp Fc của FGF21 kiểu dại, gợi ý rằng việc kết hợp các đột biến với L98R, P171G và A180E không làm thay đổi hoạt tính sinh học của FGF21. So với FGF21 nguyên gốc kiểu dại, các cấu trúc dung hợp Fc thể hiện hiệu lực giảm đôi chút và hoạt tính tối đa trong thử nghiệm dựa trên tế bào này với đồng thụ thể β-Klotho được biểu hiện quá mức.

23.2 Hoạt tính *in vitro* của thể dung hợp Fc-FGF21(L98R, P171G, A180E) chứa các trình tự liên kết khác nhau

Chất tương tự thể dung hợp Fc tương tự được tạo ra bằng cách dung hợp IgG1 Fc của người với FGF21 (L98R, P171G, A180E) thông qua trình tự liên kết khác, GGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:28). Nhóm liên kết này được gọi là L15 và phân tử dung hợp tạo thành được gọi là Fc-L15-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:57). Trong thử nghiệm này, tác dụng của các trình tự liên kết khác nhau đối với hoạt tính của các thể dung hợp Fc-FGF21 (L98R, P171G, A180E) được nghiên cứu.

Các thử nghiệm ELK-luxiferaza được tiến hành bằng cách nuôi cấy tế bào 293T trong điều kiện có mặt các nồng độ khác nhau của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) và Fc-L15-FGF21 (L98R, P171G, A180E) trong 6 giờ, và sau đó thử nghiệm dịch ly giải tế bào về hoạt tính luxiferaza. Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) thể hiện hoạt tính tương tự với Fc-L15-FGF21 (L98R, P171G, A180E), cho thấy rằng các trình tự liên kết khác nhau, ví dụ, các nhóm liên kết (G4S)3 hoặc L15, không có tác động đáng kể đối với hoạt tính sinh học của các thể dung hợp Fc-FGF21.

23.3 Ái lực liên kết *in vitro* của Fc-(G4S)3-FGF21(L98R, P171G, A180E) đối với β-Klotho trong thử nghiệm liên kết

Liên kết của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) với β-Klotho của người và của khỉ cynomolgus được thử nghiệm trong thử nghiệm liên kết cân bằng dung dịch Biacore. Ái lực của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) cũng được so sánh với thể tương tự FGF21

dung hợp Fc chỉ có các đột biến L98R và P171G, cụ thể là Fc-L15-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43).

Neutravidin được giữ cố định trên chip CM5 bằng cách ghép cặp amin. Biotin-FGF21 được bắt giữ trên tế bào dòng chảy thứ hai đến ~1500 RU. Tế bào dòng chảy thứ nhất được sử dụng làm đối chứng nền. Các FGF21 đột biến với độ pha loãng 5 lần (0,03~2000 nM) được ủ với β-Klotho của người 10 nM hoặc β-Klotho của khỉ cynomolgus 25 nM trong PBS cộng với BSA 0,1 mg/mL, P20 0,005% ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Liên kết của β-Klotho tự do trong dung dịch hỗn hợp được đo bằng cách phun lên bề mặt biotin-FGF21. Tín hiệu liên kết β-Klotho 100% được xác định trong điều kiện không có mặt các FGF21 đột biến trong dung dịch. Đáp ứng liên kết β-Klotho giảm với nồng độ tăng của các FGF21 đột biến cho thấy rằng β-Klotho đã liên kết với các FGF21 đột biến trong dung dịch, mà phong bế β-Klotho không cho liên kết với bề mặt biotin-FGF21 đã được cố định. Liên kết tương đối của hỗn hợp theo nồng độ mol của FGF21 được vẽ đồ thị bằng cách sử dụng GraphPad Prizm 5. EC_{50} được tính toán bằng làm khớp không tuyến tính cạnh tranh một vị trí trong cùng phần mềm.

Fig.52 thể hiện các kết quả từ thử nghiệm liên kết cân bằng dung dịch Biacore của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) và Fc-L15-FGF21 (L98R, P171G) đối với β-Klotho của người (bên phải) và β-Klotho của khỉ cynomolgus (bên trái). Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) thể hiện hoạt tính liên kết được cải thiện ít nhất 2 lần đối với cả β-Klotho của người và của khỉ cynomolgus so với Fc-L15-FGF21 (L98R, P171G).

23.4 Hiệu quả *in vivo* của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) ở chuột nhắt db/db bị đái tháo đường

Câu hỏi là liệu Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) có thể tạo ra hiệu quả chuyển hóa có lợi, như làm giảm lượng glucoza trong máu và làm giảm trọng lượng cơ thể, ở chuột nhắt db/db bị đái tháo đường hay không được nghiên cứu. Nghiên cứu này cũng nhằm thử nghiệm khoảng thời gian và đáp ứng liều của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) sau một lần tiêm đơn lẻ. Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) với liều là 0,1, 0,3, 1 và 3 mg/kg được tiêm trong màng bụng vào chuột nhắt db/db bị đái tháo đường. Nhóm được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc (Tris 10 mM, sucroza 2,2%, sorbitol 3,3%, độ pH=8,5) cũng được bao gồm trong nghiên cứu. Các mẫu máu được thu từ mỗi con vật (n=10 mỗi nhóm) tại

thời điểm ban đầu (trước khi tiêm) và 6, 24, 72, 120 và 168 giờ sau khi tiêm. Lượng glucoza trong máu được đo bằng thiết bị OneTouch Glucometer (LifeScan, Inc. Milpitas, CA). Trọng lượng cơ thể được đo tại thời điểm ban đầu (thời điểm 0), 24, 72, 120 và 168 giờ sau khi tiêm.

Fig.53A thể hiện lượng glucoza trong máu ở chuột nhắt db/db tại các thời điểm khác nhau sau khi tiêm môi trường dẫn thuốc hoặc Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E). Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) gây ra sự giảm lượng glucoza trong máu theo cách phụ thuộc liều ở chuột nhắt db/db. Lượng giảm glucoza tối đa là khoảng 50% so với mức ban đầu hoặc so với nhóm được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc. Tác dụng tối đa đạt được trong vòng 6 giờ sau khi tiêm và duy trì trong 120 giờ sau khi tiêm. Lượng glucoza trong máu bắt đầu quay trở lại mức ban đầu trong khoảng 168 giờ. ED50 ước tính, là liều cần để đạt được tác dụng bán cực đại, đối với Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) là khoảng 1 mg/kg ở chuột nhắt db/db.

Fig.53B thể hiện tác dụng của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) đối với trọng lượng cơ thể sau một lần tiêm đơn lẻ vào chuột nhắt db/db. Các kết quả được thể hiện dưới dạng sự thay đổi của trọng lượng cơ thể so với thời điểm 0 (trước khi tiêm). Chuột nhắt được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc thể hiện sự tăng trọng lượng cơ thể tiến triển và ổn định trong khoảng thời gian nghiên cứu là 7 ngày. Tuy nhiên, tốc độ tăng trọng lượng cơ thể được ức chế ở chuột nhắt được điều trị bằng Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) theo cách phụ thuộc liều. Liều càng cao, khả năng ức chế tăng trưởng càng dài hơn. Trong một ví dụ, Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) làm giảm sự tăng trọng lượng cơ thể trong 5 ngày ở liều là 3 mg/kg, 3 ngày ở liều là 1 mg/kg hoặc 1 ngày ở liều là 0,3 mg/kg. Tốc độ tăng trưởng được khôi phục sau đó. ED50 ước tính của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) đối với sự giảm trọng lượng cơ thể là khoảng 1 mg/kg trong thử nghiệm này.

23.5 So sánh hiệu quả của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) và Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) ở chuột nhắt DIO với các tần suất tiêm khác nhau

Nghiên cứu này nhằm xác định xem liệu Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) có thể được tiêm với tần suất thấp hơn so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) nhưng vẫn đạt được hiệu quả tương tự hay không. Nghiên cứu này được tiến hành ở chuột nhắt DIO với Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) được cho dùng một tuần một lần (Q7D) hoặc hai tuần

một lần (Q14D), hoặc Fc-L15-FGF21 (L98R, P171G) được cho dùng một tuần hai lần (BIW), Q7D hoặc Q14D.

Chuột nhắt DIO được chuẩn bị bằng cách cho chuột nhắt C57BL/6 đực 4 tuần tuổi ăn chế độ ăn có lượng chất béo cao chứa 60% năng lượng từ chất béo được làm giàu với các axit béo bão hòa (D12492, Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ). Sau 12 tuần ăn chế độ ăn có lượng chất béo cao, trọng lượng cơ thể và lượng glucoza trong máu được đo. Chuột nhắt DIO sau đó được phân ngẫu nhiên vào các nhóm môi trường dẫn thuốc hoặc nhóm điều trị để đạt được lượng glucoza trong máu và trọng lượng cơ thể trung bình ban đầu tương tự nhau. Tổng cộng 7 nhóm được bao gồm trong nghiên cứu: môi trường dẫn thuốc được sử dụng với tần suất Q7D; Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) được sử dụng với tần suất Q7D hoặc Q14D; hoặc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) được sử dụng với tần suất BIW, Q7D hoặc Q14D. Việc tiêm là theo đường trong màng bụng và nghiên cứu được tiến hành trong 31 ngày. Trọng lượng cơ thể được đo hằng tuần. GTT được tiến hành tại ngày nghiên cứu 28 và nghiên cứu được kết thúc vào ngày 31. Thiết kế nghiên cứu được thể hiện bằng sơ đồ trên Fig.54.

Fig.55 thể hiện profin GTT ở chuột nhắt được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc, Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) hoặc Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) ở các tần suất dùng liều khác nhau. Sự dung nạp glucoza được cải thiện một cách có ý nghĩa về mặt thống kê ở chuột nhắt được điều trị bằng Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) với tần suất dùng liều Q7D hoặc Q14D so với môi trường dẫn thuốc, gợi ý rằng Fc-(G4S)3-FGF21(L98R, P171G, A180E) có hiệu quả và thích hợp để dùng với tần suất Q14D ở chuột nhắt DIO. Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) cải thiện sự dung nạp glucoza khi được dùng với tần suất BIW hoặc Q7D, nhưng với tần suất Q14D thì không, gợi ý rằng Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) có thể là ít thích hợp để tiêm với tần suất Q14D ở chuột nhắt. Hiệu quả của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) với tần suất Q7D hoặc Q14D tương đương với hiệu quả của Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) với tần suất BIW hoặc Q7D, một cách tương ứng, gợi ý rằng Fc-(G4S)3-FGF21(L98R, P171G, A180E) có thể được cho dùng với tần suất thấp hơn 2 lần so với Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G).

Fig.56 thể hiện sự thay đổi trọng lượng cơ thể so với mức ban đầu (ngày 0) ở chuột nhắt được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc, Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E)

hoặc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) với các tần suất dùng liều khác nhau. Chuột nhắt được điều trị với tần suất Q7D bằng Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) giảm trọng lượng cơ thể đáng kể như chuột nhắt được điều trị với tần suất BIW bằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G). Trọng lượng cơ thể giảm vừa phải ở chuột nhắt được điều trị với tần suất Q14D bằng Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) hoặc với tần suất Q7D bằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G). Không quan sát thấy tác dụng đáng kể đối với trọng lượng cơ thể ở chuột nhắt được điều trị với tần suất Q14D bằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G). Tác dụng đối với trọng lượng cơ thể phù hợp với tác dụng đối với GTT được mô tả ở trên, gợi ý rằng Fc-(G4S)4-FGF21 (L98R, P171G, A180E) có hiệu quả với tần suất dùng liều Q14D và chỉ cần tiêm với tần suất thấp hơn khoảng 2 lần so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) để đạt được cùng tác dụng.

Ví dụ 24

Chế phẩm hydrogel chứa FGF21 đột biến

Với vai trò là tá dược bào chế dùng cho các chất trị liệu dựa trên cơ sở protein, hydrogel đem lại nhiều tính chất mong muốn. Ví dụ, hydrogel bảo toàn cấu trúc và chức năng nguyên gốc của protein được kết hợp trong hydrogel. Hơn nữa, chúng được dung nạp tốt, và tùy thuộc vào polyme và loại liên kết ngang, chúng có thể dễ bị phân hủy sinh học. Ngoài ra, hydrogel đã được sử dụng thành công trước đó để giải phóng protein theo cách duy trì liên tục. Do đó, hydrogel được nghiên cứu làm phương pháp đưa thuốc vào cơ thể khả thi đối với FGF21 đột biến được đề xuất trong bản mô tả này.

Đối với tất cả các thử nghiệm được mô tả trong ví dụ này, hydrogel được điều chế như sau. Dung dịch gelatin bò 1,25% (Sigma) trong PBS được điều chế. Chất liên kết ngang metacrylic anhydrit được thêm vào đến tỷ lệ mol (MA so với gelatin) là 16:1, 24:1 hoặc 32:1. Dung dịch tạo thành được thẩm tách bằng nước để loại bỏ bất kỳ metacrylamit chưa được polyme hóa bất kỳ để tạo ra môi trường dẫn thuốc hydrogel. Cuối cùng, môi trường dẫn thuốc hydrogel được làm đông khô và bảo quản ở 4°C cho đến khi sẵn sàng tạo thành hydrogel chứa FGF21 đột biến. Sản phẩm chuẩn bị này có thể được sử dụng để điều chế môi trường dẫn thuốc hydrogel dựa trên cơ sở gelatin mà có thể được điều chỉnh sau đó để chứa FGF21 đột biến bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này.

Hydrogel với các FGF21 đột biến cụ thể được tạo ra sau đó. Các dung dịch được điều chế bắt đầu với môi trường dẫn thuốc hydrogel metacrylic gelatin 10% đã được làm đông khô. Môi trường dẫn thuốc hydrogel này được làm ấm và sau đó được ly tâm để hòa tan và hóa lỏng môi trường dẫn thuốc hydrogel MA gelatin đã được làm đông khô. Protein FGF21 được chọn, (FGF21 (L98R, P171G), (SEQ ID NO:37)) trong ví dụ này), sau đó được thêm vào dung dịch gelatin đã được hóa lỏng đến nồng độ đã định trước. Sau đó, dung dịch gốc TEMED được thêm vào. Sau đó, dung dịch gốc KPS được thêm vào và dung dịch này được trộn nhẹ nhàng. Các ống tiêm loại 1 mL được nạp đầy đến 200 µL và được để trong 1,5 đến 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Các ống tiêm được bảo quản ở -20°C và được làm tan băng ở 4°C qua đêm trước khi sử dụng. Môi trường dẫn thuốc hydrogel chứa Tris 10 mM, sucroza 9%, độ pH=8,5 và không có FGF21 đột biến được thêm vào được sử dụng làm đối chứng.

Đối với các thử nghiệm *in vivo*, các ống tiêm được đặt lên tấm gia nhiệt ở 37°C trong khoảng 10 phút trước khi tiêm vào trong động vật.

24.1 Hoạt tính *in vitro* của FGF21 (L98R, P171G) được giải phóng từ hydrogel 10% với các tỷ lệ liên kết ngang khác nhau

Mục đích của thử nghiệm này là nhằm thử nghiệm xem liệu FGF21 (L98R, P171G) được giải phóng từ hydrogel có hoạt tính sinh học so với dạng nguyên gốc của FGF21 (L98R, P171G) trong thử nghiệm ELK-luxiferaza *in vitro* hay không.

FGF21 (L98R, P171G) được tạo ra và được kết hợp vào dung dịch metacrylic gelatin 10% với tỷ lệ liên kết ngang metacrylic gelatin là 16:1, 24:1 và 32:1 như đã được mô tả. Hydrogel sau đó được làm phân tán vào dung dịch đệm *in vitro* để cho phép giải phóng FGF21 (L98R, P171G). Môi trường được thu gom sau 100 hoặc 150 giờ và được đưa vào các thử nghiệm *in vitro* về hoạt tính FGF21 (L98R, P171G). Các thử nghiệm phân tích (ví dụ, SDS-PAGE, HPLC loại theo kích cỡ và HPLC pha đảo) cho thấy rằng FGF21 (L98R, P171G) được giải phóng là nguyên vẹn ở tất cả các thời điểm.

Các thử nghiệm ELK-luxiferaza được tiến hành bằng cách sử dụng hệ tế bào thận 293T tái tổ hợp của người, trong đó các tế bào 293T này biểu hiện quá mức các cấu trúc chỉ thị luxiferaza và β-Klotho. β-Klotho là đồng thụ thể cần thiết cho FGF21 để hoạt hóa thụ thể FGF của nó. Các thụ thể FGF được sử dụng trong thử nghiệm này là các thụ thể FGF nội sinh được

biểu hiện ở tế bào thận 293T. Các cấu trúc chỉ thị luxiferaza chứa các trình tự mã hóa GAL4-ELK1 và yếu tố chỉ thị luxiferaza được điều khiển bởi trình tự khởi đầu chứa năm bản sao nối tiếp của vị trí liên kết Gal4 (5xUAS-Luc). Hoạt tính luxiferaza được điều hòa bởi mức Erk/ELK1 đã được phosphoryl hoá, và được sử dụng để gián tiếp theo dõi và định lượng hoạt tính FGF21.

Các thử nghiệm ELK-luxiferaza được tiến hành bằng cách nuôi cấy tế bào 293T trong điều kiện có mặt các nồng độ khác nhau của dạng nguyên gốc của FGF21 (L98R, P171G) hoặc FGF21 (L98R, P171G) được giải phóng bởi hydrogel trong 6 giờ, và sau đó thử nghiệm dịch ly giải tế bào về hoạt tính luxiferaza. Fig.57 thể hiện kết quả *in vitro* từ thử nghiệm ELK-luxiferaza. FGF21 (L98R, P171G) được giải phóng từ hydrogel với tỷ lệ liên kết ngang metacrylic gelatin là 16:1, 24:1 và 32:1 có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của dạng nguyên gốc của FGF21 (L98R, P171G). Dữ liệu này chứng tỏ rằng hydrogel bảo toàn cấu trúc và chức năng của protein được kết hợp và FGF21 (L98R, P171G) được giải phóng có hoạt tính và ổn định thậm chí sau 10-15 giờ trong môi trường.

24.2 Hiệu quả *in vivo* của hydrogel FGF21 (L98R, P171G) ở các tỷ lệ liên kết ngang khác nhau ở chuột nhắt ob/ob

Mục đích của thử nghiệm này là nhằm xác định xem liệu FGF21 (L98R, P171G) hydrogel được tạo ra với tỷ lệ liên kết ngang metacrylic gelatin là 24:1 và 32:1 có tạo ra sự giải phóng duy trì liên tục của FGF21 (L98R, P171G) có hoạt tính sinh học *in vivo* và cuối cùng là dẫn đến hiệu quả *in vivo* lâu hơn so với dạng nguyên gốc của FGF21 (L98R, P171G) hay không. Ngoài ra, dựa trên đánh giá về tốc độ giải phóng *in vitro*, xác định được rằng tỷ lệ liên kết ngang cao hơn của metacrylic gelatin mang lại sự giải phóng duy trì liên tục tốt hơn cho FGF21 (L98R, P171G) được kết hợp. Do đó, mục đích khác của thử nghiệm này là nhằm so sánh hai hydrogel FGF21 (L98R, P171G) được tạo ra với tỷ lệ liên kết ngang metacrylic gelatin là 24:1 và 32:1.

FGF21 có một số hoạt tính sinh học, bao gồm khả năng làm giảm lượng glucoza, insulin, triglyxerit hoặc cholesterol trong máu; làm giảm trọng lượng cơ thể; hoặc cải thiện sự dung nạp glucoza, sự tiêu thụ năng lượng hoặc độ nhạy insulin. Các hydrogel FGF21 (L98R, P171G) được đưa vào chuột nhắt ob/ob kháng insulin, và khả năng của hydrogel FGF21

(L98R, P171G) trong việc làm giảm glucoza trong máu và làm giảm trọng lượng cơ thể được đo. Quy trình để thực hiện *in vivo* là như sau.

Các hydrogel được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình được mô tả ở trên. Chuột nhắt ob/ob 8 tuần tuổi (Jackson Laboratory) được cạo lông ở vị trí tiêm và được gây mê bằng isofluran và O_2 ngay trước khi tiêm. Hydrogel (0,2 mL) được tiêm từ từ dưới da và Vetbond được bôi ở vị trí tiêm sau khi tiêm. Môi trường dẫn thuốc (Tris 10 mM, sucroza 9%, độ pH=8,5) hoặc FGF21 (L98R, P171G) nguyên gốc cũng bao gồm trong thử nghiệm và được tiêm tương tự như hydrogel. Các con vật được đưa trở về lồng của chúng sau khi tỉnh dậy khỏi trạng thái mê. Các mẫu máu được thu trước khi tiêm và tại các thời điểm khác nhau sau khi tiêm, ví dụ, 0, 3, 6, 24, 72, 120, 192 và 264 giờ sau khi tiêm. Lượng glucoza trong máu được đo bằng thiết bị OneTouch Glucometer (LifeScan, Inc. Milpitas, CA). Trọng lượng cơ thể cũng được theo dõi.

Các Fig.58 và 59 tổng kết các kết quả của thử nghiệm. So với môi trường dẫn thuốc hoặc hydrogel đối chứng, dạng nguyên gốc của FGF21 (L98R, P171G) làm giảm lượng glucoza trong máu nhanh tại thời điểm 3 và 6 giờ sau khi tiêm. Tuy nhiên, hoạt tính *in vivo* của dạng nguyên gốc của FGF21 (L98R, P171G) bị suy yếu và lượng glucoza trong máu trở về mức ban đầu 24 giờ sau khi tiêm. FGF21 (L98R, P171G) hydrogel làm giảm glucoza trong máu sớm tại thời điểm 3 giờ sau khi tiêm và hoạt tính này được duy trì lên đến 8 ngày. Không có sự khác biệt đáng kể giữa các tỷ lệ liên kết ngang ở 24:1 hoặc 32:1. Các nhóm FGF21 (L98R, P171G) hydrogel cũng thể hiện sự tăng trọng lượng cơ thể chậm hơn so với chuột nhắt chỉ được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc hoặc hydrogel đơn lẻ. Các kết quả này chứng tỏ rằng FGF21 (L98R, P171G) hydrogel được tạo ra với tỷ lệ liên kết ngang metacrylic gelatin là 24:1 và 32:1 có khả năng tạo ra sự giải phóng duy trì liên tục của FGF21 (L98R, P171G) có hoạt tính sinh học *in vivo* và cuối cùng là dẫn đến hiệu quả *in vivo* lâu hơn so với dạng nguyên gốc của FGF21 (L98R, P171G).

24.3 Hiệu quả *in vivo* của hydrogel FGF21 (L98R, P171G) và FGF21 (L98R, P171G, A180E) ở các tỷ lệ liên kết ngang khác nhau ở chuột nhắt db/B6

Các chế phẩm hydrogel được tạo ra bằng cách sử dụng gelatin bò (Sigma) và một số cấu trúc và thể đột biến FGF21, cụ thể là FGF21 (L98R, P171G) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R,

P171G, A180E). Hydrogel đối chứng cũng được tạo ra. 0,2 mL hydrogel được đặt trong ống tiêm loại 1 mL có kim tiêm loại 21G.

Các hydrogel đối chứng và hydrogel chứa FGF21 đột biến được tạo ra như được mô tả ở trên. Chuột nhắt db/B6 8 tuần tuổi (Jackson Laboratory) được cạo lông ở vị trí tiêm và được gây mê bằng isofluran và O_2 ngay trước khi tiêm. Hydrogel (0,2 mL) được tiêm từ từ dưới da và Vetbond được bôi ở vị trí tiêm sau khi tiêm. Môi trường dẫn thuốc (Tris 10 mM, sucroza 9%, độ pH=8,5) hoặc FGF21 (L98R, P171G) nguyên gốc cũng bao gồm trong thử nghiệm và được tiêm tương tự như hydrogel. Các con vật được đưa trở về lồng của chúng sau khi tỉnh dậy khỏi trạng thái mê. Các mẫu máu được thu trước khi tiêm và tại các thời điểm khác nhau sau khi tiêm, ví dụ, 0, 24, 96, 168, 240, 312 giờ sau khi tiêm. Lượng glucoza trong máu được đo bằng thiết bị OneTouch Glucometer (LifeScan, Inc. Milpitas, CA). Trọng lượng cơ thể cũng được theo dõi.

Thiết kế thử nghiệm là như sau:

Nhóm động vật (n=9 mỗi nhóm)

A.	Hydrogel đối chứng 32:1 (10%) MA:HU4	200 µL
B.	FGF21 (L98R, P171G) hydrogel 32:1 (10%) MA:HU4	0,5 mg/chuột nhắt (200 µL, ~ 10 mg/kg)
C.	FGF21 (L98R, P171G) hydrogel 32:1 (10%) MA:HU4	1,5 mg/chuột nhắt (200 µL, ~ 30 mg/kg)
D.	Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E)	(không hydrogel) 3 mg/kg

Các thông số khác nhau được đo và các kết quả của thử nghiệm được thể hiện trên các Fig.60-63. Fig.60 thể hiện sự thay đổi glucoza trong máu trong khoảng thời gian thử nghiệm 14 ngày, trong khi đó Fig.61 thể hiện % thay đổi của glucoza trong máu trong cùng khoảng thời gian. Fig.62 thể hiện sự thay đổi trọng lượng cơ thể trong khoảng thời gian thử nghiệm 14 ngày, trong khi đó Fig.63 thể hiện % thay đổi của trọng lượng cơ thể trong cùng khoảng thời gian.

Các kết quả thử nghiệm được thể hiện dưới dạng đồ thị trên các Fig.60-63 có thể được tổng kết như sau:

FGF21 (L98R, P171G) 32:1(10%)MA:HU4 ở liều 10 mg/kg có hiệu quả trong việc làm giảm glucoza trong máu tại thời điểm 24 giờ sau khi tiêm và lượng glucoza trong máu trở về mức ban đầu trong 4-7 ngày.

FGF21 (L98R, P171G) 32:1(10%)MA:HU4 ở liều 30 mg/kg có hiệu quả hơn trong việc làm giảm glucoza trong máu so với liều 10 mg/kg, và lượng glucoza trong máu được thấy là trở lại mức ban đầu trong 7-10 ngày.

Fc-(G4S)3-FGF21(L98R, P171G, A180E) ở liều 3 mg/kg bản thân nó làm giảm glucoza trong máu tại thời điểm 24 giờ sau khi tiêm đến mức độ tương tự với FGF21 (L98R, P171G) ở liều 30 mg/kg từ hydrogel.

Hydrogel đối chứng (không chứa FGF21 đột biến) không có bất kỳ tác dụng nào trong việc làm giảm glucoza trong máu.

Các nhóm FGF21 (L98R, P171G) hydrogel và Fc-(G4S)3-FGF21(L98R, P171G, A180E) (không được đưa vào trong hydrogel) thể hiện sự tăng trọng lượng cơ thể giảm đi so với chuột nhắt được điều trị bằng hydrogel đối chứng.

Ví dụ 25

Nghiên cứu trên khỉ cynomolgus

Hai cấu trúc Fc-nhóm liên kết-FGF21 được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp nêu trong bản mô tả này. Một cấu trúc chứa trình tự IgG1 Fc (SEQ ID NO:11) được dung hợp ở đầu C với trình tự liên kết $(Gly)_5$-Ser-$(Gly)_3$-Ser-$(Gly)_4$-Ser (SEQ ID NO:28) mà sau đó được dung hợp với đầu N của trình tự FGF21 trưởng thành (SEQ ID NO:4), mà hai đột biến, L98R và P171G, được đưa vào đó. Phân tử này được gọi trong ví dụ này là "Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)" (SEQ ID NO:43). Cấu trúc thứ hai chứa trình tự IgG1 Fc (SEQ ID NO:11) được dung hợp ở đầu C với trình tự liên kết $(Gly)_4$-Ser-$(Gly)_4$-Ser-$(Gly)_4$-Ser (SEQ ID NO:31) mà sau đó được dung hợp với đầu N của trình tự FGF21 trưởng thành (SEQ ID NO:4), mà ba đột biến, L98R, P171G và A180E, được đưa vào đó. Phân tử này được gọi trong ví dụ này là "Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E)" (SEQ ID NO:47). Các cấu trúc này sau đó được biểu

hiện và được tinh chế như được nêu trong bản mô tả này, và được phân lập dưới dạng dime của protein, mỗi monome của nó được liên kết thông qua liên kết disulfua liên phân tử giữa vùng Fc của mỗi monome.

25.1 Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu này được tiến hành ở khỉ cynomolgus có đặc tính dung nạp glucoza bị suy yếu (IGT). Các con khỉ này từ 8 đến 18 năm tuổi. Trọng lượng cơ thể của chúng nằm trong khoảng từ 5-15 kg và BMI nằm trong khoảng từ 32-70 kg/m^2. 44 con khỉ được làm thích nghi với môi trường trong 6 tuần trước khi bắt đầu cho dùng hợp chất. Trong giai đoạn thích nghi với môi trường, các con khỉ được huấn luyện 4 lần một tuần trong 4 tuần để quen với các thủ tục bao gồm giữ trên ghế, tiêm dưới da (PBS, 0,1 mL/kg), đưa thức ăn qua ống (nước, 10 mL/kg), lấy máu để thu các mẫu không OGTT và OGTT. Sau 4 tuần huấn luyện, các thông số chuyển hóa trong huyết tương và OGTT ban đầu được đo. 40 trong số 44 con khỉ được chọn và được phân ngẫu nhiên vào ba nhóm điều trị để đạt được mức ban đầu tương tự về trọng lượng cơ thể, đáp ứng AUC trong OGTT và lượng glucoza và triglyxerit trong huyết tương.

Nghiên cứu này được tiến hành theo kiểu mù thí nghiệm. Môi trường dẫn thuốc (n=14), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (n=13) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (n=13) được đánh dấu là hợp chất A, B và C và được cho dùng một lần một tuần bằng cách tiêm dưới da. Các hợp chất được cho dùng theo kiểu tăng liều từ mức thấp (0,3 mg/kg), trung bình (1 mg/kg) đến cao (3 mg/kg) và liều được tăng lên ba tuần một lần. Sau 9 tuần điều trị bằng hợp chất, các con vật được theo dõi trong 3 tuần nữa để đào thải hợp chất và phục hồi sau khi điều trị. Sự hấp thu thức ăn, trọng lượng cơ thể, hóa học lâm sàng và OGTT được theo dõi trong suốt nghiên cứu. Sự hấp thu thức ăn được đo mỗi bữa ăn. Trọng lượng cơ thể được đo hằng tuần. Các mẫu máu được lấy hằng tuần tại thời điểm 5 ngày sau mỗi lần tiêm để đo glucoza, triglyxerit, tổng cholesterol, lượng HDL-cholesterol và LDL-cholesterol. OGTT được tiến hành ba tuần một lần sau khi bắt đầu điều trị (khi kết thúc mỗi mức liều). Ngày bắt đầu điều trị được ký hiệu là 0 và kế hoạch nghiên cứu chi tiết được thể hiện trên Fig.64.

Các kết quả được thể hiện trong ví dụ này là dữ liệu thu được khi kết thúc 9 tuần điều trị.

25.2 Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đối với sự hấp thu thức ăn

Các con vật được cho ăn hai lần mỗi ngày, trong đó mỗi con vật tiếp nhận 120 g thức ăn công thức được thiết lập trong giai đoạn thích nghi với môi trường. Thức ăn thừa lại được loại bỏ và được cân sau mỗi bữa ăn để tính toán sự hấp thu thức ăn. Thời gian cho ăn là từ 8:00 AM đến 8:30 AM (±30 phút) và sau đó từ 4:30 PM đến 5:00 PM (±30 phút). Để tạo bữa ăn vặt, táo (150 g) được cung cấp cho mỗi con vật ở 11:30 đến 12:30 PM (±30 phút) mỗi ngày.

So với môi trường dẫn thuốc, cả Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) đều làm giảm sự hấp thu thức ăn ở các con khỉ (các Fig.65, 66 và 67). Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) ức chế sự hấp thu thức ăn ở mọi bữa ăn bao gồm các bữa ăn buổi sáng, hoa quả và buổi chiều ở liều 0,3 mg/kg. Tuy nhiên, tác dụng này giảm đi và sự hấp thu thức ăn trở lại gần với mức ban đầu hoặc mức đối chứng sau khoảng 30 ngày điều trị khi liều được tăng đến 1 mg/kg. Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) không có tác dụng đáng kể đối với sự hấp thu thức ăn buổi sáng và chỉ làm giảm vừa phải sự hấp thu thức ăn ở bữa ăn buổi chiều khi liều được tăng đến 1 và 3 mg/kg. Tuy nhiên, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) làm giảm sự hấp thu hoa quả tương tự như Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E). Nhìn chung, Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) thể hiện tác dụng mạnh hơn trong việc ức chế sự hấp thu thức ăn so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G). Tác dụng đối với sự hấp thu thức ăn có vẻ là ngắn hạn và sự hấp thu thức ăn được khôi phục sau khoảng 30 ngày điều trị.

25.3. Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đối với trọng lượng cơ thể

Trọng lượng cơ thể được theo dõi hằng tuần trong suốt nghiên cứu. Trong khoảng thời gian 9 tuần điều trị, trọng lượng cơ thể của các con vật được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc vẫn không đổi, trong khi đó trọng lượng cơ thể của các con vật được điều trị bằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) giảm dần. Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) dẫn đến trọng lượng cơ thể giảm đi rõ ràng hơn so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G), như được thể hiện trên Fig.68.

25.4. Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đối với chỉ số khối lượng cơ thể (BMI), độ dày nếp da (SFT) và vòng bụng (AC)

BMI, SFT và AC được theo dõi hằng tuần trong suốt nghiên cứu, cả trước và sau khi dùng hợp chất thử nghiệm khi trọng lượng cơ thể được ghi lại. BMI được định nghĩa là trọng

lượng cơ thể của cá thể chia cho bình phương của chiều cao. SFT là độ dày của lớp kép của da và mỡ bên dưới nó với kích cỡ đặc biệt mà tạo ra sức căng ổn định trên vị trí này. BMI, SFT và AC là các đại lượng đo tương đối chính xác, đơn giản và không đắt tiền về thành phần cơ thể, đặc biệt cho biết lượng mỡ dưới da. Các con vật được điều trị bằng môi trường dẫn thuốc thể hiện BMI, SFT và AC tương đối ổn định trong suốt nghiên cứu. Các con vật được điều trị bằng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) thể hiện mức giảm của BMI, SFT và AC trong khoảng thời gian 9 tuần nghiên cứu, cho thấy rằng cả hai hợp chất này đều làm giảm khối lượng mỡ. Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) có hiệu quả hơn và dẫn đến sự giảm rõ ràng hơn ở BMI, SFT và AC so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G). Các kết quả được thể hiện trên các Fig.69, 70 và 71 một cách tương ứng.

25.5 Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đối với lượng glucoza trong máu lúc đói

Máu được lấy từ các con vật bị bỏ đói qua đêm. Máu được lấy hằng tuần tại thời điểm 5 ngày sau mỗi lần tiêm. Cả Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) đều làm giảm lượng glucoza trong máu lúc đói. Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) làm giảm lượng glucoza trong máu lúc đói ở liều 0,3 mg/kg và sự giảm glucoza lớn nhất đạt được khi liều được tăng đến 1 mg/kg. Tuy nhiên, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) chỉ làm giảm vừa phải lượng glucoza trong máu ở liều cao nhất được thử nghiệm (3 mg/kg). Do đó, Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) có hiệu quả hơn và gây ra sự giảm glucoza trong máu rõ ràng hơn so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G). Không quan sát thấy chứng giảm glucoza-huyết ở bất kỳ con khỉ nào được điều trị bằng Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) hoặc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G). Fig.72 thể hiện lượng glucoza trong huyết tương lúc đói trong quá trình nghiên cứu.

25.6 Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đối với thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng (OGTT)

Các OGTT được tiến hành trước và sau khi bắt đầu điều trị. Các OGTT sau khi dùng thuốc được tiến hành ba tuần một lần để thử nghiệm tác dụng của hợp chất ở mỗi mức liều. Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) cải thiện sự dung nạp glucoza ở tất cả các liều được thử nghiệm từ 0,3 đến 3 mg/kg. Lượng glucoza giảm đi và sự dao động glucoza sau liều

glucoza thử thách tăng lên để đáp lại việc điều trị bằng Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E). Không quan sát thấy sự đáp ứng liều, gợi ý rằng Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) đạt được tác dụng cao nhất của nó ở liều 0,3 mg/kg. Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) chỉ cải thiện sự dung nạp glucoza ở liều 1 mg/kg và không rõ là tại sao tác dụng này mất đi khi liều được tăng đến 3 mg/kg. Fig.73 thể hiện profin đường cong trước và sau OGTT và diện tích dưới đường cong OGTT.

25.7 Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đối với lượng triglyxerit

Máu được lấy từ các con vật bị bỏ đói qua đêm. Máu được lấy hằng tuần tại thời điểm 5 ngày sau mỗi lần tiêm. Lượng triglyxerit giảm đáng kể ở các con vật được điều trị bằng Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) hoặc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G). Tuy nhiên, Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) có tác dụng hơn so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G). Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) làm giảm lượng triglyxerit trong huyết tương lớn nhất ở liều 0,3 mg/kg, trong khi đó Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) chỉ làm giảm lượng triglyxerit ở mức trung bình với liều cao nhất được thử nghiệm (3 mg/kg). Fig.74 thể hiện lượng triglyxerit trong huyết tương lúc đói trong quá trình nghiên cứu.

25.8 Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đối với lượng tổng cholesterol và HDL-cholesterol

Máu được lấy từ các con vật bị bỏ đói qua đêm. Máu được lấy hằng tuần tại thời điểm 5 ngày sau mỗi lần tiêm. Lượng tổng cholesterol và HDL-cholesterol trong huyết tương có xu hướng tăng lên sau khi điều trị bằng Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) hoặc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G). Các Fig.75 và 76 thể hiện lượng tổng cholesterol và HDL-cholesterol trong quá trình nghiên cứu.

25.9 Kết luận

Trong nghiên cứu tăng liều được tiến hành ở khỉ cynomolgus IGT đực, các con vật được điều trị bằng các FGF21 đột biến liên hợp với Fc, cụ thể là Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G), thể hiện các thông số chuyển hóa cải thiện. Trọng lượng cơ thể được làm giảm và thành phần cơ thể được cải thiện. Sự giảm hấp thu thức ăn ngắn hạn được quan sát thấy và sự hấp thu thức ăn được khôi phục đến mức ban đầu hoặc mức đối chứng giữa quá trình nghiên cứu. Lượng glucoza và triglyxerit trong máu

lúc đói cũng được làm giảm bởi cả hai hợp chất, Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) hoặc Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G). OGTT được cải thiện và lượng HDL-cholesterol được làm tăng nhẹ. So với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G), Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) có vẻ tốt hơn so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) ở tất cả các thông số được đo ở liều được thử nghiệm bất kỳ. Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) đạt được tác dụng lớn nhất của nó đối với hầu hết các thông số được đo khi được dùng ở liều 0,3 mg/kg. Do đó, liều có hiệu quả trị liệu của Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E) ở loài bậc cao có thể là nhỏ hơn 0,3 mg/kg.

Ví dụ 26

Nghiên cứu độ ổn định ở khỉ cynomolgus

Nghiên cứu này được thiết kế để xác định xem liệu Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:57) có khả năng kháng proteaza hơn so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) hay không. Quan sát thấy sự xử lý đầu carboxy sau khi tiêm Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) vào chuột nhắt hoặc khỉ như được thể hiện trong ví dụ 21. Sự phân hủy dẫn đến việc mất liên tiếp từ 1 tới 3 gốc axit amin khỏi đầu C. Các cố gắng bằng cách chụp mũ vào đầu C hoặc đưa thêm đột biến vào đầu C của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) tạo ra phân tử Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) tốt hơn. Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá xem liệu Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) có cải thiện độ ổn định *in vivo* hơn so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) hay không.

Các cấu trúc Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) được tạo ra. Các cấu trúc này chứa trình tự IgG1 Fc (SEQ ID NO:11) được dung hợp ở đầu C với trình tự liên kết (Gly)5-Ser-(Gly)3-Ser-(Gly)4-Ser (SEQ ID NO:28) mà sau đó được dung hợp với đầu N của trình tự FGF21 trưởng thành (SEQ ID NO:4), mà hai đột biến, L98R, P171G, hoặc ba đột biến, L98R, P171G và A180E, được đưa vào đó. Các cấu trúc này sau đó được biểu hiện và được tinh chế như được nêu trong bản mô tả này, và được phân lập dưới dạng dime của protein, mỗi monome của nó được liên kết thông qua liên kết disulfua liên phân tử giữa vùng Fc của mỗi monome.

Độ ổn định *in vivo* của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) được so sánh ở các con khỉ cynomolgus đực. Fc-(L15)-FGF21 (L98R,

P171G) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) được tiêm qua đường tĩnh mạch vào các con khỉ cynomolgus với liều 23,5 mg/kg. Các mẫu máu được thu tại các thời điểm khác nhau sau một lần tiêm đơn lẻ qua tĩnh mạch. Kỹ thuật khối phổ MALDI-TOF-ái lực miễn dịch được sử dụng để theo dõi các chất chuyển hoá tại mỗi thời điểm sau khi tiêm. Kết quả được thể hiện trên Fig.77.

So với Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G), Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) thể hiện sự phân hủy đầu C giảm đáng kể với ít đỉnh khối lượng có thể phát hiện được liền kề với đỉnh ban đầu của phân tử nguyên vẹn hơn, gợi ý rằng đột biến A180E làm chậm sự phân hủy peptidaza đầu C. Các phần cắt cụt lớn hơn với sự mất khối lượng được ước tính là [1-376], [1-394] và [1-401] cũng được quan sát thấy và các vị trí này tương ứng với 133-134, 153-154 và 158-159 trong trình tự polypeptit FGF21. Việc chia cắt endopeptidaza bên trong góp phần vào quá trình chuyển hóa tổng thể của cả Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E), và đột biến A180E có vẻ không ảnh hưởng đáng kể đến tốc độ phân hủy endopeptidaza bên trong.

Để làm tăng độ phân giải và cung cấp chi tiết về hỗn hợp phân hủy, kỹ thuật khối phổ LC-MS MRM (theo dõi nhiều phản ứng) cũng được tiến hành để theo dõi các dạng khác nhau của các mảnh phân hủy đầu C. Các mẫu thu được từ các con khỉ được tinh chế dựa vào ái lực và sau đó được phân giải bằng Asp-N. Các peptit được phân giải đầu C sau đó được theo dõi bằng MRM. Kết quả của các dạng khác nhau của các mảnh phân hủy đầu C được biểu diễn dưới dạng lượng tương đối cho loại peptit nguyên chiều dài (%) được thể hiện trên Fig.78. Phù hợp với phổ MALDI, kết quả phân tích bán định lượng MRM của các mảnh đầu C cũng thể hiện lượng tương đối giảm của các mảnh peptit bị mất từ 1 đến 3 axit amin ở đầu C và lượng tương đối tăng của phân tử nguyên vẹn ở khỉ được cho dùng Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G).

Tóm lại, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) thể hiện sự phân hủy đầu C giảm và độ ổn định *in vivo* tăng so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) ở khỉ cynomolgus.

Ví dụ 27

Dược động học của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) ở chuột nhắt

Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá dược động học của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) (SEQ ID NO:57) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (SEQ ID NO:43) sau một liều tiêm đơn lẻ qua tĩnh mạch cho các con chuột nhắt C57BL/6 đực.

Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) được cho dùng với liều 20 mg/kg bằng cách tiêm qua tĩnh mạch. Các mẫu máu được thu tại các thời điểm 0,083 (5 phút), 1, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 168 và 240 giờ sau khi tiêm. Để xác định nồng độ trong huyết tương của phân tử nguyên chiều dài nguyên vẹn, thử nghiệm ELISA với khả năng phản ứng miễn dịch nhắm tới đầu N và đầu C của FGF21 được tiến hành. Thử nghiệm này theo dõi phân tử nguyên vẹn nguyên chiều dài có độ nhiễm tạp chất không đáng kể từ các sản phẩm phân hủy khác. Nồng độ trong huyết tương của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) và Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) nguyên vẹn trong khoảng thời gian 240 giờ sau khi tiêm tĩnh mạch ở chuột nhắt được thể hiện trên Fig.79.

Nồng độ trong huyết tương của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) cao hơn đáng kể so với của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) được dùng ở cùng mức liều tại thời điểm từ 24 đến 168 giờ sau khi tiêm. Có thể đo được lượng đáng kể của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) tại thời điểm 168 giờ sau khi tiêm ở chuột nhắt. Do đó, Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) thể hiện độ phủ AUC và thời gian bán hủy tuần hoàn trong huyết thương tăng 2 lần so với Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) ở chuột nhắt. Thời gian bán hủy của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) là 16,6 giờ và của Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) là 9,4 giờ. Cả hai hợp chất này đều thấp hơn mức có thể phát hiện được tại thời điểm 240 giờ sau khi dùng thuốc.

Ví dụ 28

Tạo thể đột biến glycosyl hoá liên kết N để cải thiện độ hòa tan hoặc làm giảm sự chia cắt đầu C nhằm làm tăng thời gian bán hủy

Các FGF21 đột biến được thiết kế và được tạo ra để tạo các vị trí glycosyl hoá liên kết N tiềm năng để biểu hiện ở động vật có vú với sự phá vỡ tối thiểu đối với trình tự axit amin nguyên vẹn. Các thể đột biến được tạo cấu trúc bao gồm FGF21 (Y179N, S181T) (SEQ ID NO:161), FGF21 Y179N (SEQ ID NO:163) và FGF21 P124S (SEQ ID NO:165).

Sự biểu hiện của các thể đột biến được thực hiện theo cách tạm thời ở các tế bào 293-6E và các môi trường chứa chất tiết được thử nghiệm về hoạt tính trong thử nghiệm ELK-luxiferaza *in vitro*. Các thử nghiệm ELK-luxiferaza được tiến hành như được mô tả trong ví dụ 4, ngoại trừ việc sử dụng các dịch pha loãng theo dãy của các môi trường chứa chất tiết thay cho các nồng độ khác nhau của các protein đã được tinh chế.

Phân tích các môi trường chứa chất tiết cho thấy rằng không đạt được sự glycosyl hoá tăng so với kiểu dại ở hệ biểu hiện tạm thời. Fig.80 thể hiện kết quả của thử nghiệm hoạt tính ELK-luxiferaza. Các kết quả được thể hiện trên Fig.80 chứng tỏ rằng thể đột biến FGF21 P124S không gây ảnh hưởng bất lợi đến hoạt tính FGF21, nhưng các thể đột biến FGF21 Y179N và FGF21 (Y179N, S181T), khi không diễn ra quá trình glycosyl hoá, làm giảm hoạt tính như được thử nghiệm trong thử nghiệm ELK-luxiferaza.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả bằng các phương án khác nhau, nhưng cần hiểu rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể thực hiện các sửa đổi và cải biến. Do đó, dự định là các yêu cầu bảo hộ bao hàm tất cả các biến thể tương đương như vậy, mà đều thuộc phạm vi của sáng chế được yêu cầu bảo hộ. Ngoài ra, các đề mục được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích xây dựng cấu trúc và không được hiểu là làm giới hạn đối tượng được mô tả.

Tất cả các tài liệu tham khảo được nêu trong bản mô tả này được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn cho mục đích bất kỳ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit dung hợp chứa:

(a) trình tự axit amin SEQ ID NO:4, trong đó trình tự axit amin này còn chứa:

(i) cải biến thế alanin ở vị trí 180 thành axit glutamic, và

(ii) cải biến thế prolin ở vị trí 171 thành glyxin, và

(iii) cải biến thế leuxin ở vị trí 98 thành arginin; và

(b) trình tự axit amin khác loại.

2. Polypeptit dung hợp theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin khác loại là miền Fc hoặc mảnh của nó.

3. Polypeptit dung hợp theo điểm 2, trong đó miền Fc chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:11.

4. Polypeptit dung hợp theo điểm 1, trong đó polypeptit dung hợp này còn chứa nhóm liên kết giữa (a) và (b).

5. Polypeptit dung hợp theo điểm 4, trong đó nhóm liên kết chứa GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:31).

6. Polypeptit dung hợp theo điểm 4, trong đó nhóm liên kết chứa GGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:28).

7. Polypeptit dung hợp theo điểm 1, trong đó polypeptit dung hợp này chứa trình tự axit amin giống ít nhất là 95% với SEQ ID NO:47.

8. Polypeptit dung hợp theo điểm 7, trong đó polypeptit dung hợp này chứa trình tự SEQ ID NO:47.

9. Multime chứa hai hoặc nhiều polypeptit dung hợp theo điểm 7.

10. Dược phẩm chứa polypeptit dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và tá dược bào chế dược dụng.

11. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó tá dược bào chế dược dụng là hydrogel.

12. Polypeptit dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó polypeptit dung hợp này được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều polyme.

13. Polypeptit dung hợp theo điểm 12, trong đó polyme là PEG.

14. Axit nucleic mã hóa polypeptit dung hợp chứa (a) trình tự axit amin SEQ ID NO:4, trong đó trình tự axit amin này còn chứa chứa cải biến thế alanin ở vị trí 180 thành axit glutamic, cải biến thế prolin ở vị trí 171 thành glyxin và cải biến thế leuxin ở vị trí 98 thành arginin; và (b) trình tự axit amin khác loại.

15. Axit nucleic theo điểm 14, trong đó axit nucleic này mã hóa polypeptit dung hợp mà còn chứa nhóm liên kết giữa (a) và (b).

16. Axit nucleic theo điểm 15, trong đó nhóm liên kết chứa GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:31).

17. Axit nucleic theo điểm 15, trong đó nhóm liên kết chứa GGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:28).

18. Vectơ chứa axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17.

19. Tế bào chủ chứa vectơ theo điểm 18.

20. Axit nucleic mã hóa polypeptit SEQ ID NO:47.

21. Axit nucleic chứa SEQ ID NO:46.

22. Multime chứa ít nhất là chuỗi thứ nhất và chuỗi thứ hai, trong đó chuỗi thứ nhất chứa: (a.1) polypeptit SEQ ID NO:4, trong đó (i) leuxin ở vị trí 98 được thế bằng arginin, (ii) prolin ở vị trí 171 được thế bằng glyxin và (iii) alanin ở vị trí 180 được thế bằng axit glutamic; và (b.1) trình tự axit amin khác loại; và chuỗi thứ hai chứa: (a.2) polypeptit SEQ ID NO:4, trong đó (i) leuxin ở vị trí 98 được thế bằng arginin, (ii) prolin ở vị trí 171 được thế bằng glyxin và (iii) alanin ở vị trí 180 được thế bằng axit glutamic; và (b.2) trình tự axit amin khác loại.

23. Multime theo điểm 22, trong đó multime này còn chứa nhóm liên kết giữa (a) và (b).

24. Multime theo điểm 23, trong đó nhóm liên kết chứa GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:31).

25. Multime theo điểm 23, trong đó nhóm liên kết chứa GGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:28).

26. Multime theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 22 đến 25, trong đó trình tự axit amin khác loại là miền Fc hoặc mảnh của nó.

27. Multime theo điểm 26, trong đó miền Fc chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:11.

28. Multime theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 22 đến 27, trong đó multime này là dime.

29. Dime như được đề cập trong điểm 28, trong đó chuỗi thứ nhất chứa trình tự SEQ ID NO:47 và chuỗi thứ hai chứa trình tự SEQ ID NO:47.

30. Dược phẩm chứa dime theo điểm 28 và tá dược bào chế dược dụng.

31. Dược phẩm theo điểm 30, trong đó tá dược bào chế dược dụng là hydrogel.

32. Dime như được đề cập trong điểm 28, trong đó polypeptit được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều polyme.

33. Dime theo điểm 32, trong đó polyme là PEG.

34. Dime chứa chuỗi thứ nhất và chuỗi thứ hai, trong đó chuỗi thứ nhất được mã hóa bởi trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO:46 và chuỗi thứ hai được mã hóa bởi trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO:46.

35. Dime theo điểm 34, trong đó chuỗi thứ nhất được mã hóa bởi phân tử axit nucleic chứa SEQ ID NO:46 và chuỗi thứ hai được mã hóa bởi phân tử axit nucleic chứa SEQ ID NO:46.

36. Vectơ chứa phân tử axit nucleic theo điểm 35.

37. Tế bào chủ chứa vectơ theo điểm 36.

FIG. 1A

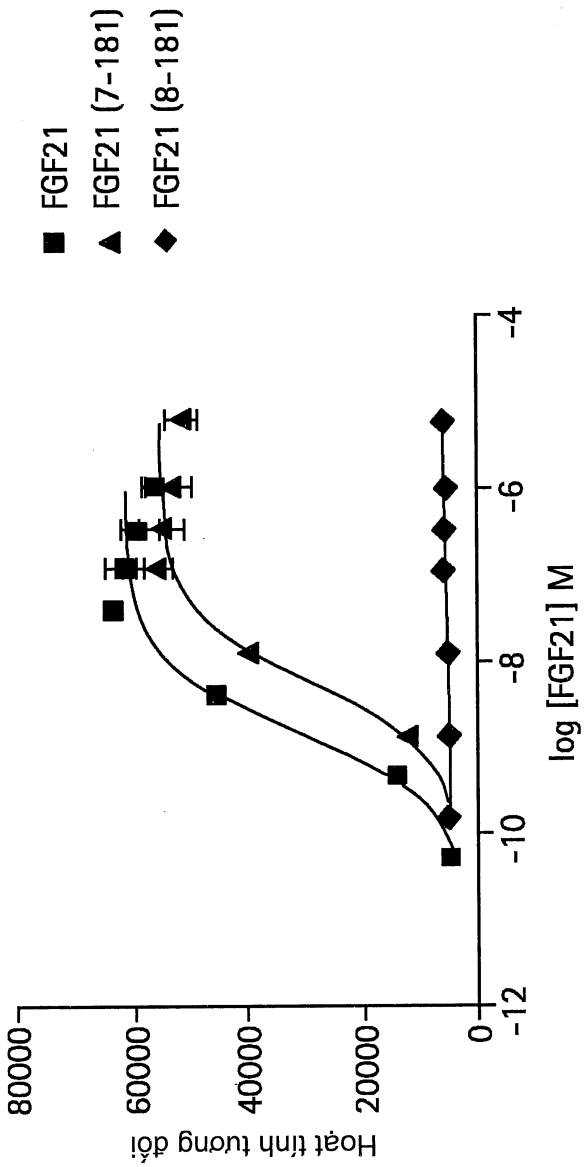

FGF21
FGF21 (7-181)
FGF21 (8-181)
Hoạt tính tương đối
80000
60000
40000
20000
0
-12
-10
-8
-6
-4
log [FGF21] M

FIG. 1B

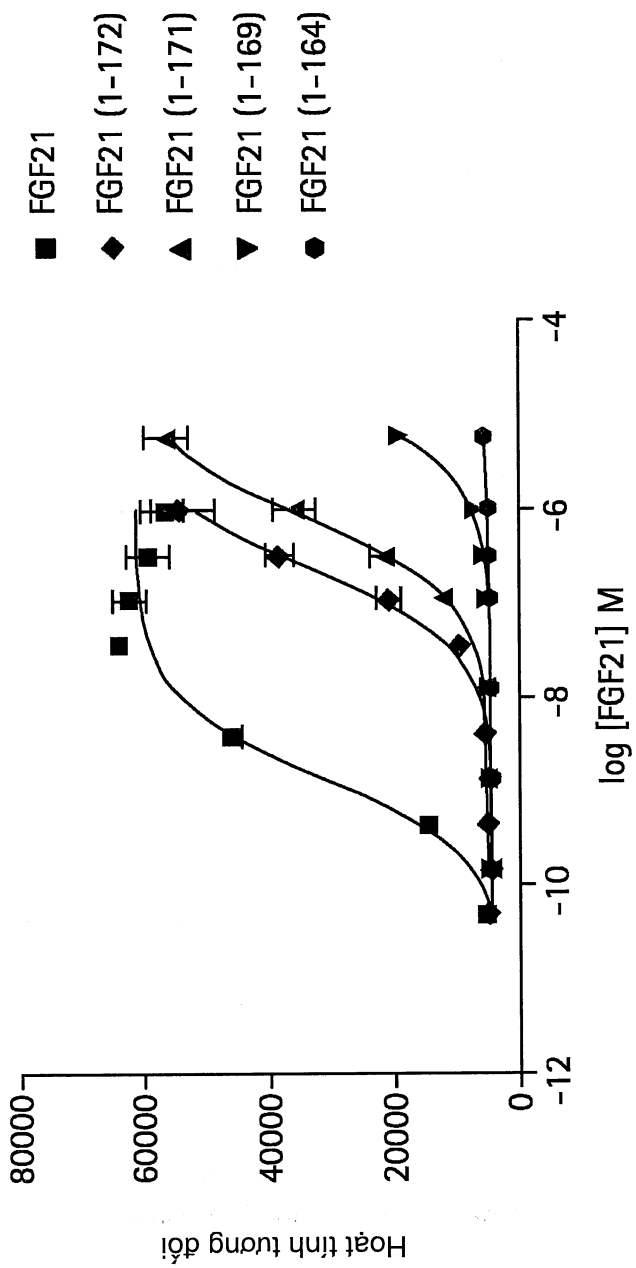

FGF21
FGF21 (1-172)
FGF21 (1-171)
FGF21 (1-169)
FGF21 (1-164)
Hoạt tính tương đối
80000
60000
40000
20000
0
-12
-10
-8
-6
-4
log [FGF21] M

FIG. 2

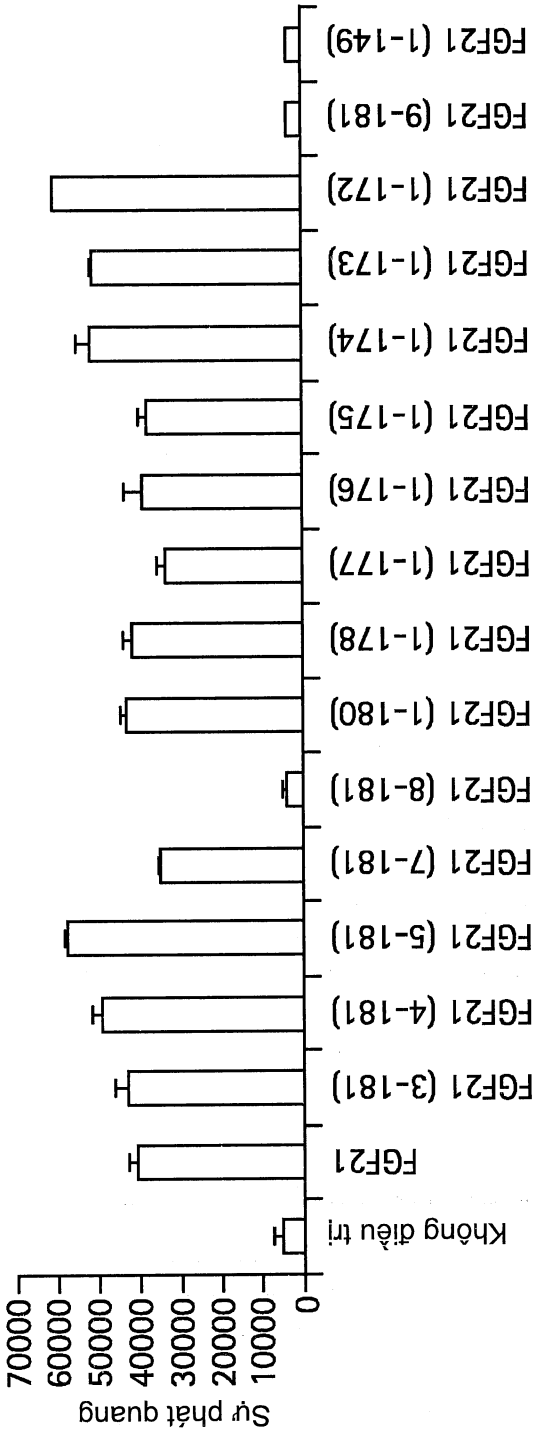

Sự phát quang
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Không điều trị
FGF21
FGF21 (3-181)
FGF21 (4-181)
FGF21 (5-181)
FGF21 (7-181)
FGF21 (8-181)
FGF21 (1-180)
FGF21 (1-178)
FGF21 (1-177)
FGF21 (1-176)
FGF21 (1-175)
FGF21 (1-174)
FGF21 (1-173)
FGF21 (1-172)
FGF21 (9-181)
FGF21 (1-149)

FIG. 3

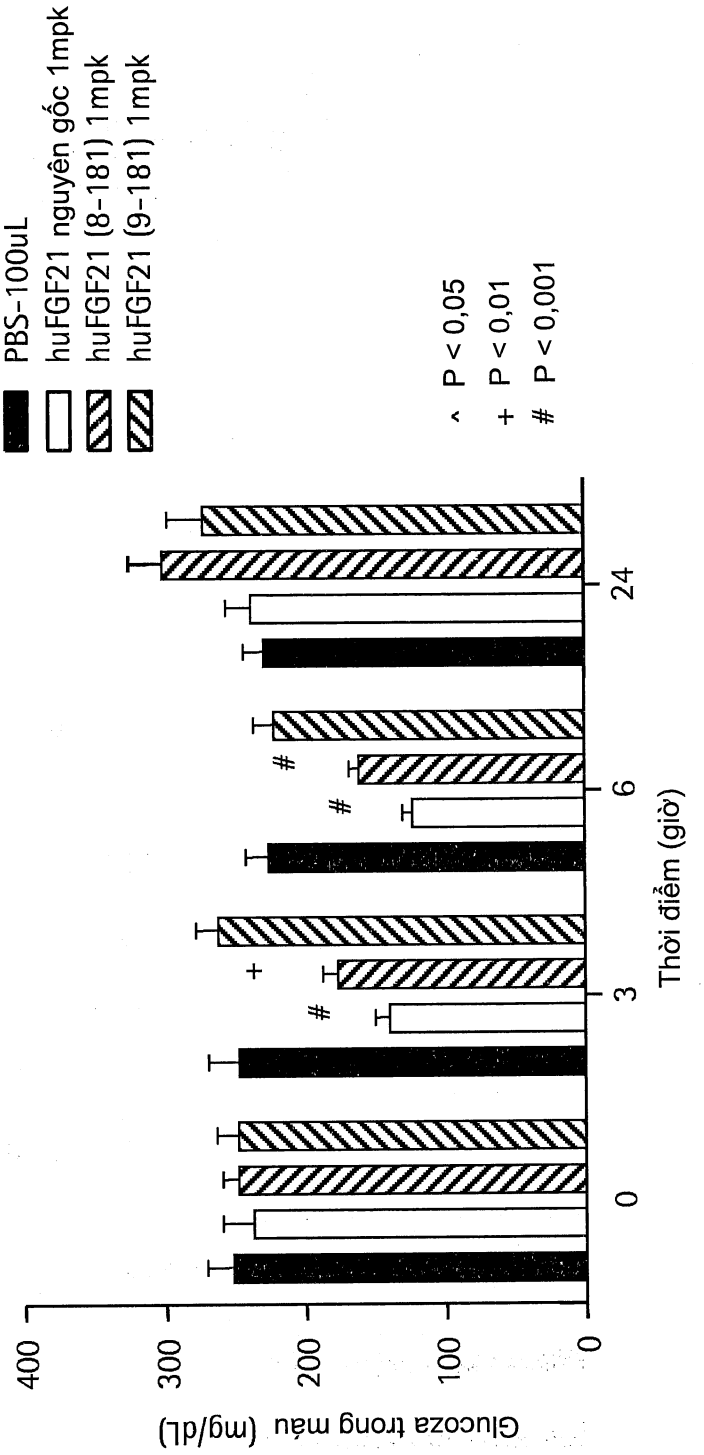

PBS-100uL
huFGF21 nguyên gốc 1mpk
huFGF21 (8-181) 1mpk
huFGF21 (9-181) 1mpk
^ P < 0,05
+ P < 0,01
# P < 0,001
Glucoza trong máu (mg/dL)
0
100
200
300
400
0
3
6
24
Thời điểm (giờ)

FIG. 4

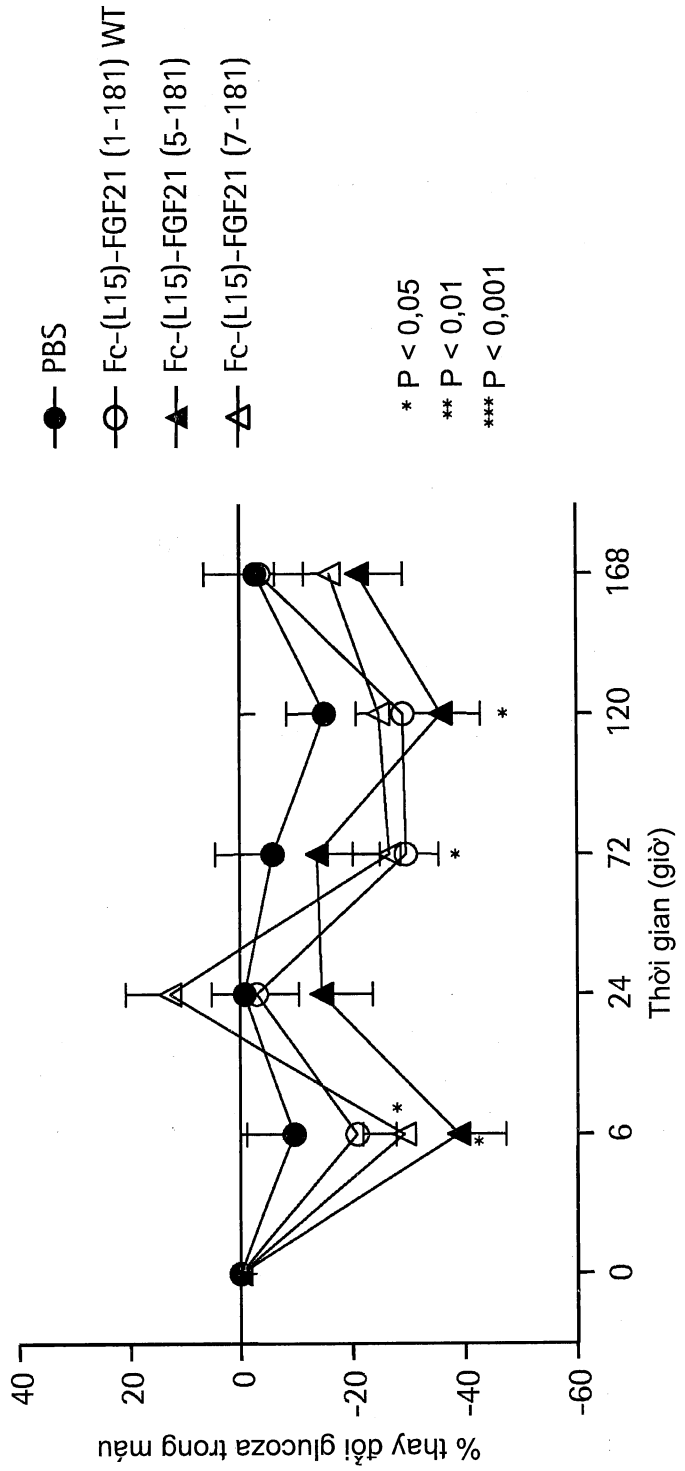

PBS
Fc-(L15)-FGF21 (1-181) WT
Fc-(L15)-FGF21 (5-181)
Fc-(L15)-FGF21 (7-181)
* P < 0,05
** P < 0,01
*** P < 0,001
% thay đổi glucoza trong máu
40
20
0
-20
-40
-60
0
6
24
72
120
168
Thời gian (giờ)

FIG. 5

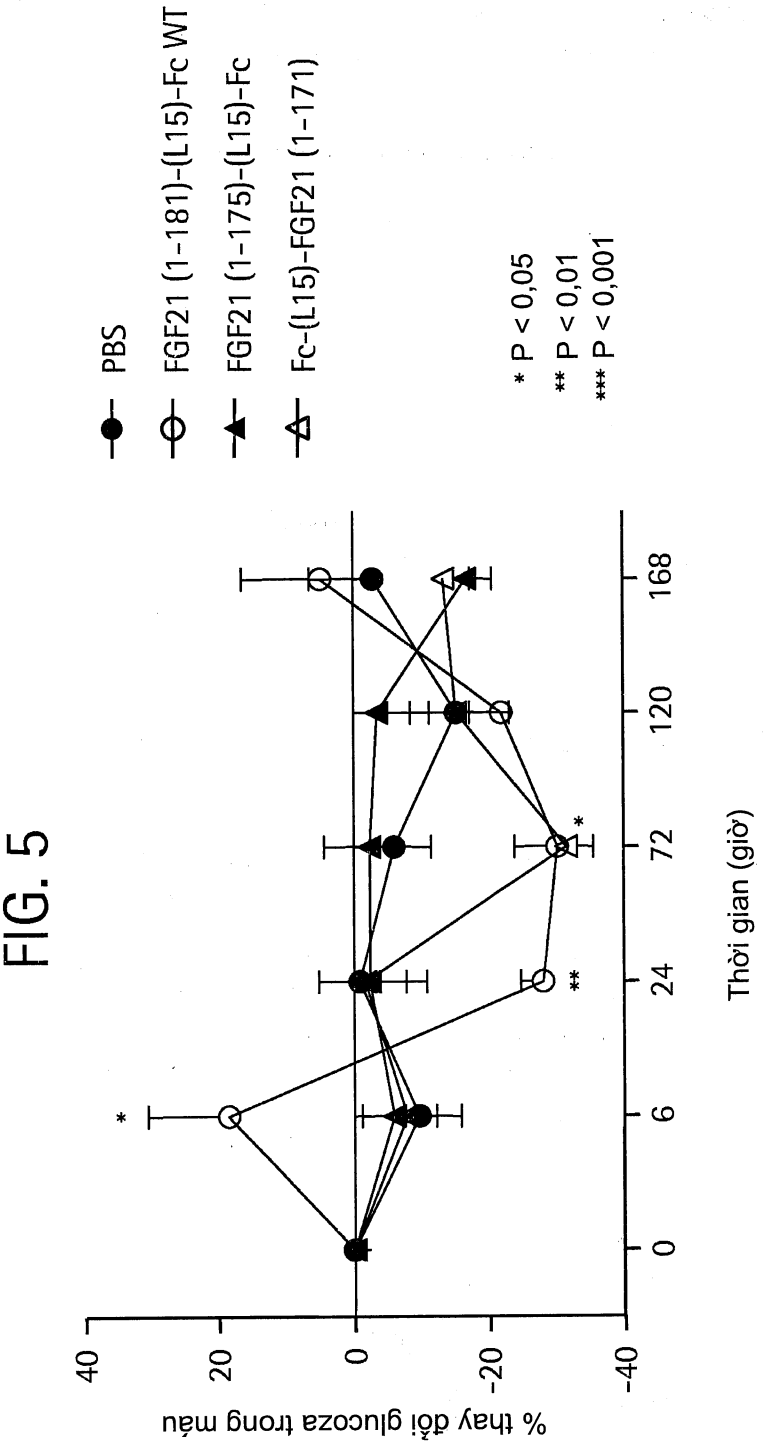

PBS
FGF21 (1-181)-(L15)-Fc WT
FGF21 (1-175)-(L15)-Fc
Fc-(L15)-FGF21 (1-171)
* P < 0,05
** P < 0,01
*** P < 0,001
% thay đổi glucoza trong máu
40
20
0
-20
-40
0
6
24
72
120
168
Thời gian (giờ)
*
**
*

FIG. 6A

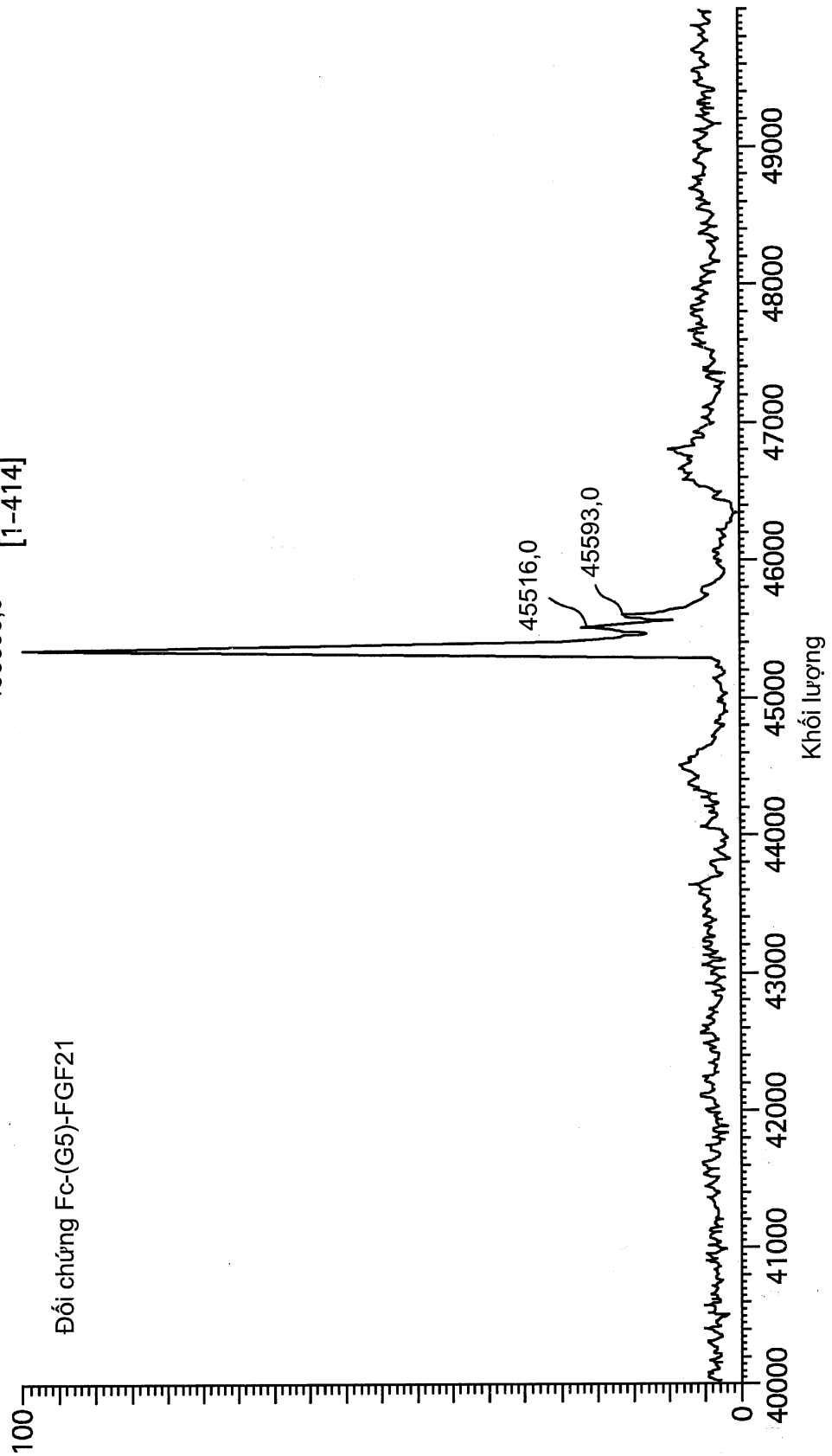

453390,0
[1-414]
45516,0
45593,0
Đối chứng Fc-(G5)-FGF21
100
0
40000
41000
42000
43000
44000
45000
46000
47000
48000
49000
Khối lượng

FIG. 6B

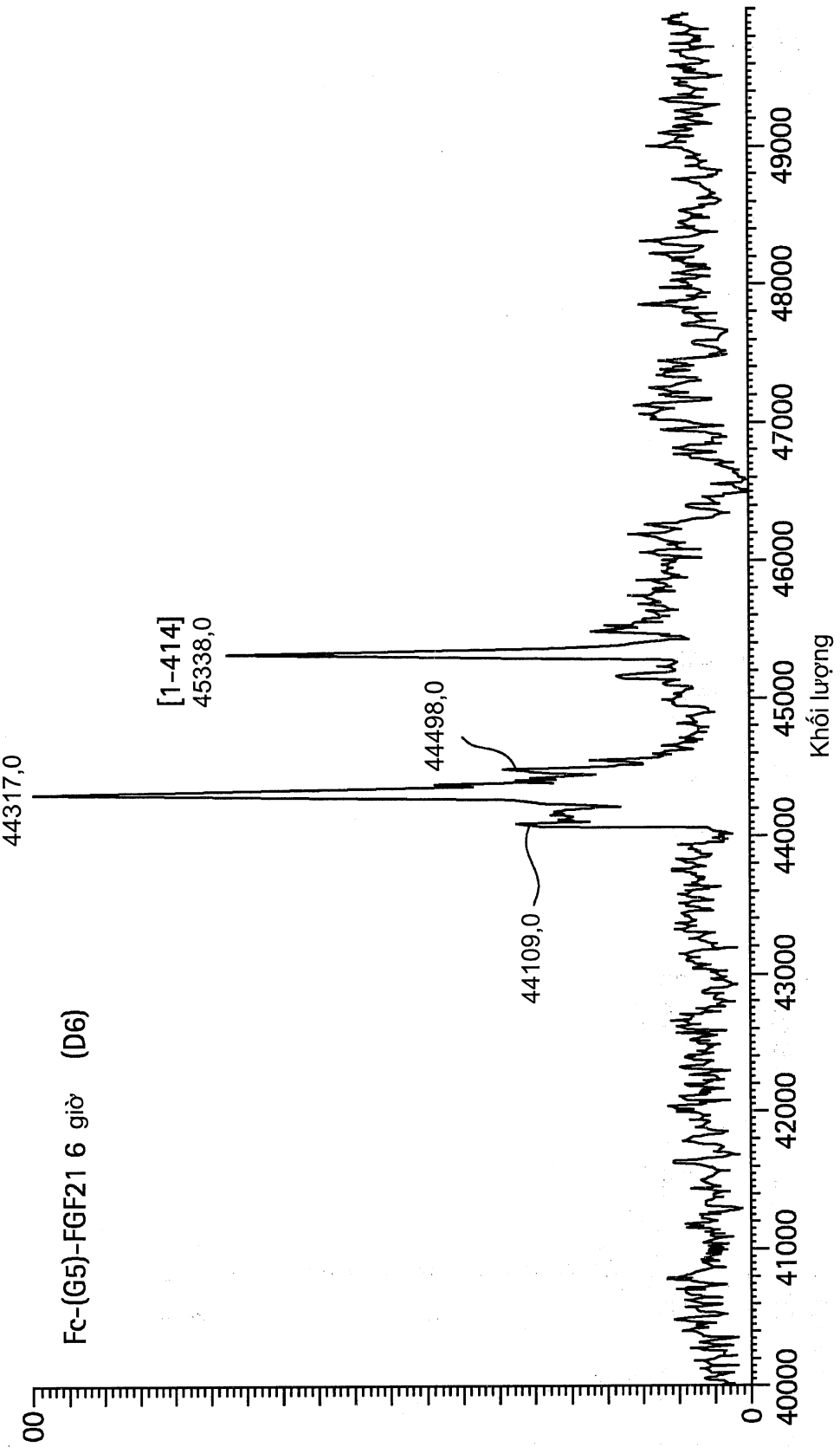

Fc-(G5)-FGF21 6 giờ (D6)
100
0
[1-404]
44317,0
[1-414]
45338,0
44498,0
44109,0
40000
41000
42000
43000
44000
45000
46000
47000
48000
49000
Khối lượng

FIG. 6C

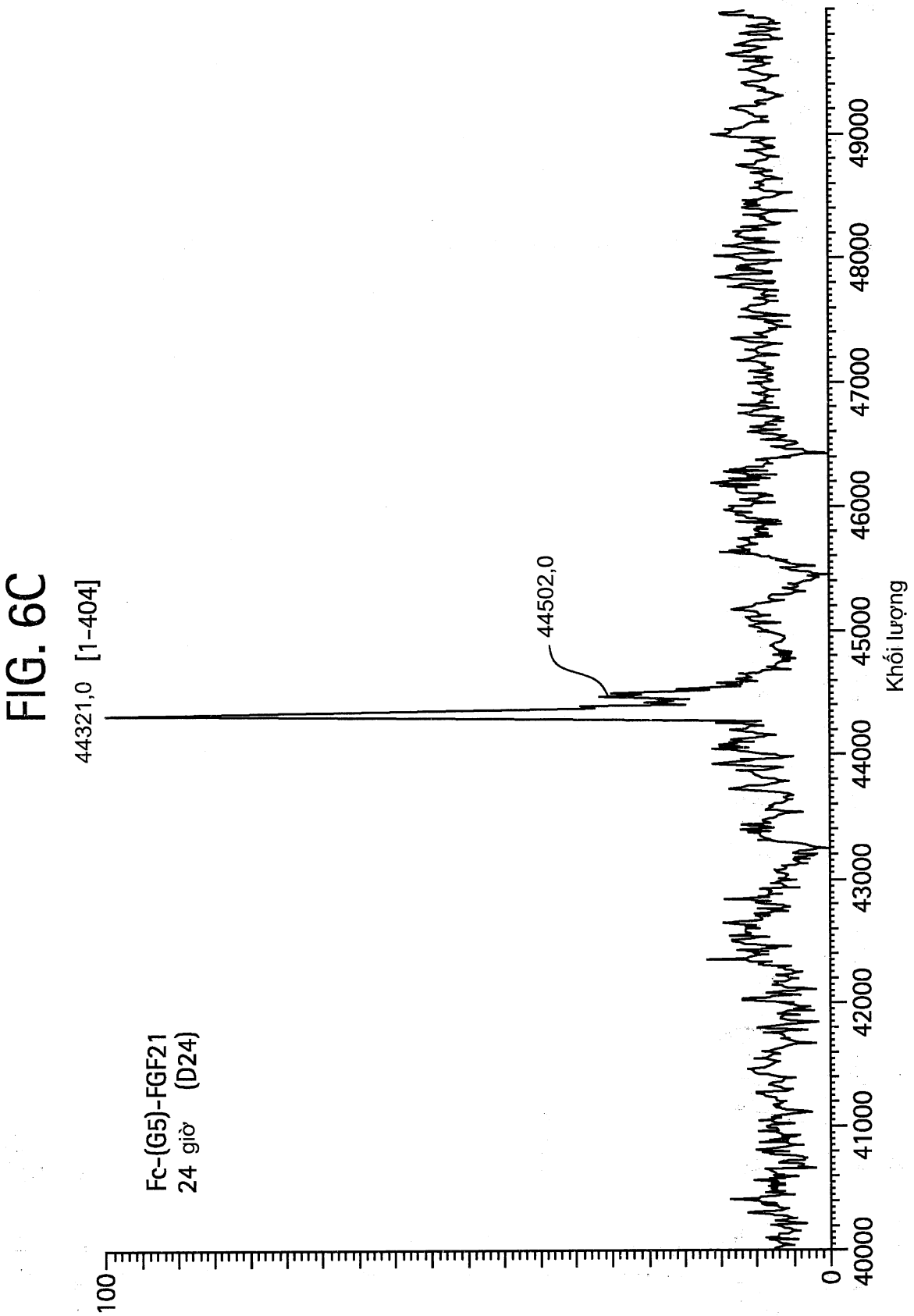

44321,0 [1-404]
44502,0
Fc-(G5)-FGF21
24 giờ (D24)
100
0
40000
41000
42000
43000
44000
45000
46000
47000
48000
49000
Khối lượng

FIG. 6D

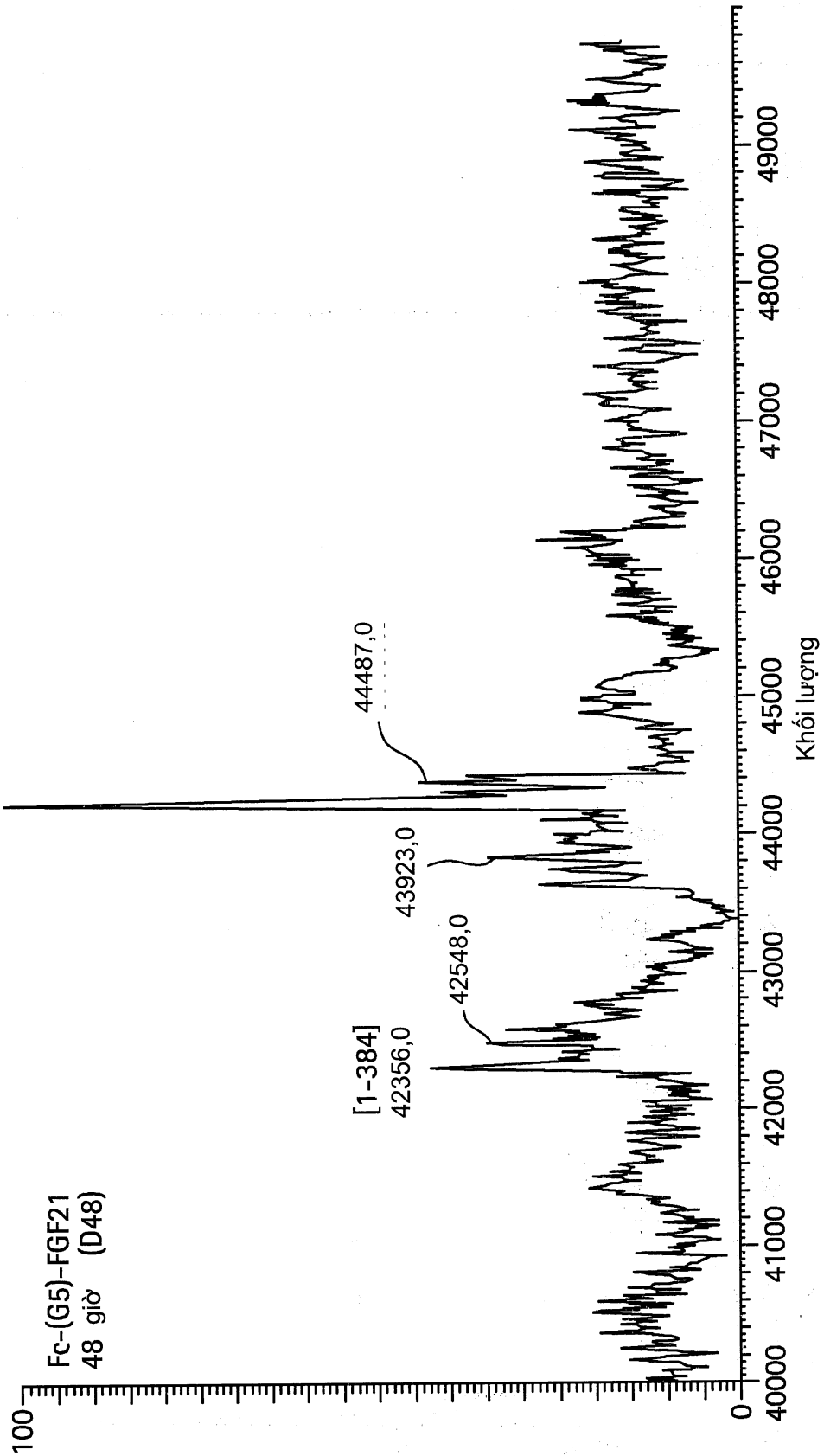

Fc-(G5)-FGF21
48 giờ (D48)
100
0
44327,0 [1-404]
44487,0
43923,0
42548,0
[1-384]
42356,0
40000
41000
42000
43000
44000
45000
46000
47000
48000
49000
Khối lượng

FIG. 7A

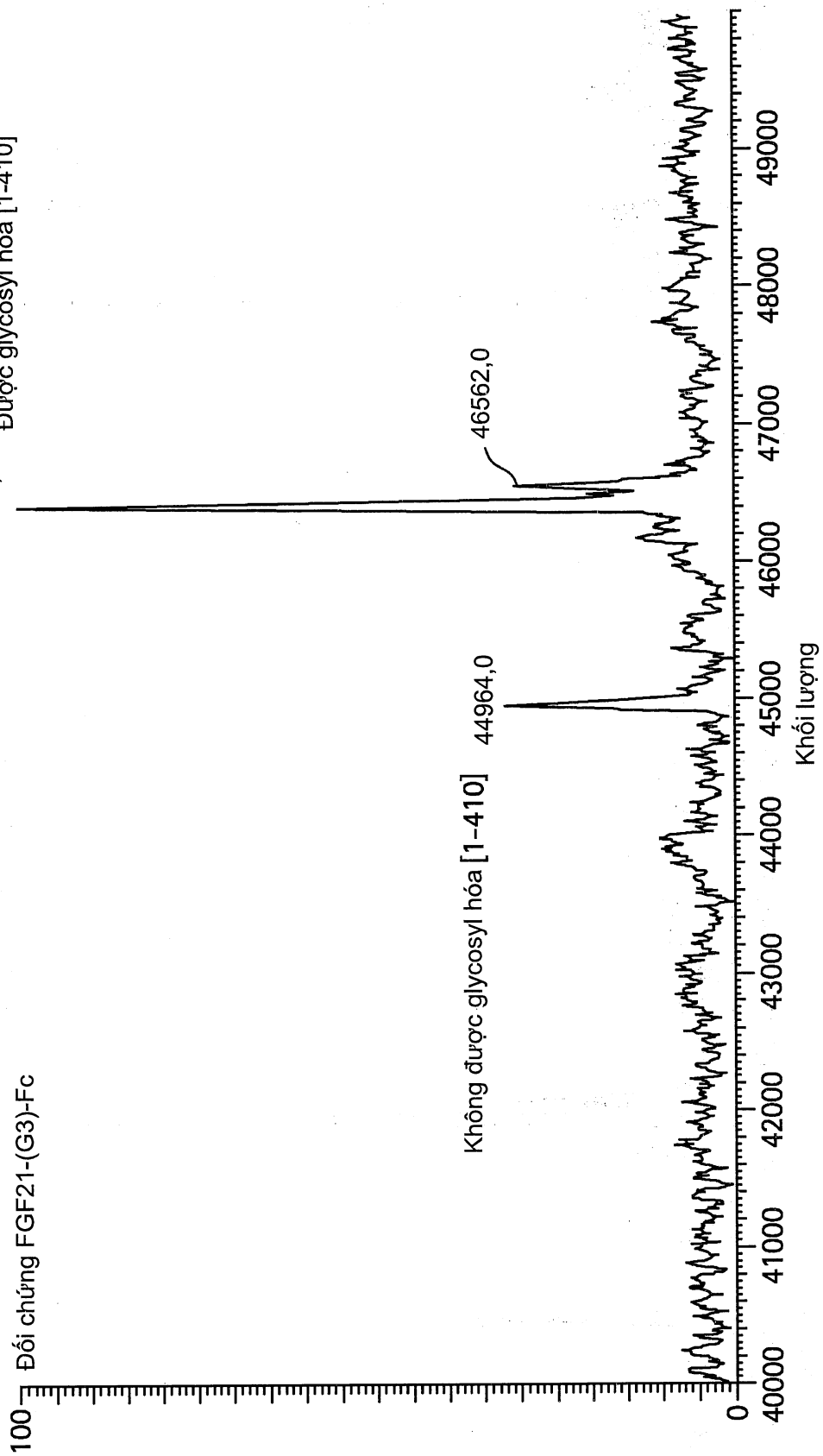

Đối chứng FGF21-(G3)-Fc
Được glycosyl hóa [1-410]
Không được glycosyl hóa [1-410]
46408,0
46562,0
44964,0
100
0
40000
41000
42000
43000
44000
45000
46000
47000
48000
49000
Khối lượng

FIG. 7B

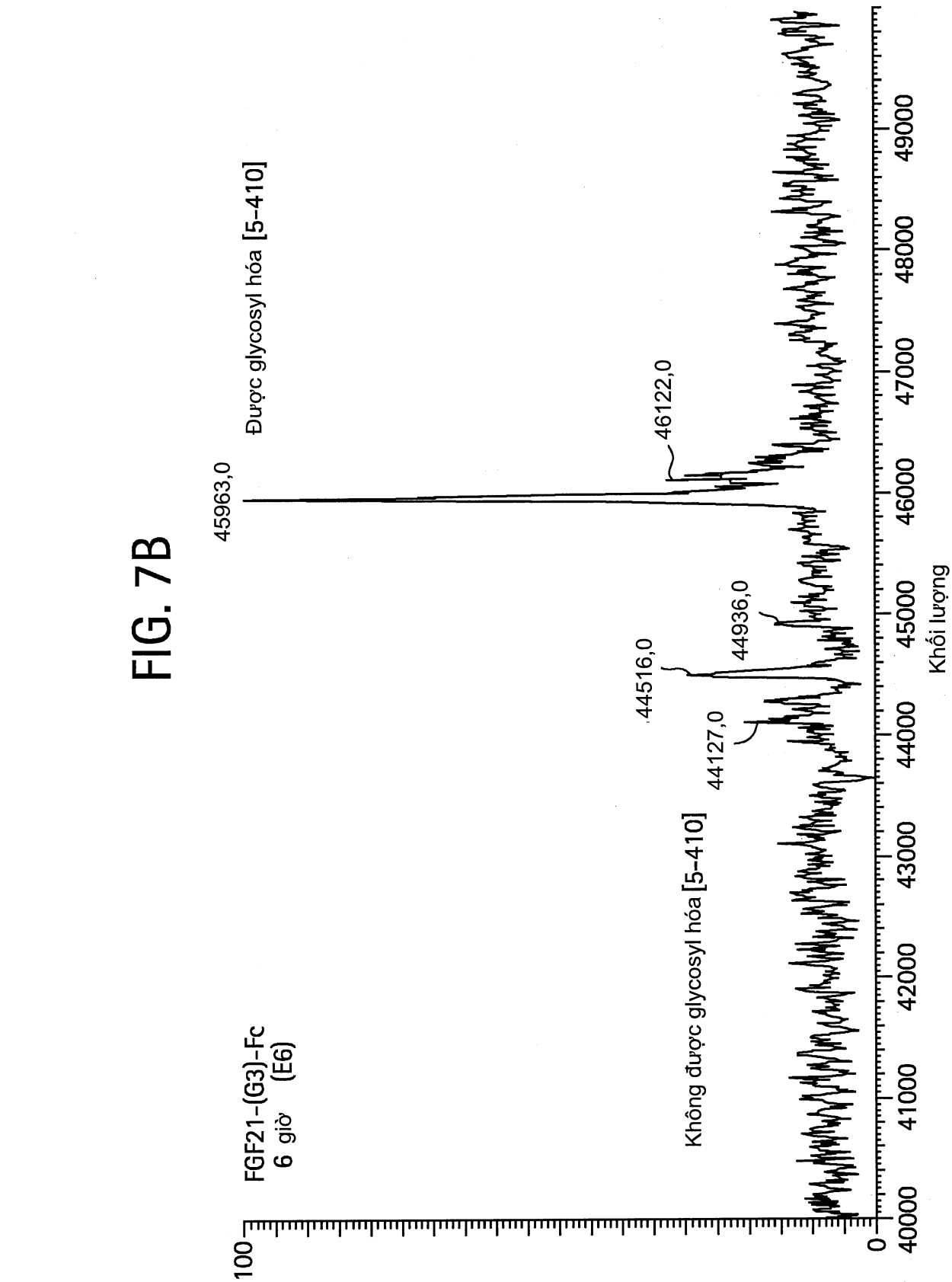

FGF21-(G3)-Fc
6 giờ (E6)
100
0
Được glycosyl hóa [5-410]
45963,0
46122,0
Không được glycosyl hóa [5-410]
44516,0
44936,0
44127,0
40000
41000
42000
43000
44000
45000
46000
47000
48000
49000
Khối lượng

FIG. 7C

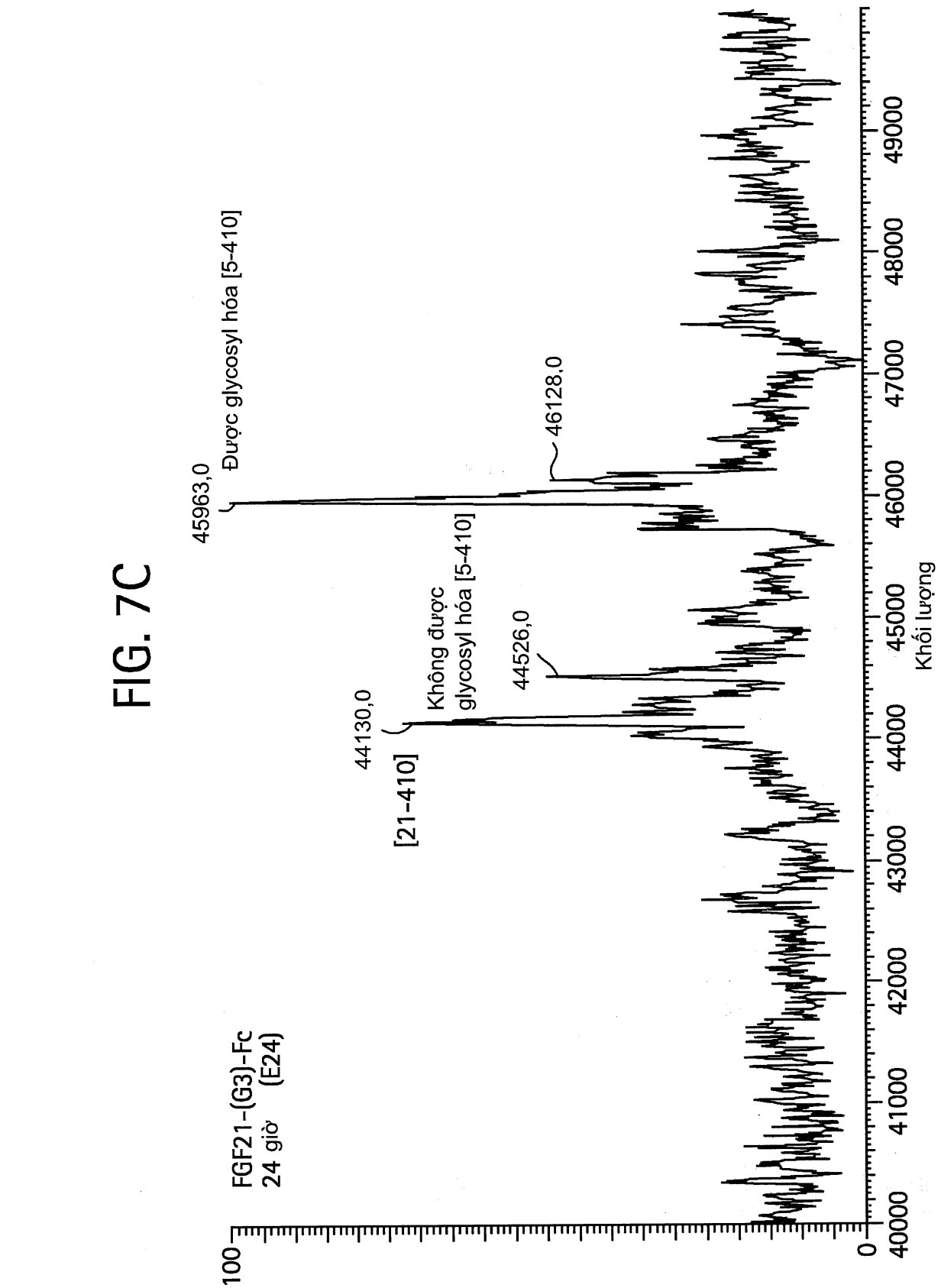

FGF21-(G3)-Fc
24 giờ (E24)
100
0
45963,0
Được glycosyl hóa [5-410]
46128,0
44130,0
Không được
glycosyl hóa [5-410]
[21-410]
44526,0
40000
41000
42000
43000
44000
45000
46000
47000
48000
49000
Khối lượng

FIG. 7D

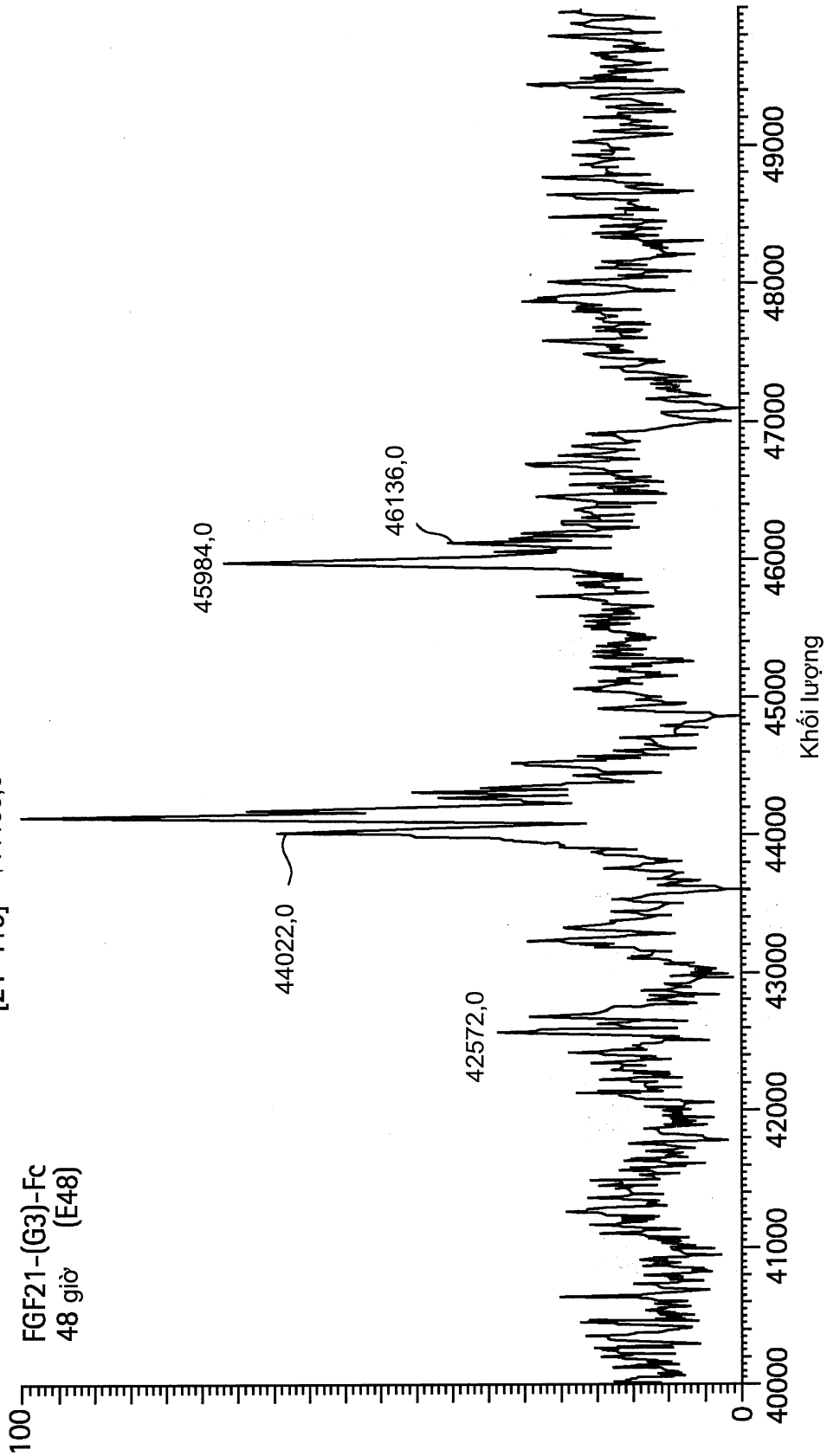

FGF21-(G3)-Fc
48 giờ (E48)
[21-410]
44130,0
45984,0
46136,0
44022,0
42572,0
100
0
40000
41000
42000
43000
44000
45000
46000
47000
48000
49000
Khối lượng

FIG. 8A

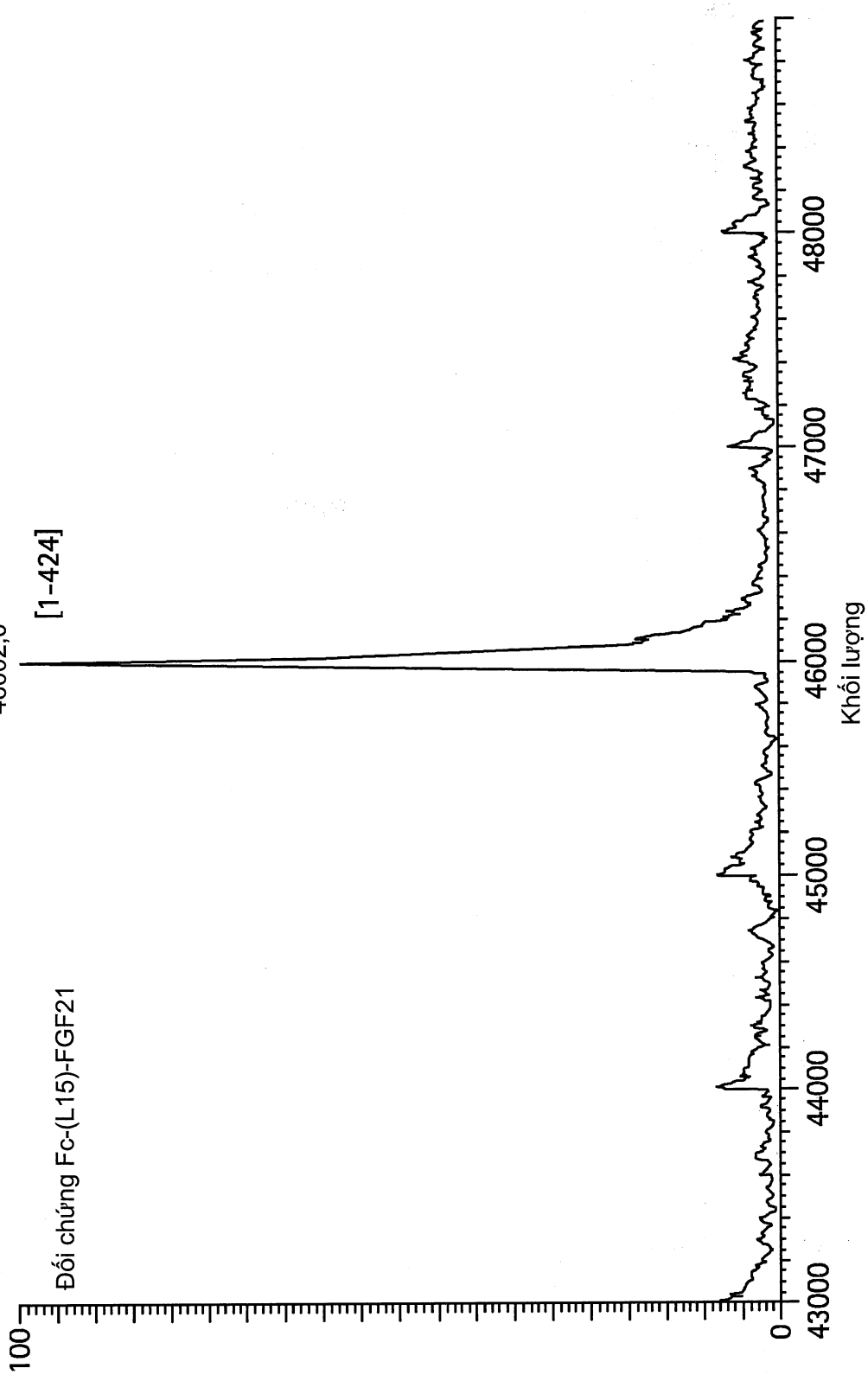

46002,0
[1-424]
Đối chứng Fc-(L15)-FGF21
100
0
43000
44000
45000
46000
47000
48000
Khối lượng

FIG. 8B

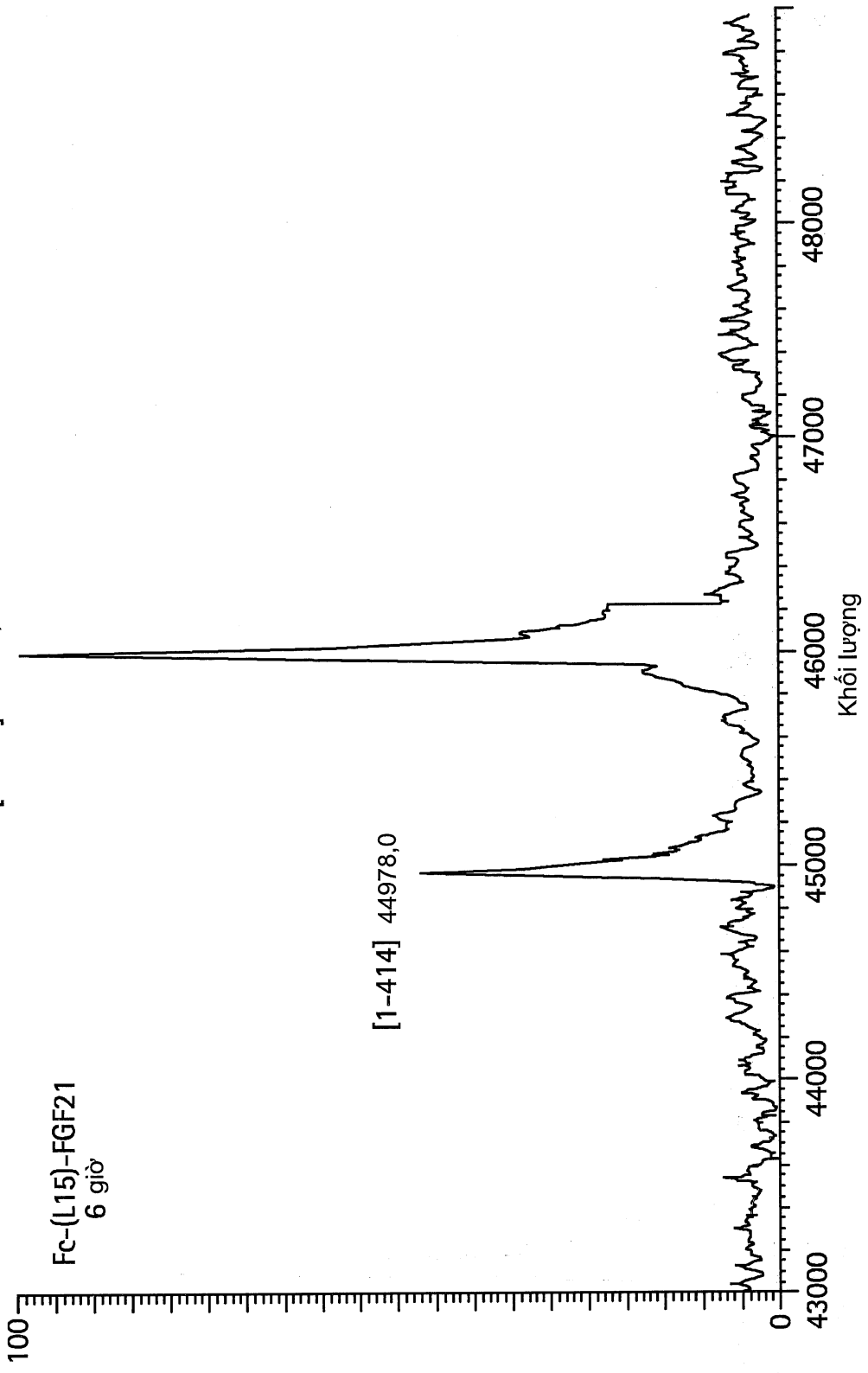

[1-424] 46000,0
[1-414] 44978,0
Fc-(L15)-FGF21
6 giờ
100
0
43000
44000
45000
46000
47000
48000
Khối lượng

FIG. 8C

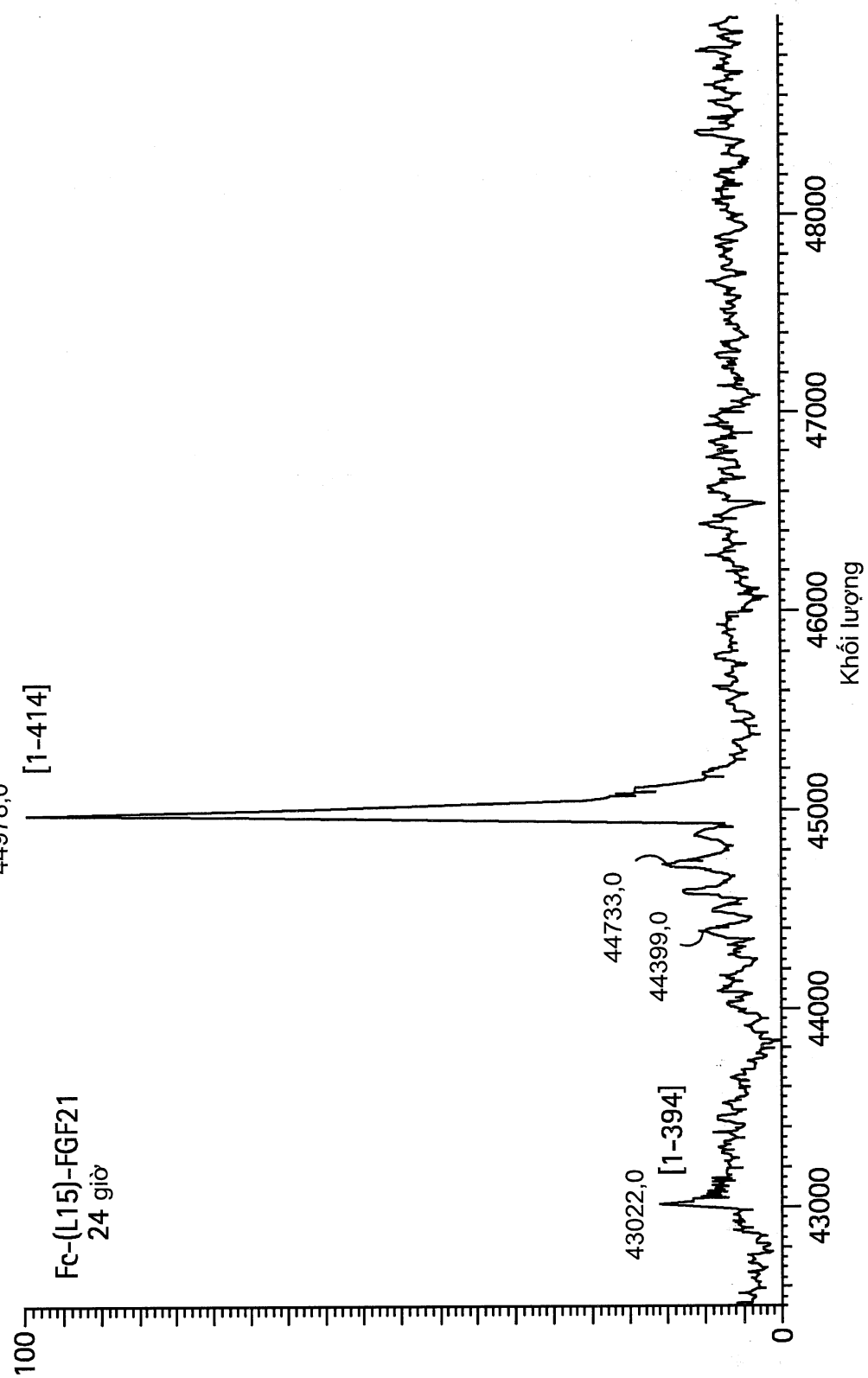

Fc-(L15)-FGF21
24 giờ
100
0
44978,0
[1-414]
44733,0
44399,0
43022,0
[1-394]
43000
44000
45000
46000
47000
48000
Khối lượng

FIG. 8D

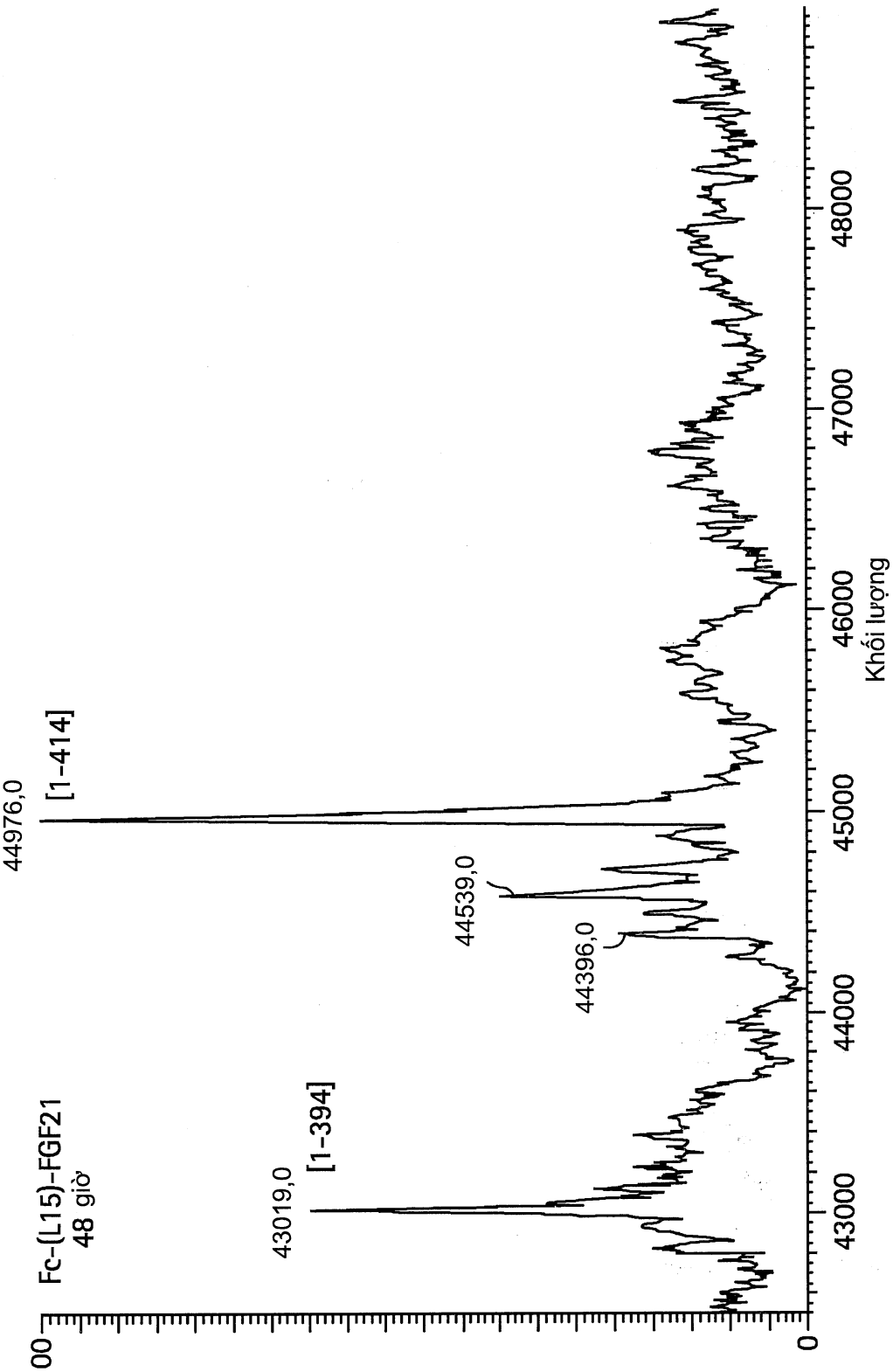

Fc-(L15)-FGF21
48 giờ
100
0
43019,0
[1-394]
44976,0
[1-414]
44539,0
44396,0
43000
44000
45000
46000
47000
48000
Khối lượng

FIG. 9A

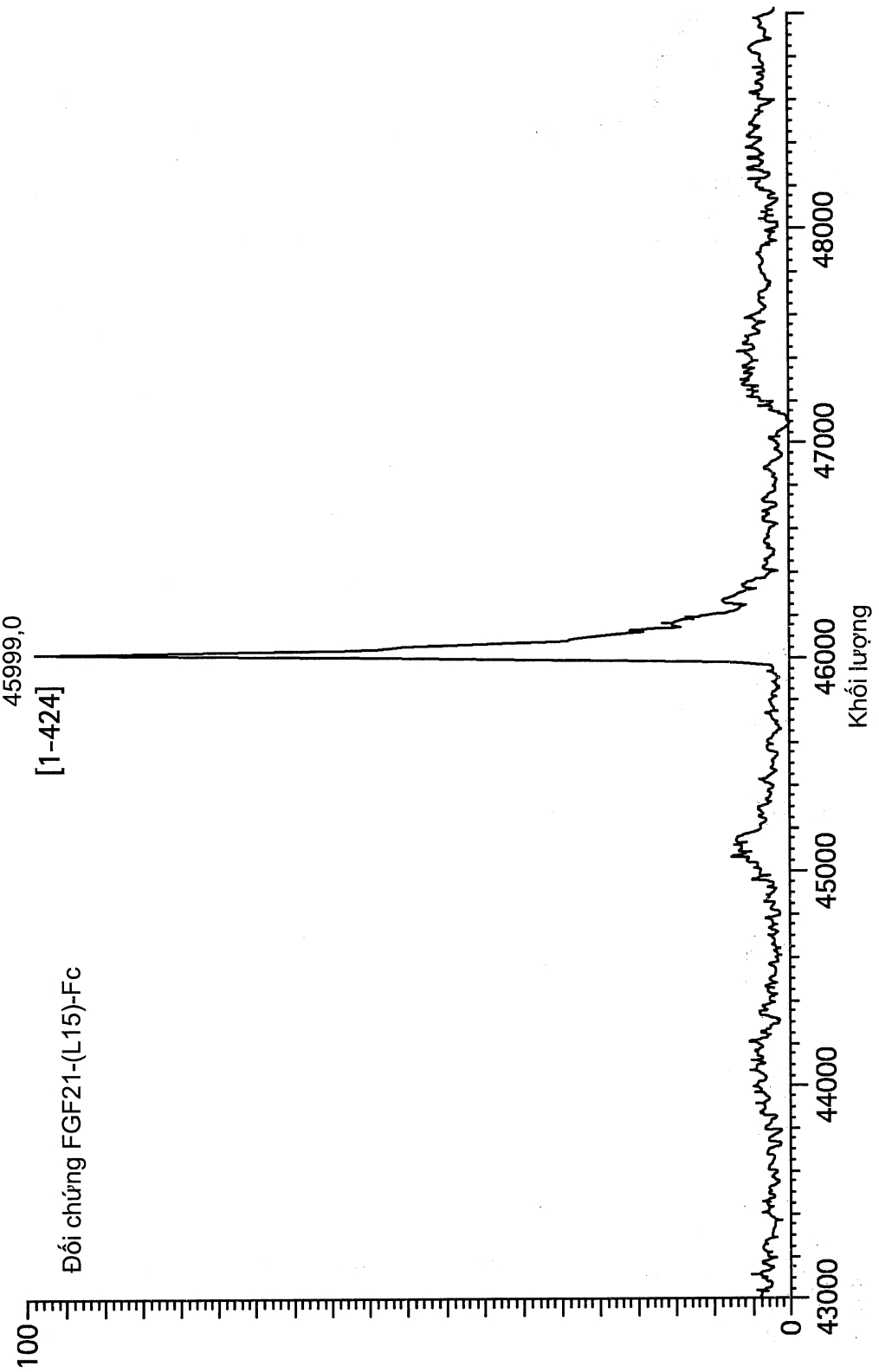

45999,0
[1-424]
Đối chứng FGF21-(L15)-Fc
100
0
43000
44000
45000
46000
47000
48000
Khối lượng

FIG. 9B

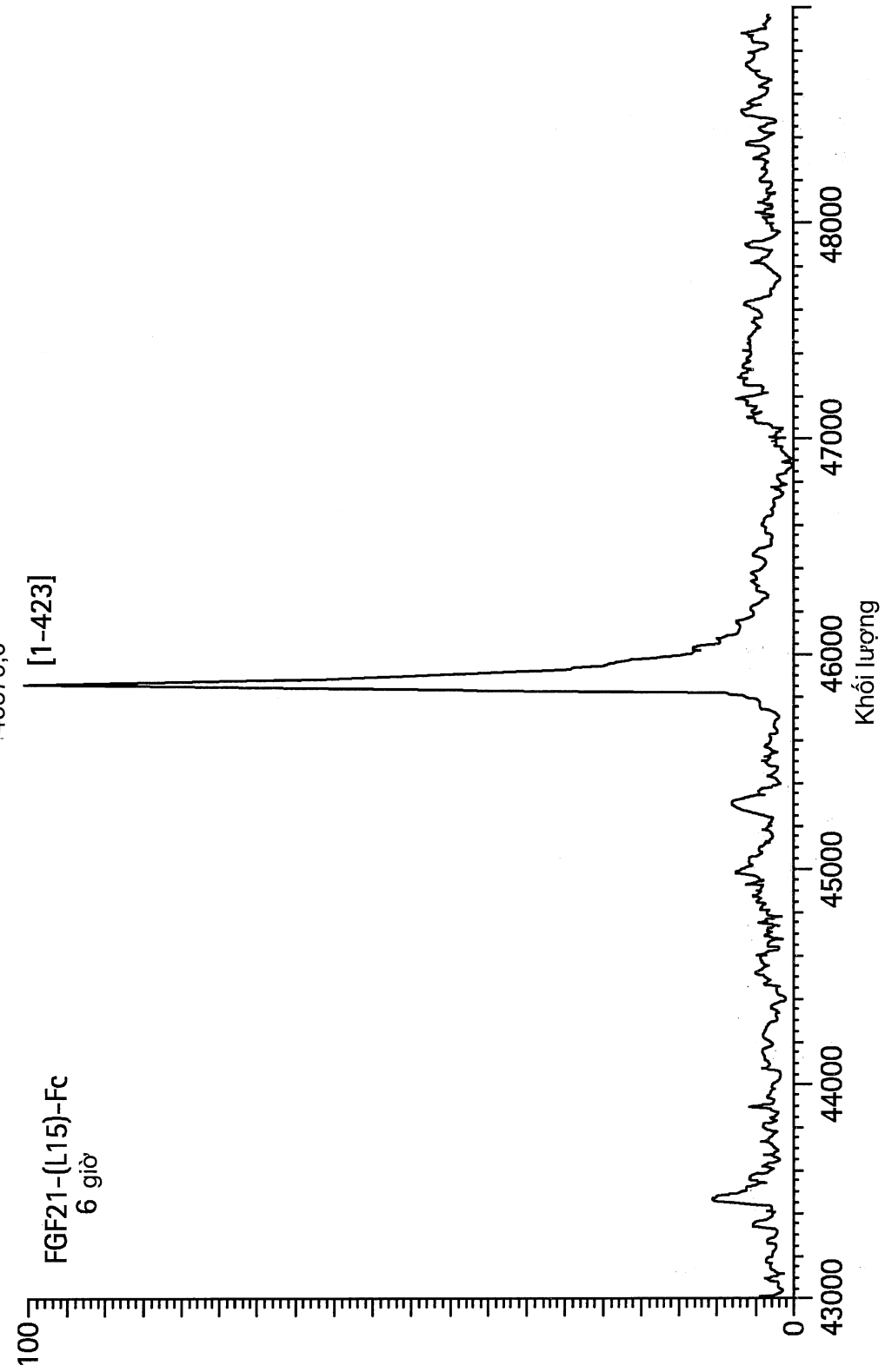

45879,0
[1-423]
FGF21-(L15)-Fc
6 giờ
100
0
43000
44000
45000
46000
47000
48000
Khối lượng

FIG. 9C

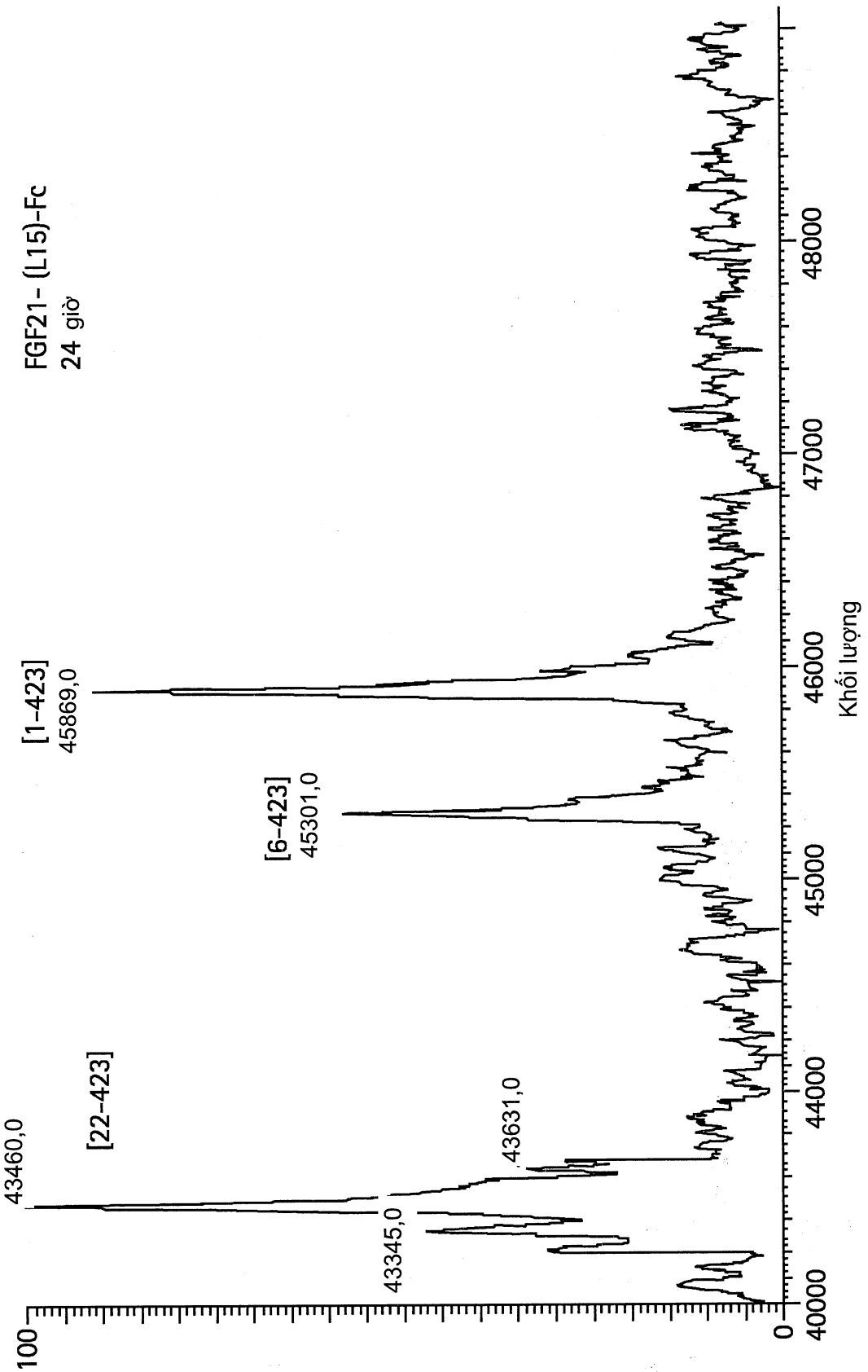

FGF21- (L15)-Fc
24 giờ
[1-423]
45869,0
[6-423]
45301,0
[22-423]
43460,0
43345,0
43631,0
100
0
40000
44000
45000
46000
47000
48000
Khối lượng

FIG. 9D

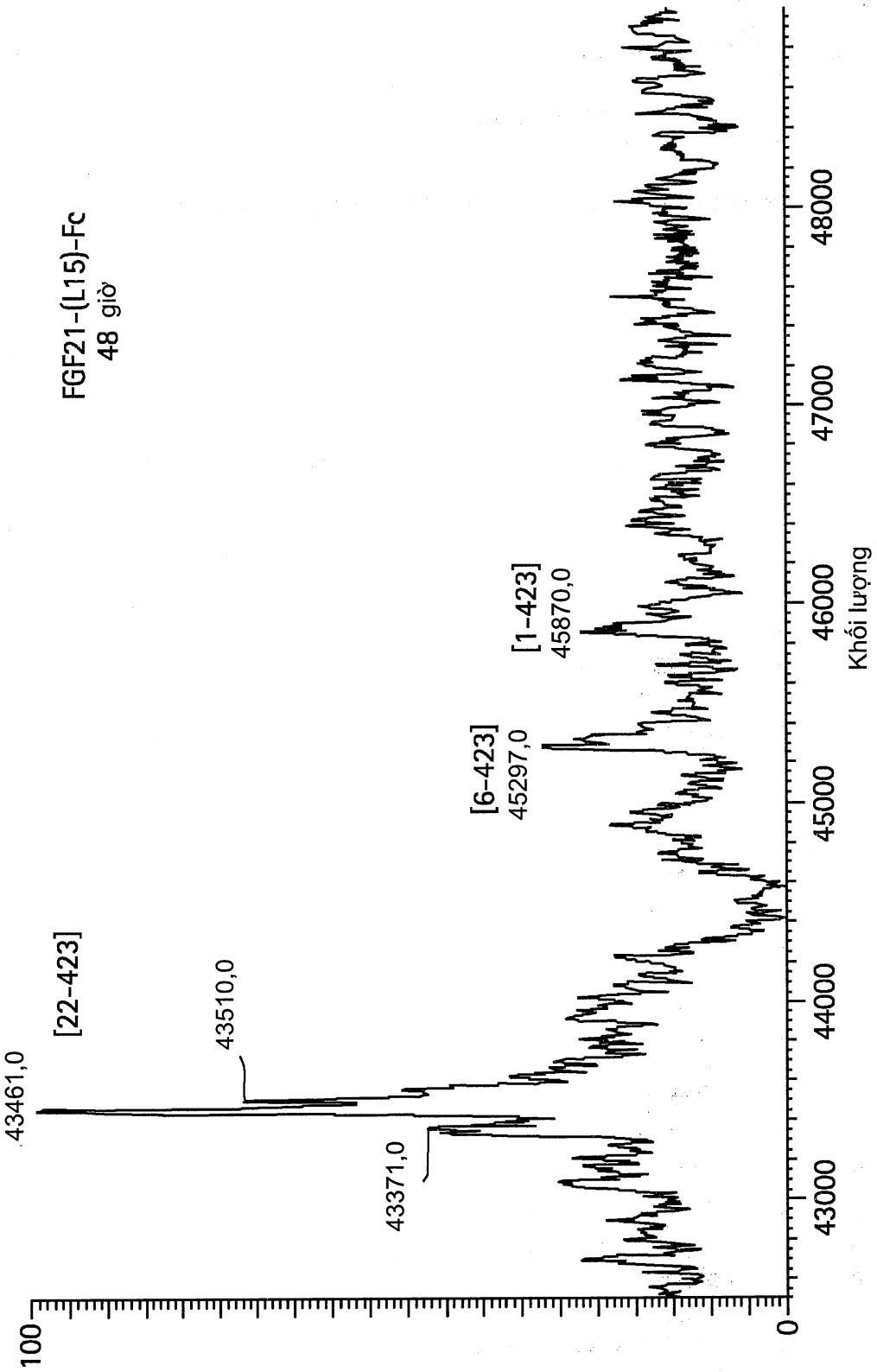
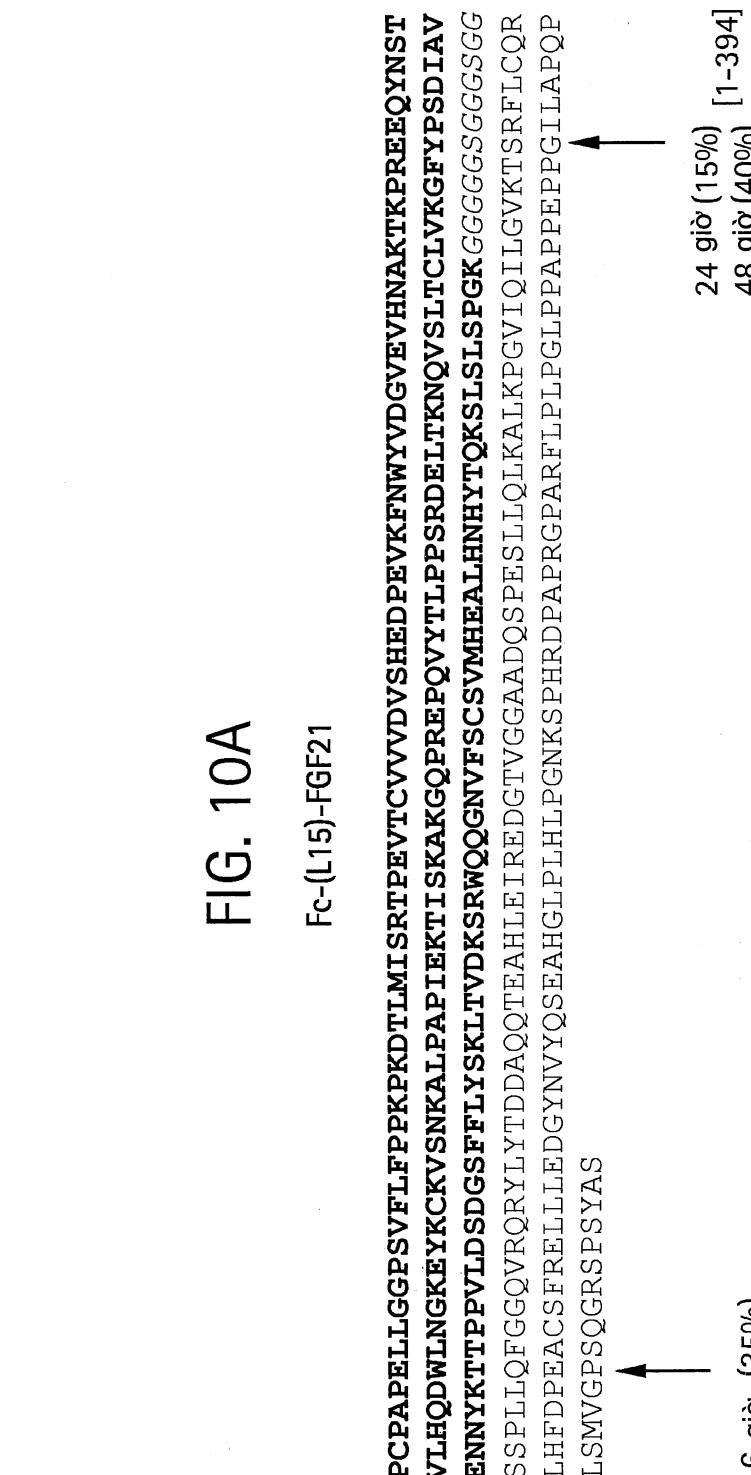

FGF21-(L15)-Fc
48 giờ
43461,0
[22-423]
43510,0
43371,0
[6-423]
45297,0
[1-423]
45870,0
100
0
43000
44000
45000
46000
47000
48000
Khối lượng

FIG. 10A

Fc-(L15)-FGF21



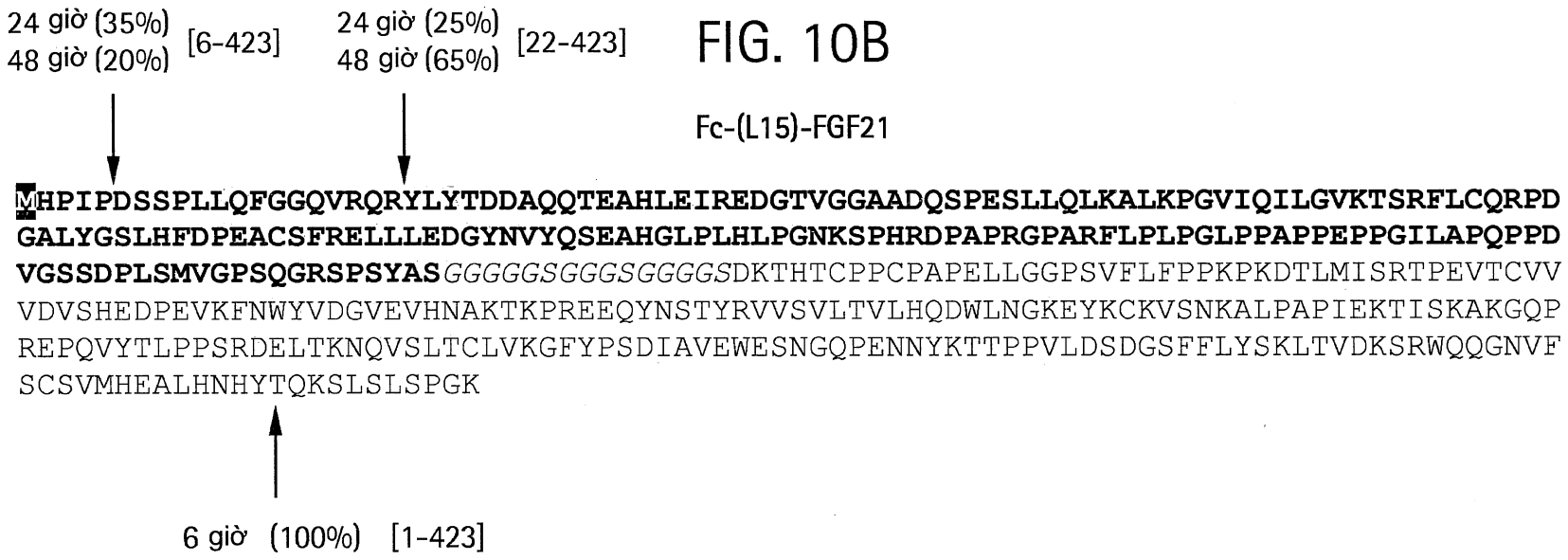

24 giờ (35%)
48 giờ (20%) [6-423]
24 giờ (25%)
48 giờ (65%) [22-423]
Fc-(L15)-FGF21
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD
GALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPD
VGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASGGGGGSGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
6 giờ (100%) [1-423]

FIG. 10B

FIG. 11

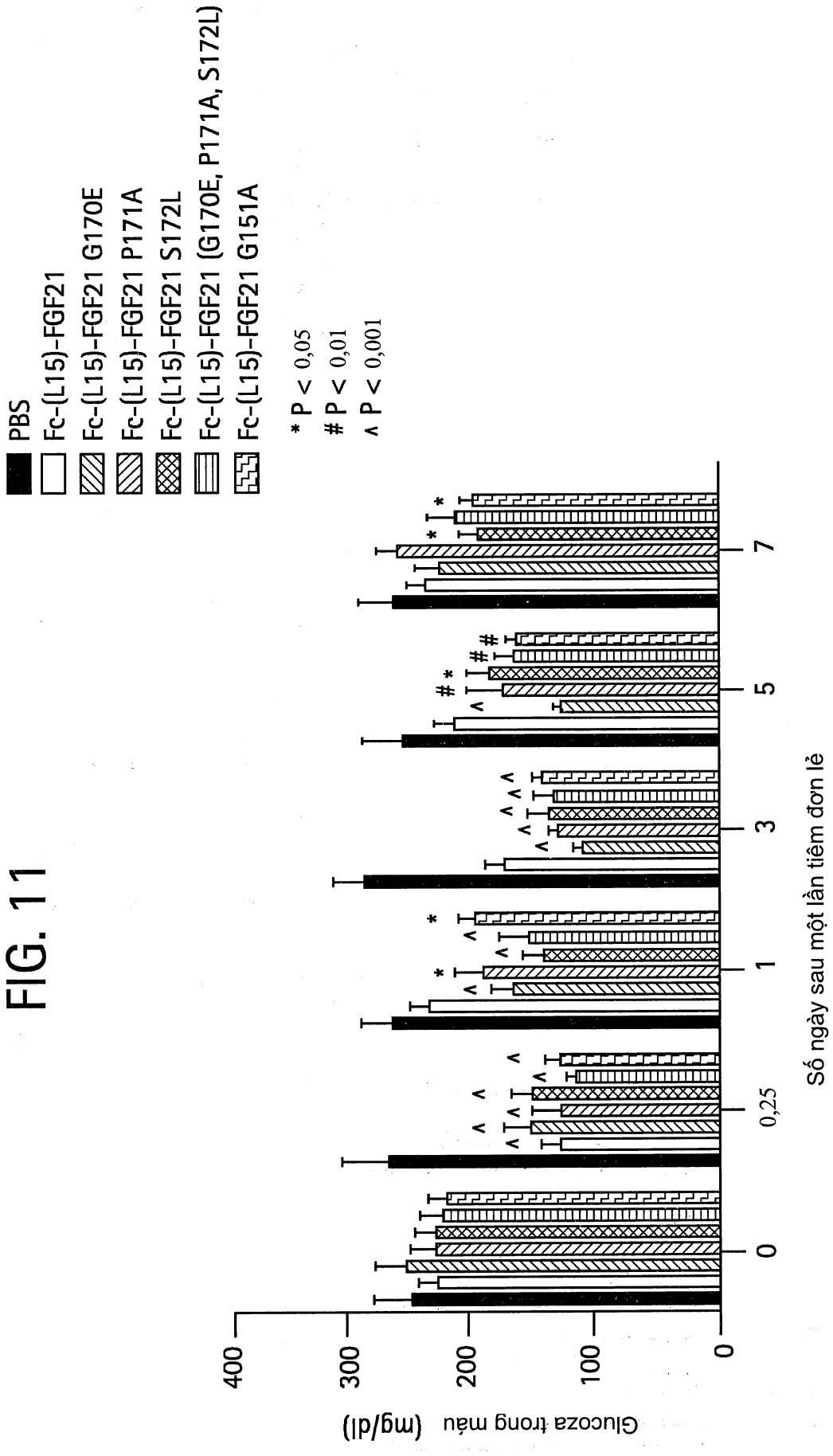

PBS
Fc-(L15)-FGF21
Fc-(L15)-FGF21 G170E
Fc-(L15)-FGF21 P171A
Fc-(L15)-FGF21 S172L
Fc-(L15)-FGF21 (G170E, P171A, S172L)
Fc-(L15)-FGF21 G151A
* P < 0,05
# P < 0,01
^ P < 0,001
Glucoza trong máu (mg/dl)
400
300
200
100
0
0
0,25
1
3
5
7
Số ngày sau một lần tiêm đơn lẻ

FIG. 12

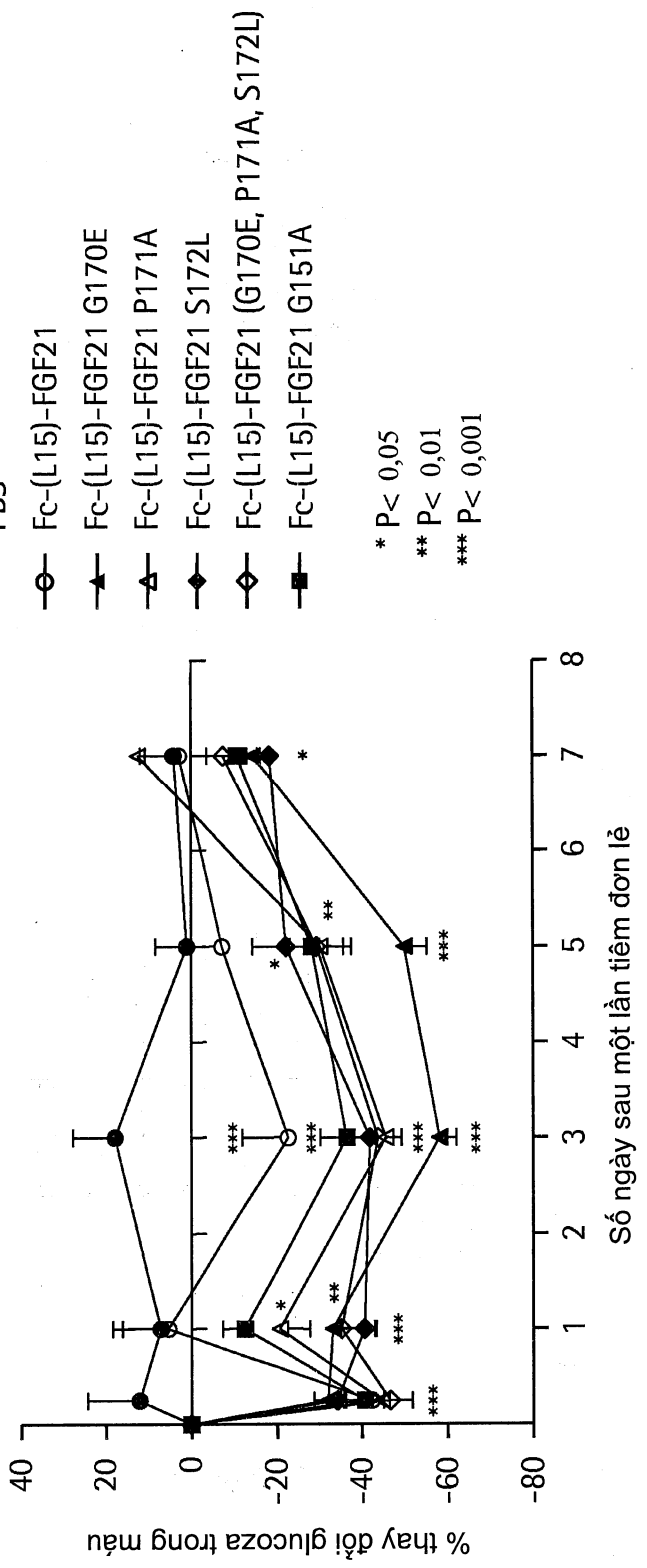

PBS
Fc-(L15)-FGF21
Fc-(L15)-FGF21 G170E
Fc-(L15)-FGF21 P171A
Fc-(L15)-FGF21 S172L
Fc-(L15)-FGF21 (G170E, P171A, S172L)
Fc-(L15)-FGF21 G151A
* P< 0,05
** P< 0,01
*** P< 0,001
% thay đổi glucoza trong máu
40
20
0
-20
-40
-60
-80
1
2
3
4
5
6
7
8
Số ngày sau một lần tiêm đơn lẻ

FIG. 13

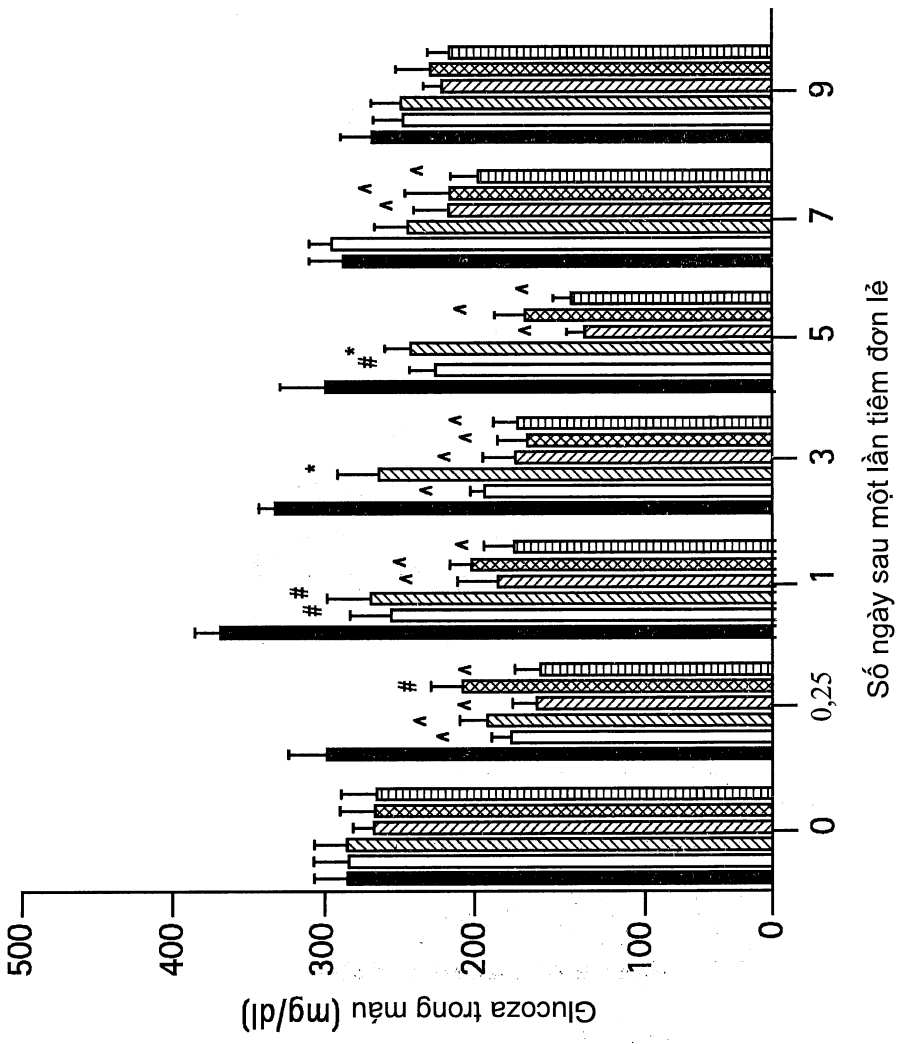

PBS
Fc-(L15)-FGF21
Fc-(L15)-FGF21 (P150A, G151A, I152V)
Fc-(L15)-FGF21 G170E
Fc-(L15)-FGF21 (G170E, P171A)
Fc-(L15)-FGF21 (G170E, S172L)
* P < 0,05
# P < 0,01
^ P < 0,001
Glucoza trong máu (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
0
0,25
1
3
5
7
9
Số ngày sau một lần tiêm đơn lẻ

FIG. 14

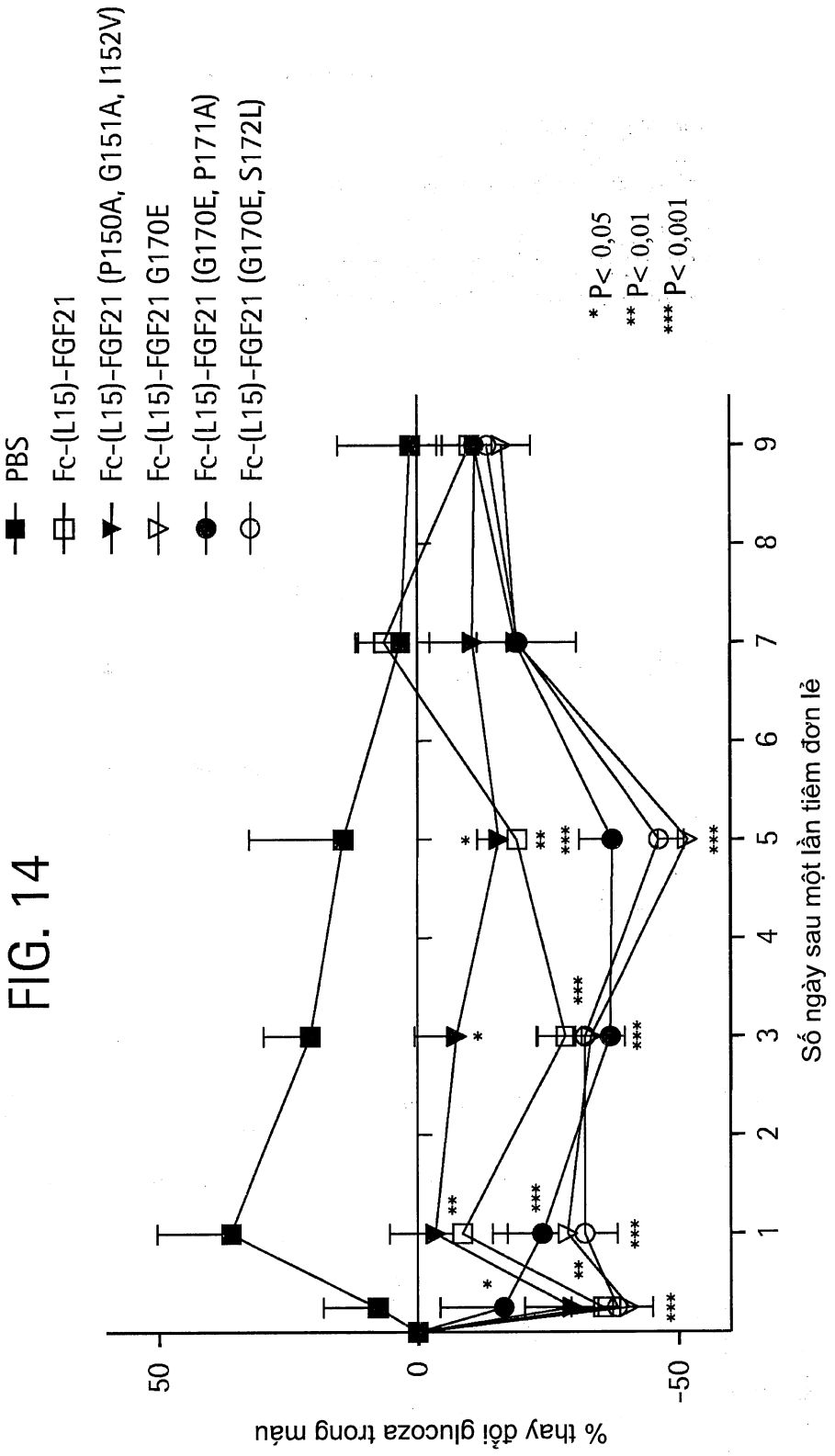

PBS
Fc-(L15)-FGF21
Fc-(L15)-FGF21 (P150A, G151A, I152V)
Fc-(L15)-FGF21 G170E
Fc-(L15)-FGF21 (G170E, P171A)
Fc-(L15)-FGF21 (G170E, S172L)
* P< 0,05
** P< 0,01
*** P< 0,001
% thay đổi glucoza trong máu
50
0
-50
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Số ngày sau một lần tiêm đơn lẻ

FIG. 15

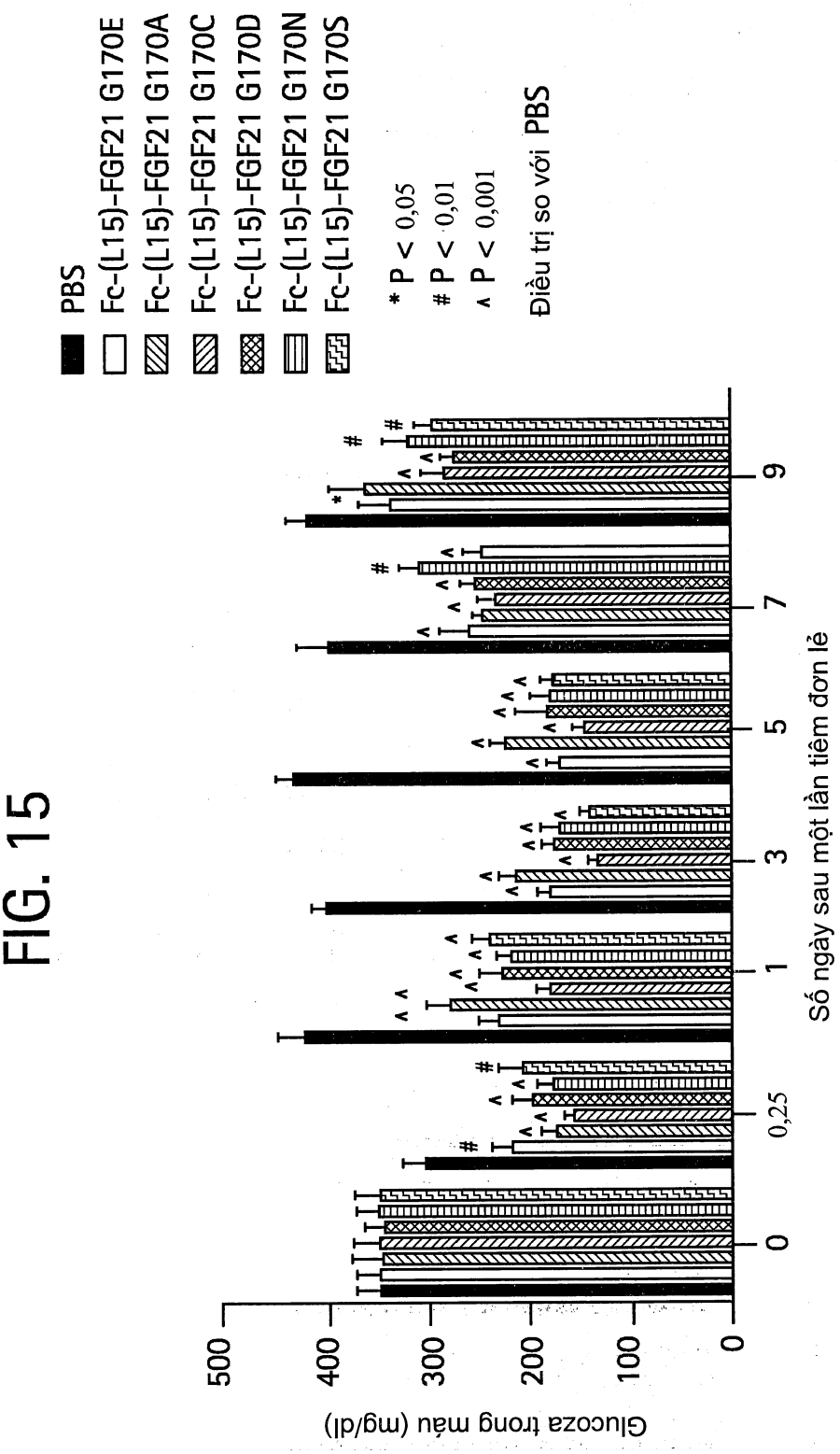

PBS
Fc-(L15)-FGF21 G170E
Fc-(L15)-FGF21 G170A
Fc-(L15)-FGF21 G170C
Fc-(L15)-FGF21 G170D
Fc-(L15)-FGF21 G170N
Fc-(L15)-FGF21 G170S
* P < 0,05
# P < 0,01
^ P < 0,001
Điều trị so với PBS
Glucoza trong máu (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
0
0,25
1
3
5
7
9
Số ngày sau một lần tiêm đơn lẻ

FIG. 16

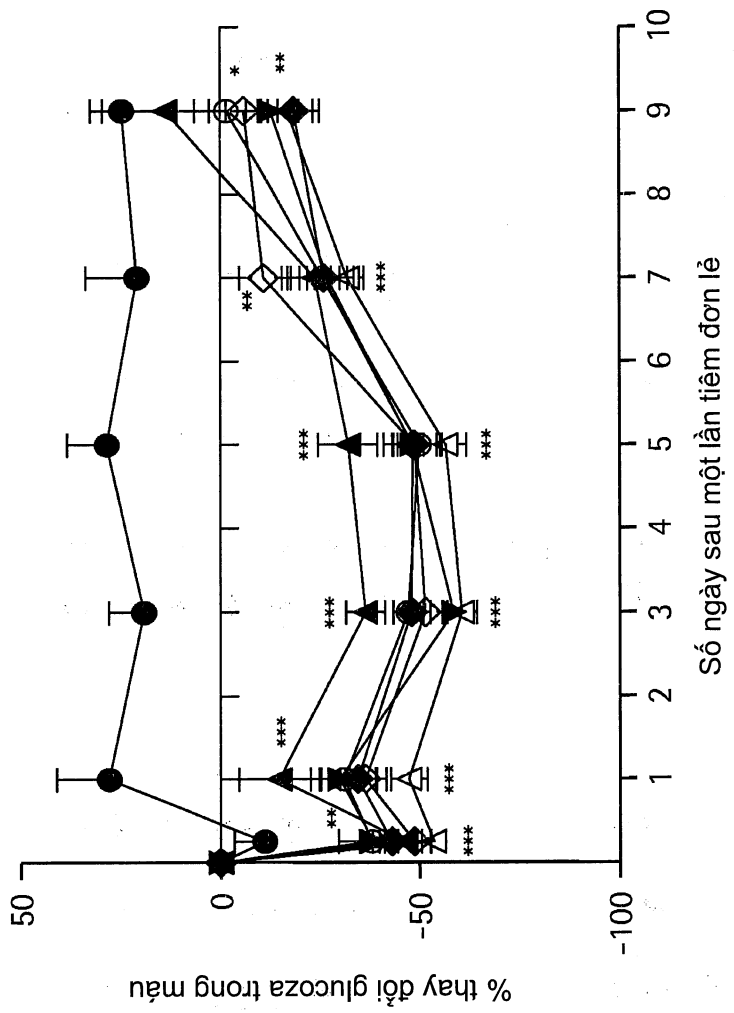

PBS
Fc-(L15)-FGF21 G170E
Fc-(L15)-FGF21 G170A
Fc-(L15)-FGF21 G170C
Fc-(L15)-FGF21 G170D
Fc-(L15)-FGF21 G170N
Fc-(L15)-FGF21 G170S
* P< 0,05
** P< 0,01
*** P< 0,001
Điều trị so với PBS
% thay đổi glucoza trong máu
50
0
-50
-100
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Số ngày sau một lần tiêm đơn lẻ

FIG. 17

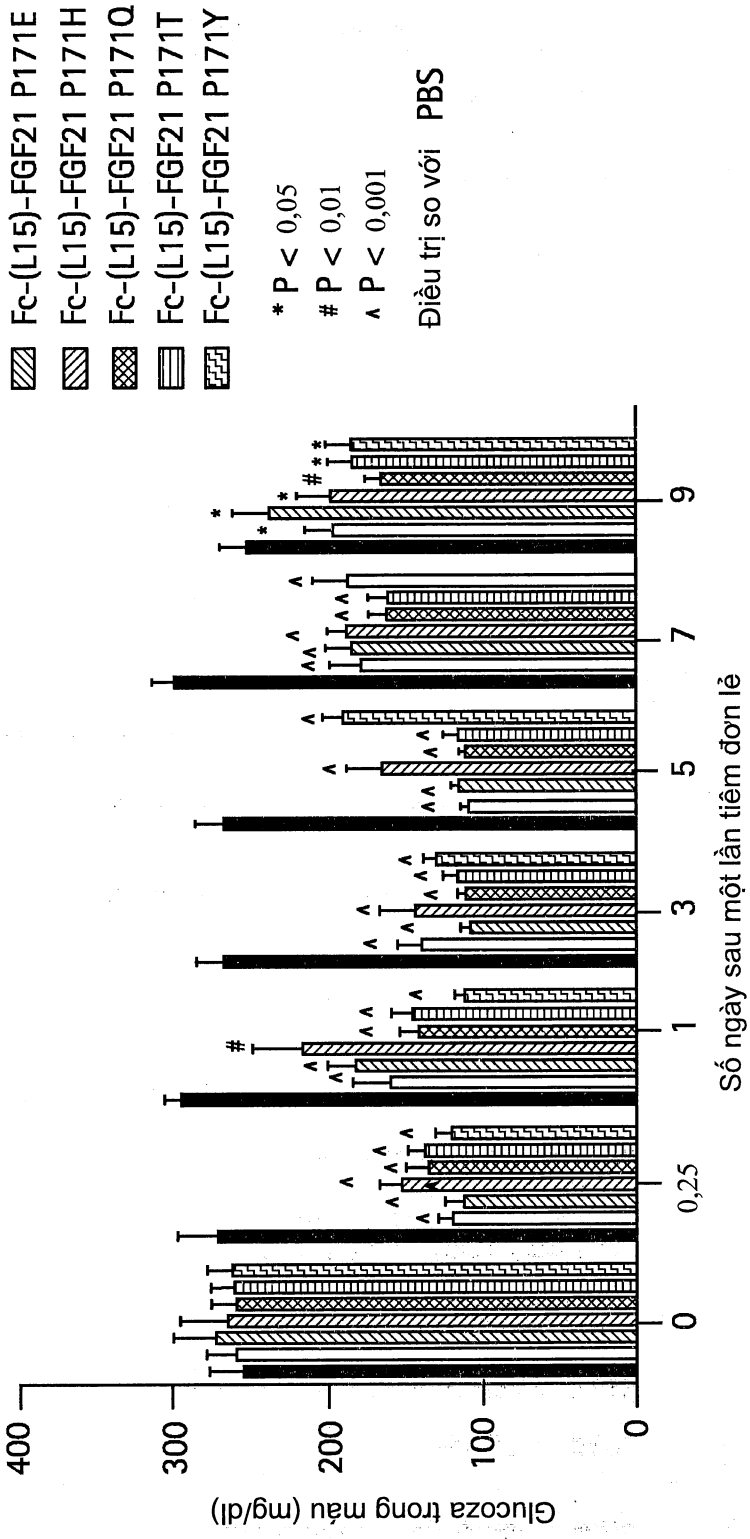

PBS
Fc-(L15)-FGF21 G170E
Fc-(L15)-FGF21 P171E
Fc-(L15)-FGF21 P171H
Fc-(L15)-FGF21 P171Q
Fc-(L15)-FGF21 P171T
Fc-(L15)-FGF21 P171Y
* P < 0,05
# P < 0,01
^ P < 0,001
Điều trị so với PBS
Glucoza trong máu (mg/dl)
0
100
200
300
400
0
0,25
1
3
5
7
9
Số ngày sau một lần tiêm đơn lẻ

FIG. 18

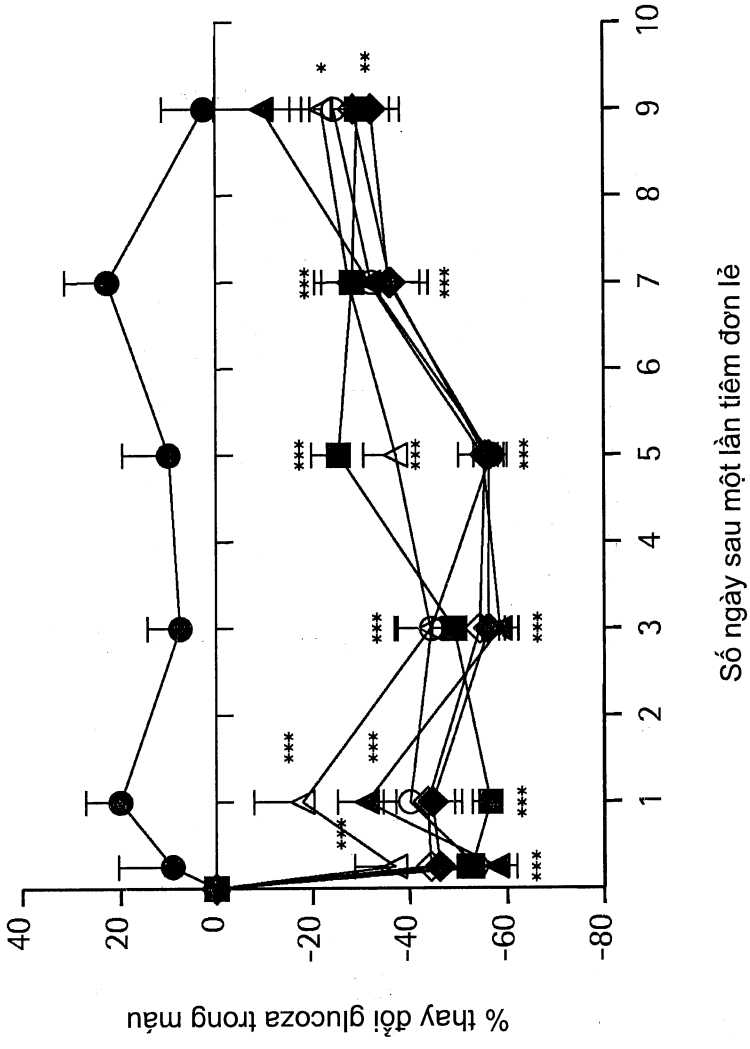

PBS
Fc-(L15)-FGF21 G170E
Fc-(L15)-FGF21 P171E
Fc-(L15)-FGF21 P171H
Fc-(L15)-FGF21 P171Q
Fc-(L15)-FGF21 P171T
Fc-(L15)-FGF21 P171Y
* P< 0,05
** P< 0,01
*** P< 0,001
Điều trị so với PBS
% thay đổi glucoza trong máu
40
20
0
-20
-40
-60
-80
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Số ngày sau một lần tiêm đơn lẻ

FIG. 19A

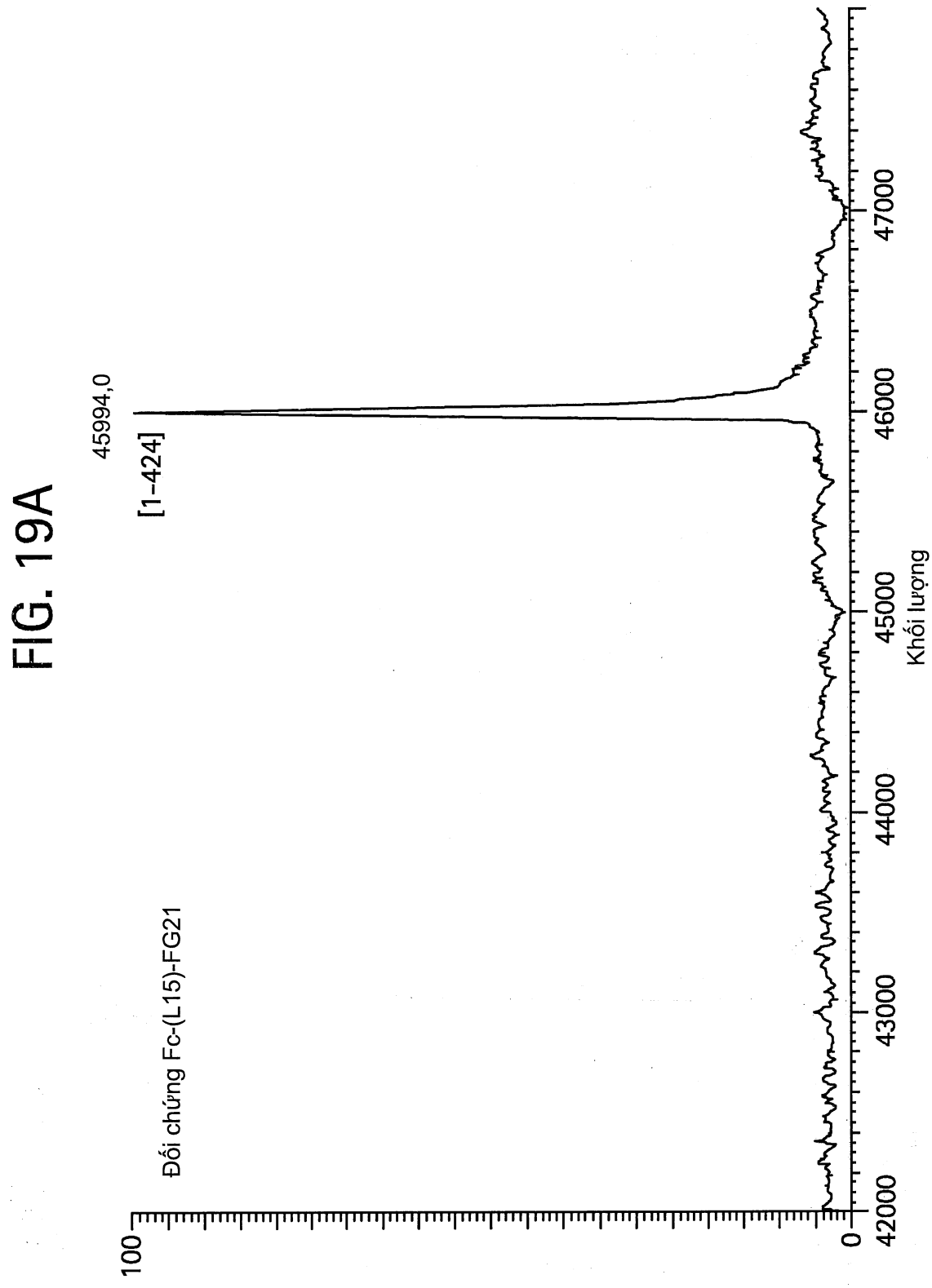

45994,0
[1-424]
Đối chứng Fc-(L15)-FG21
100
0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 19B

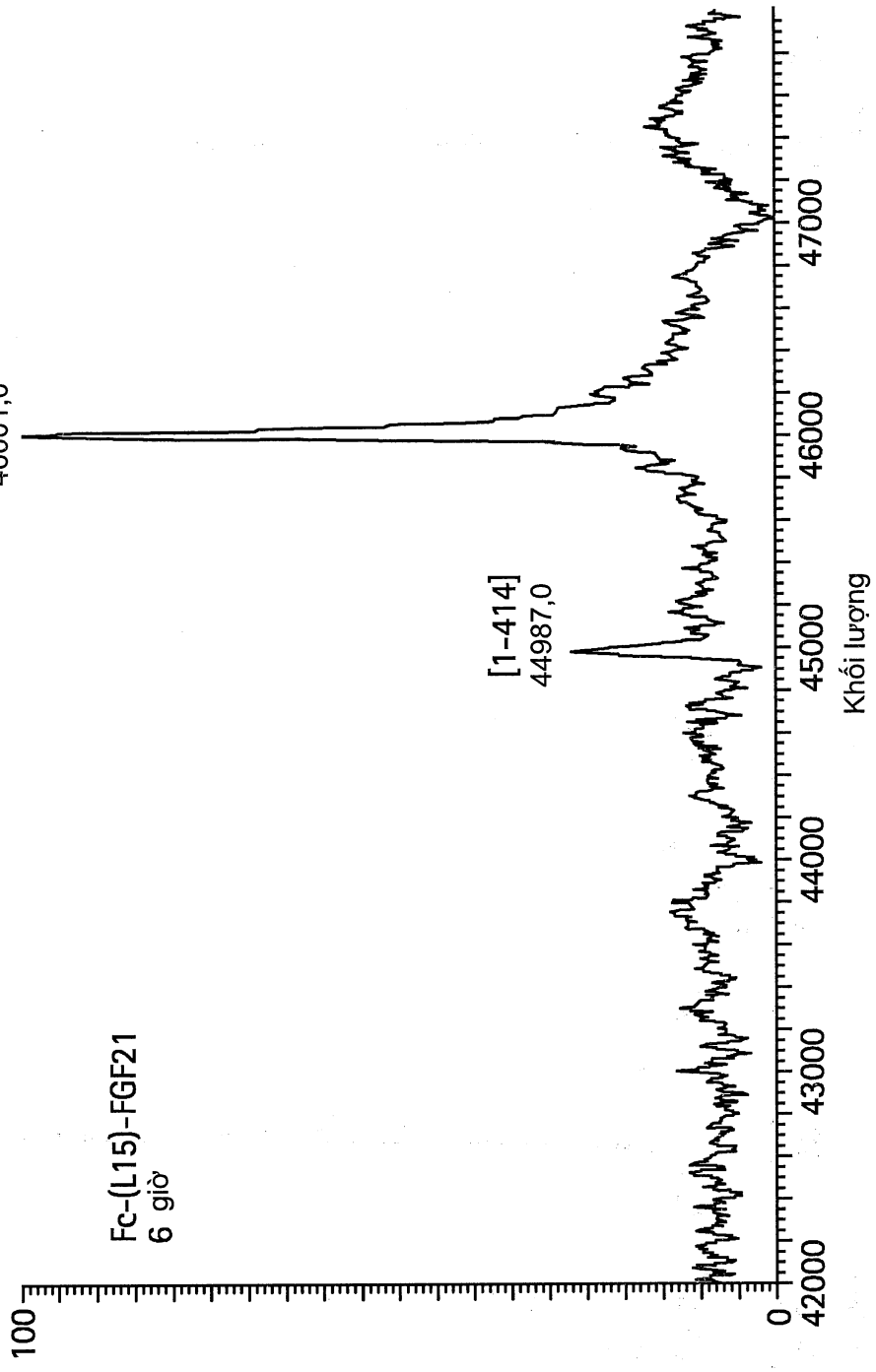

Fc-(L15)-FGF21
6 giờ
100
0
[1-424]
46001,0
[1-414]
44987,0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 19C

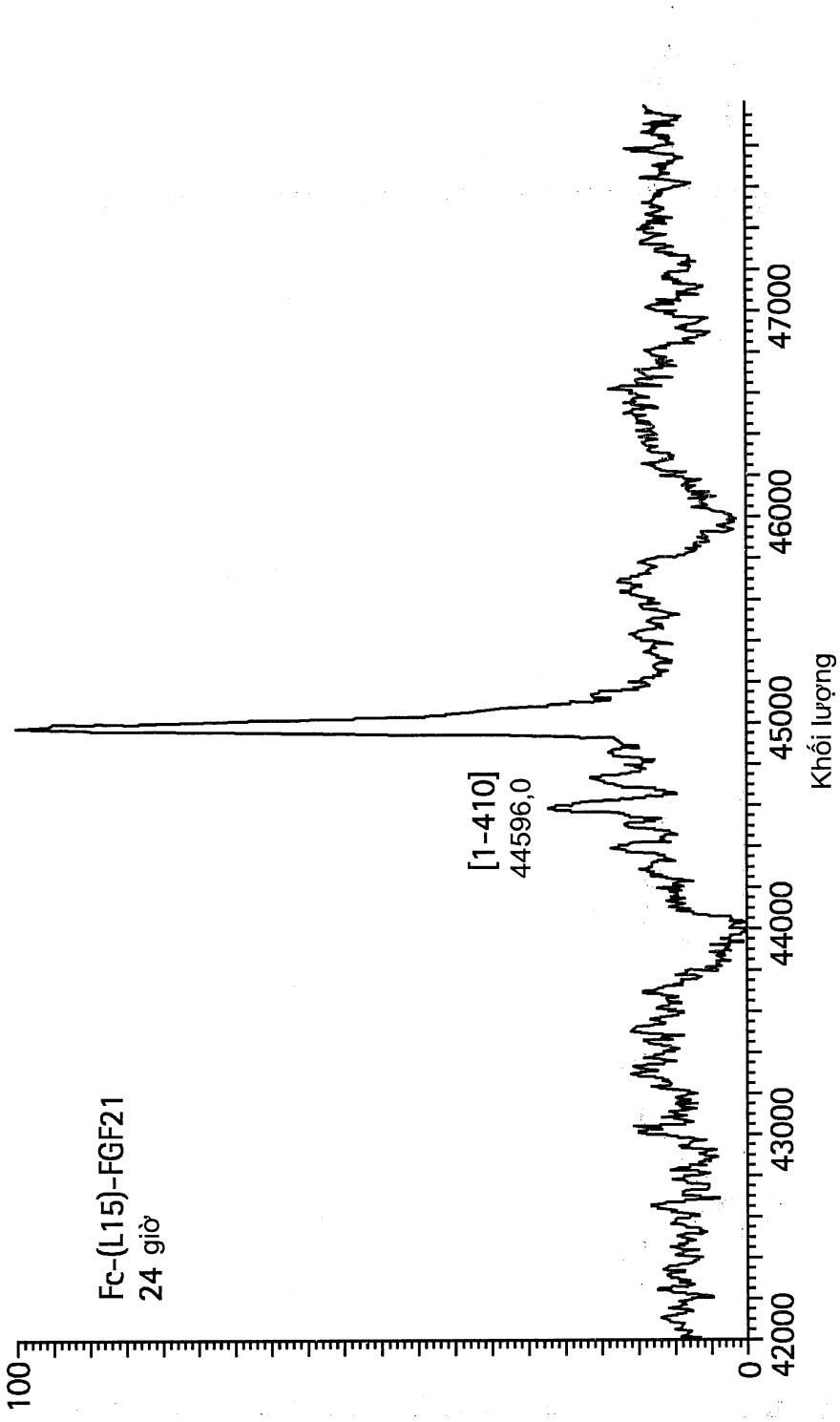

Fc-(L15)-FGF21
24 giờ
[1-414]
44979,0
[1-410]
44596,0
100
0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 19D

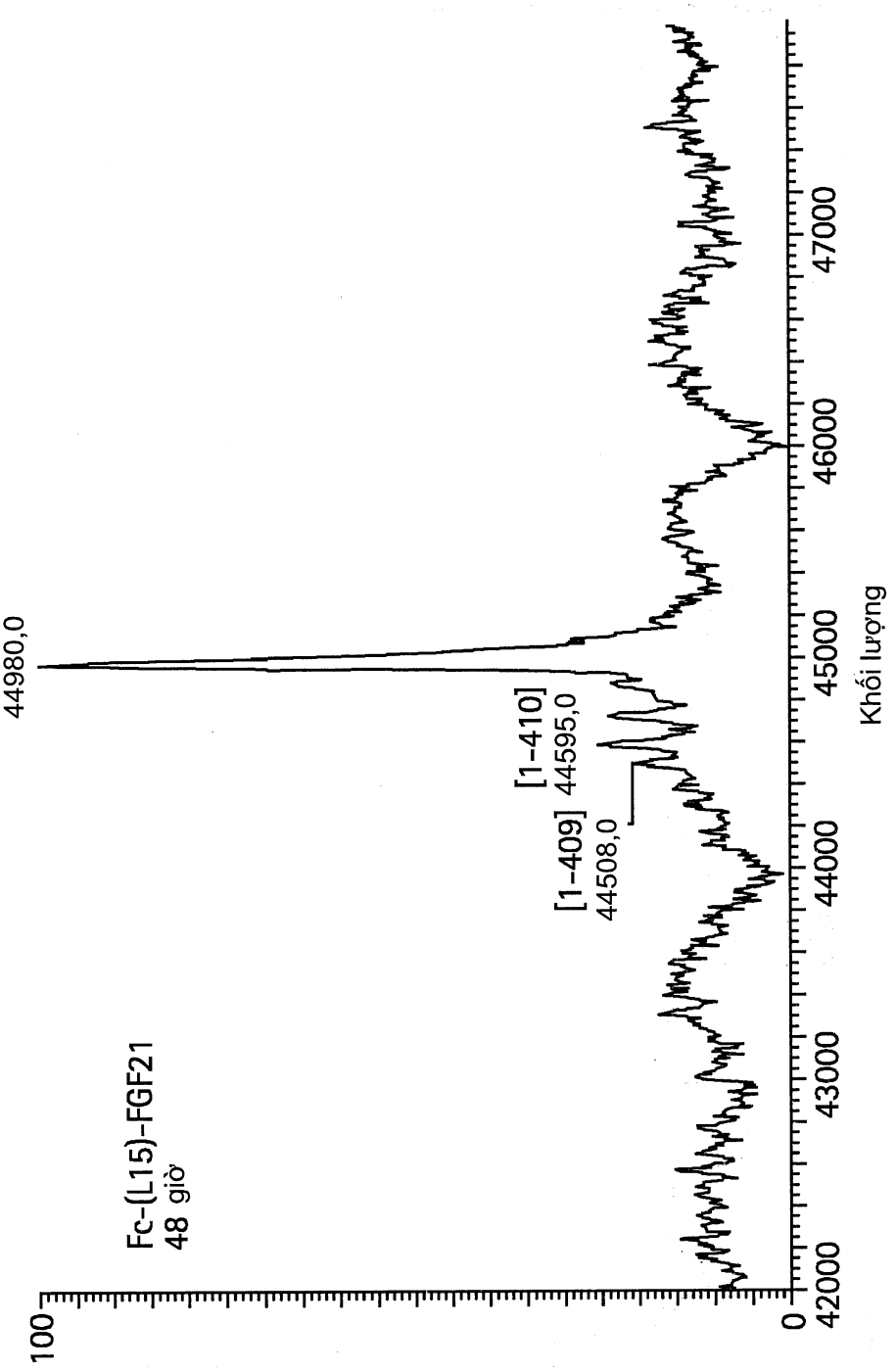

Fc-(L15)-FGF21
48 giờ
100
0
[1-414]
44980,0
[1-410]
44595,0
[1-409]
44508,0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 20A

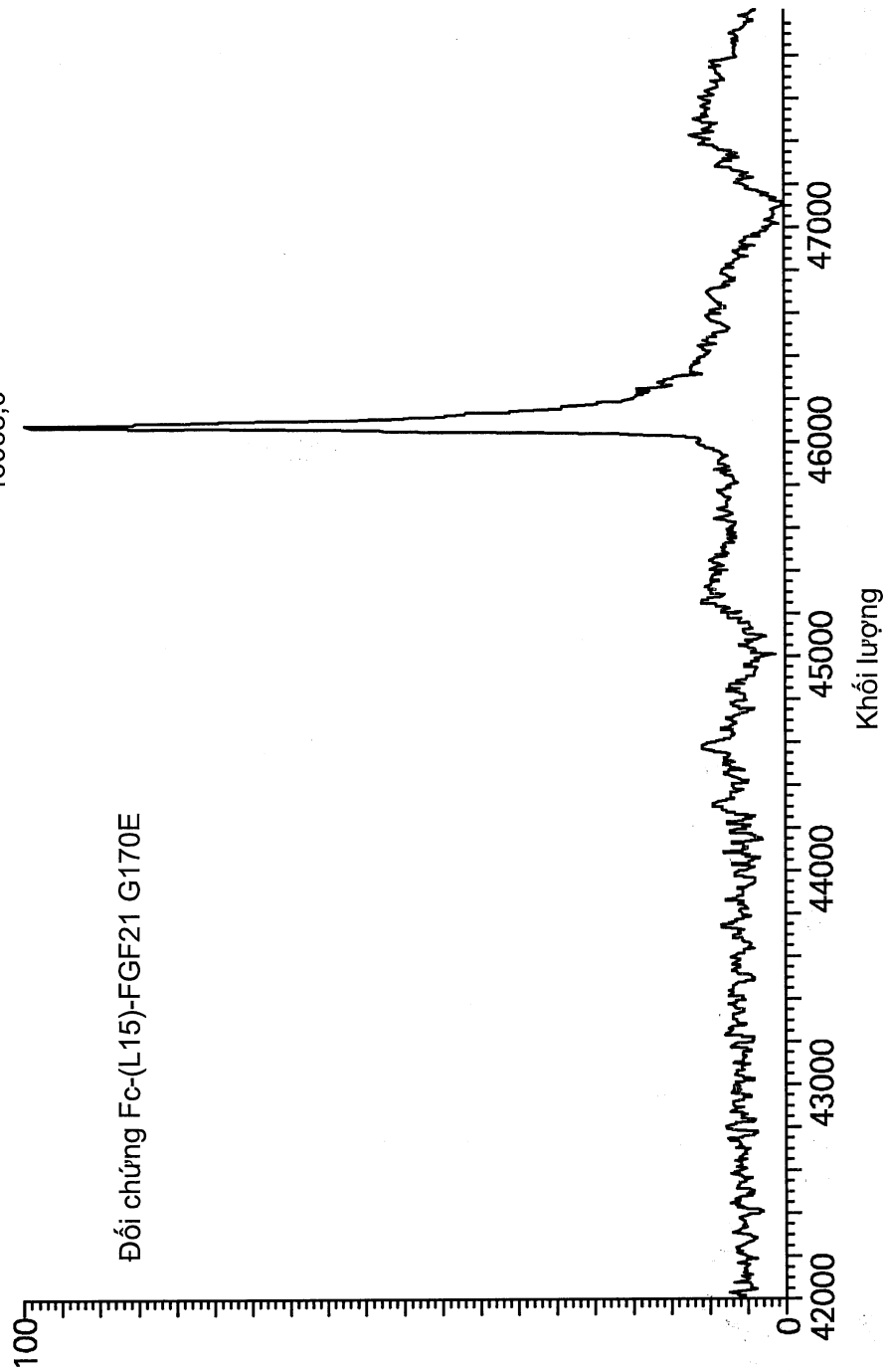

[1-424]
46068,0
Đối chứng Fc-(L15)-FGF21 G170E
100
0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 20B

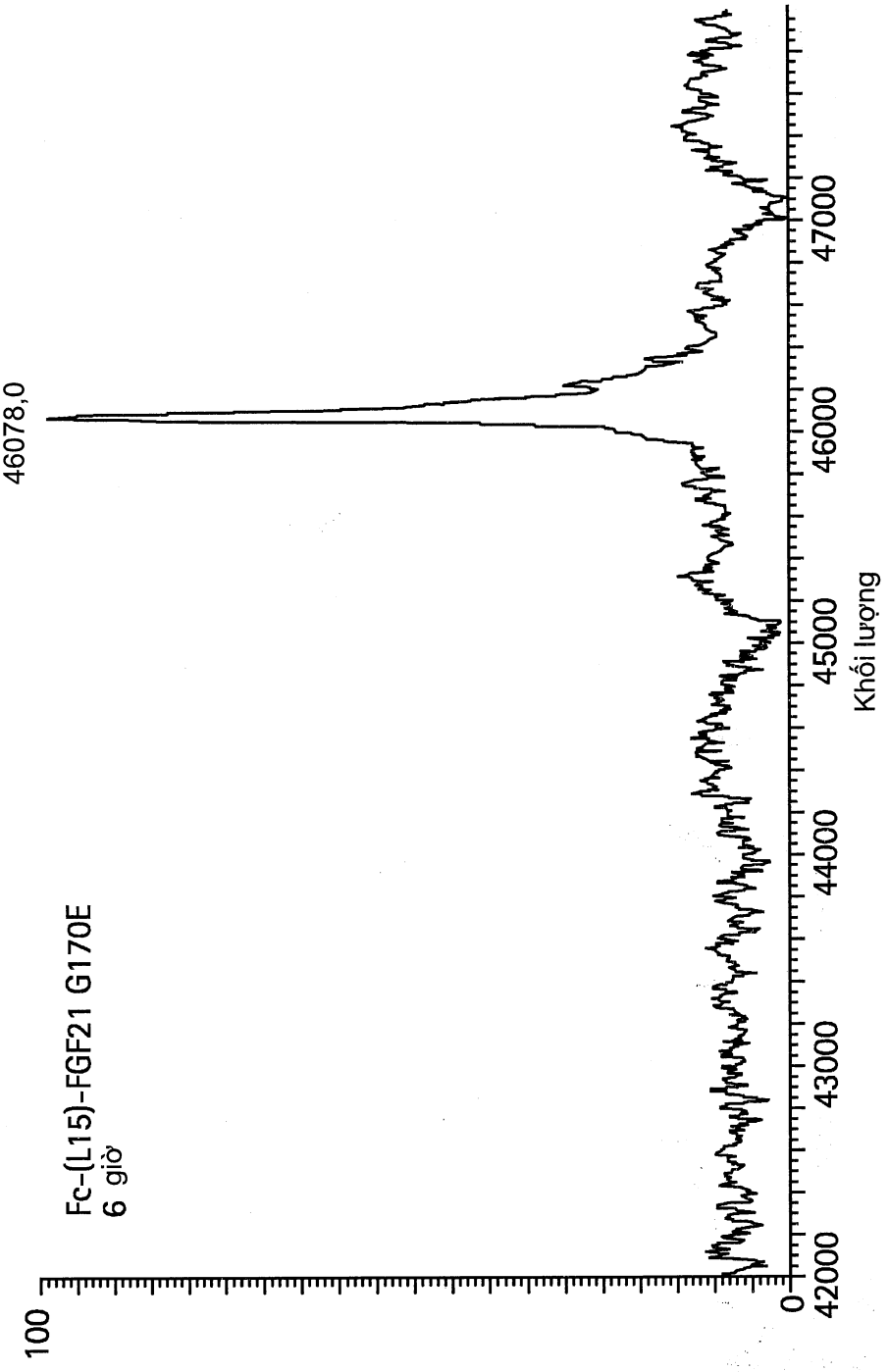

[1-424]
46078,0
Fc-(L15)-FGF21 G170E
6 giờ
100
0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 20C

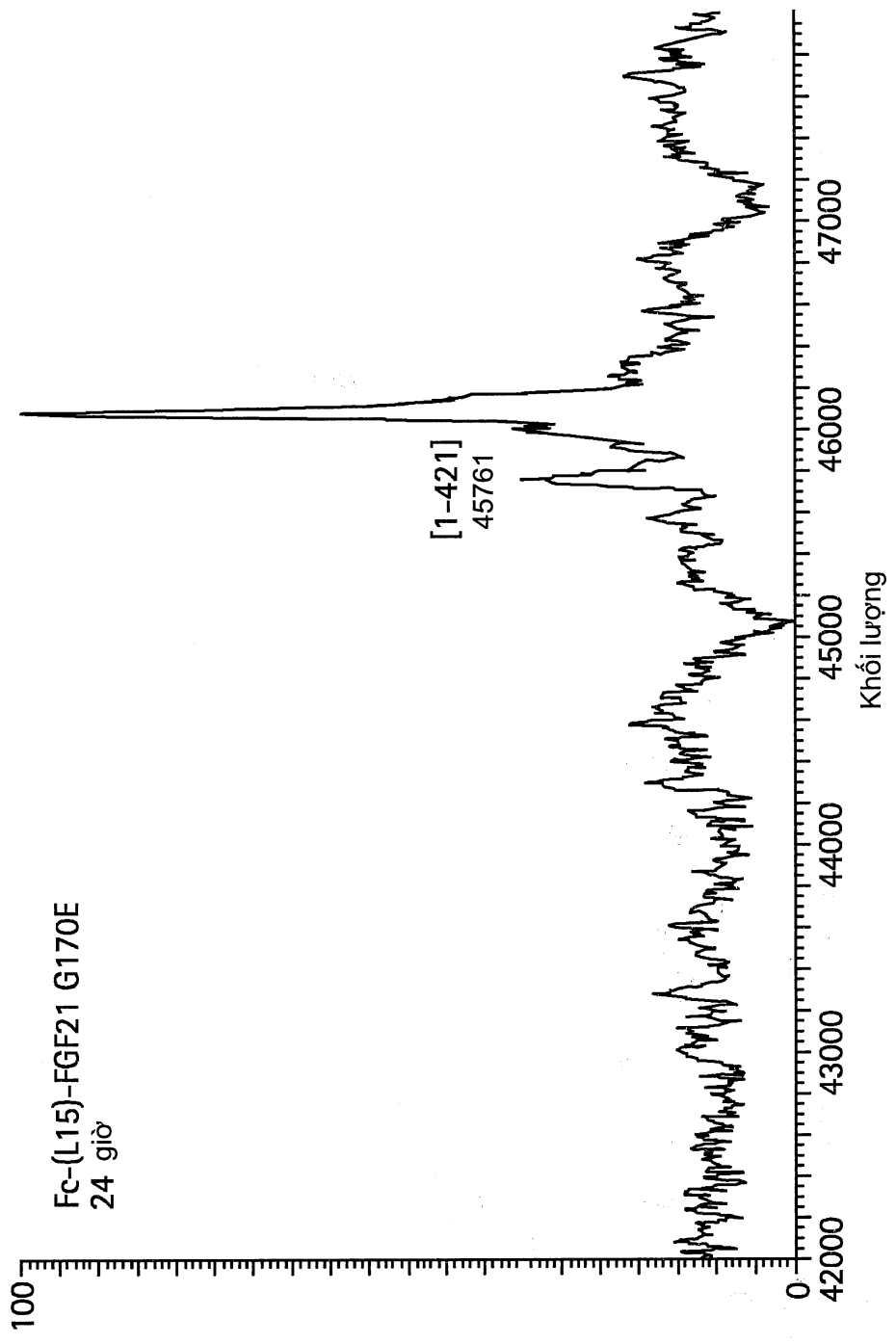

Fc-(L15)-FGF21 G170E
24 giờ
[1-424]
46074,0
[1-421]
45761
100
0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 20D

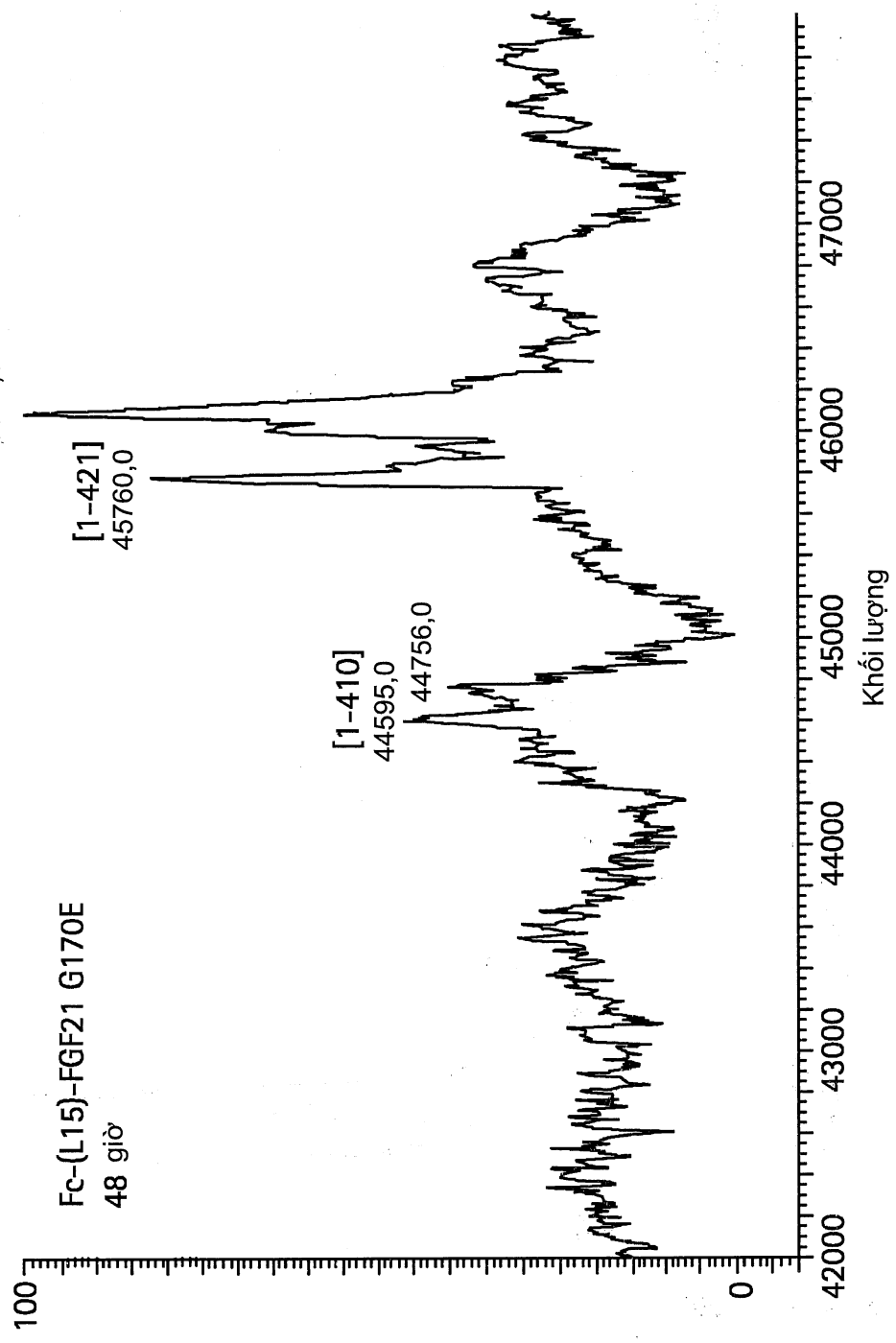

Fc-(L15)-FGF21 G170E
48 giờ
[1-424]
46072,0
[1-421]
45760,0
[1-410]
44595,0
44756,0
100
0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 21A

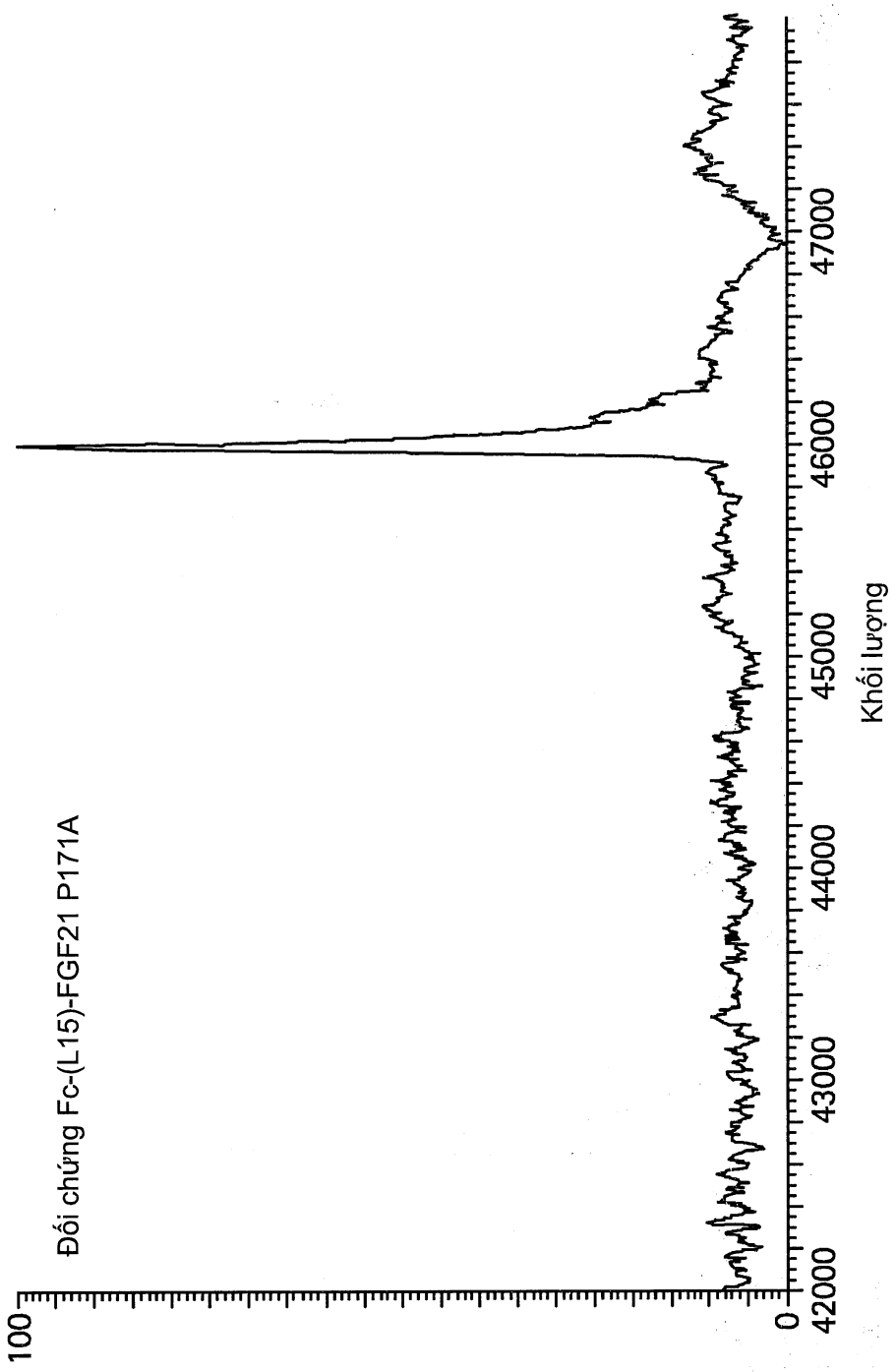

[1-424]
45970,0
Đối chứng Fc-(L15)-FGF21 P171A
100
0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 21B

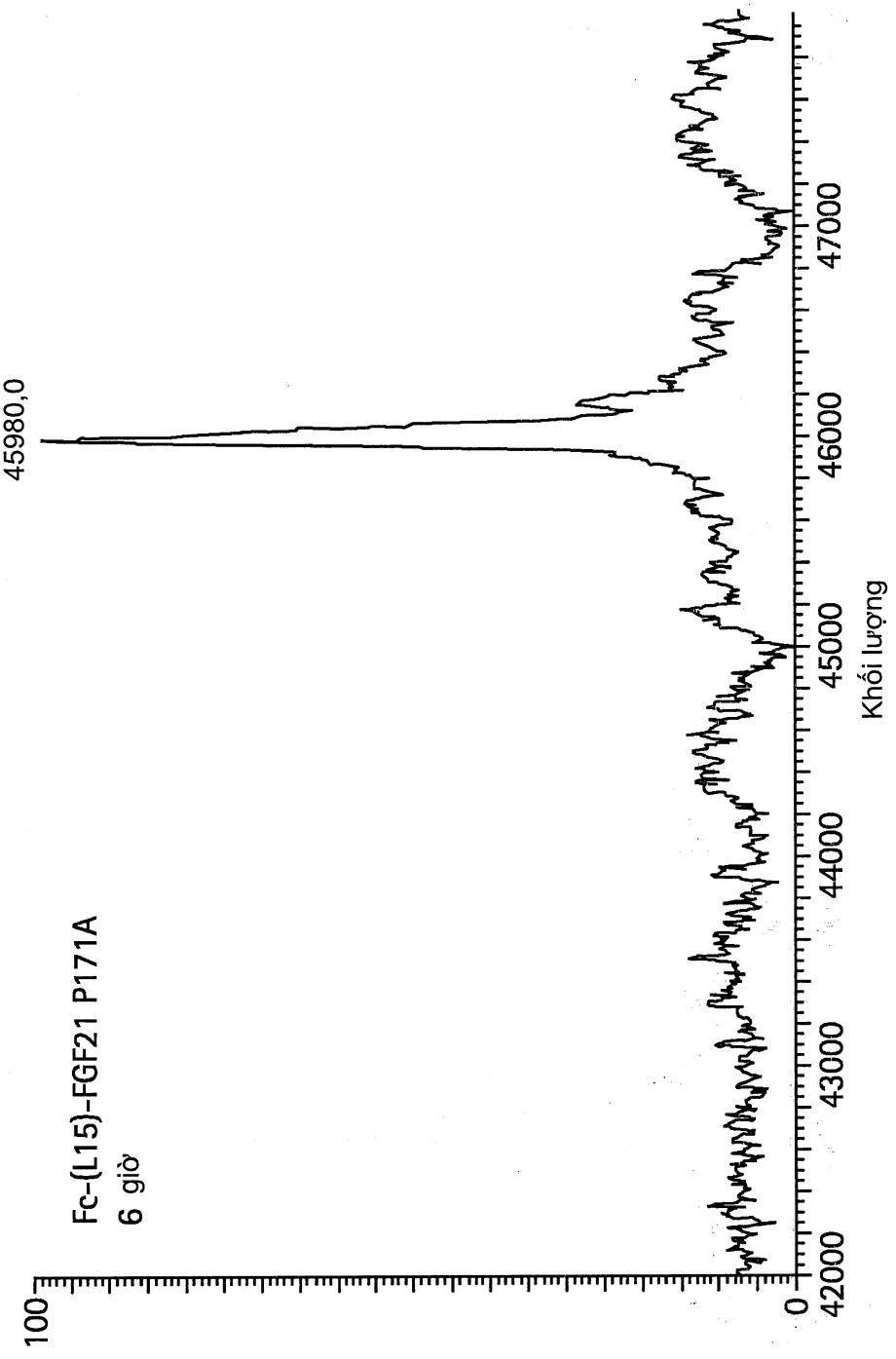

[1-424]
45980,0
Fc-(L15)-FGF21 P171A
6 giờ
100
0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 21C

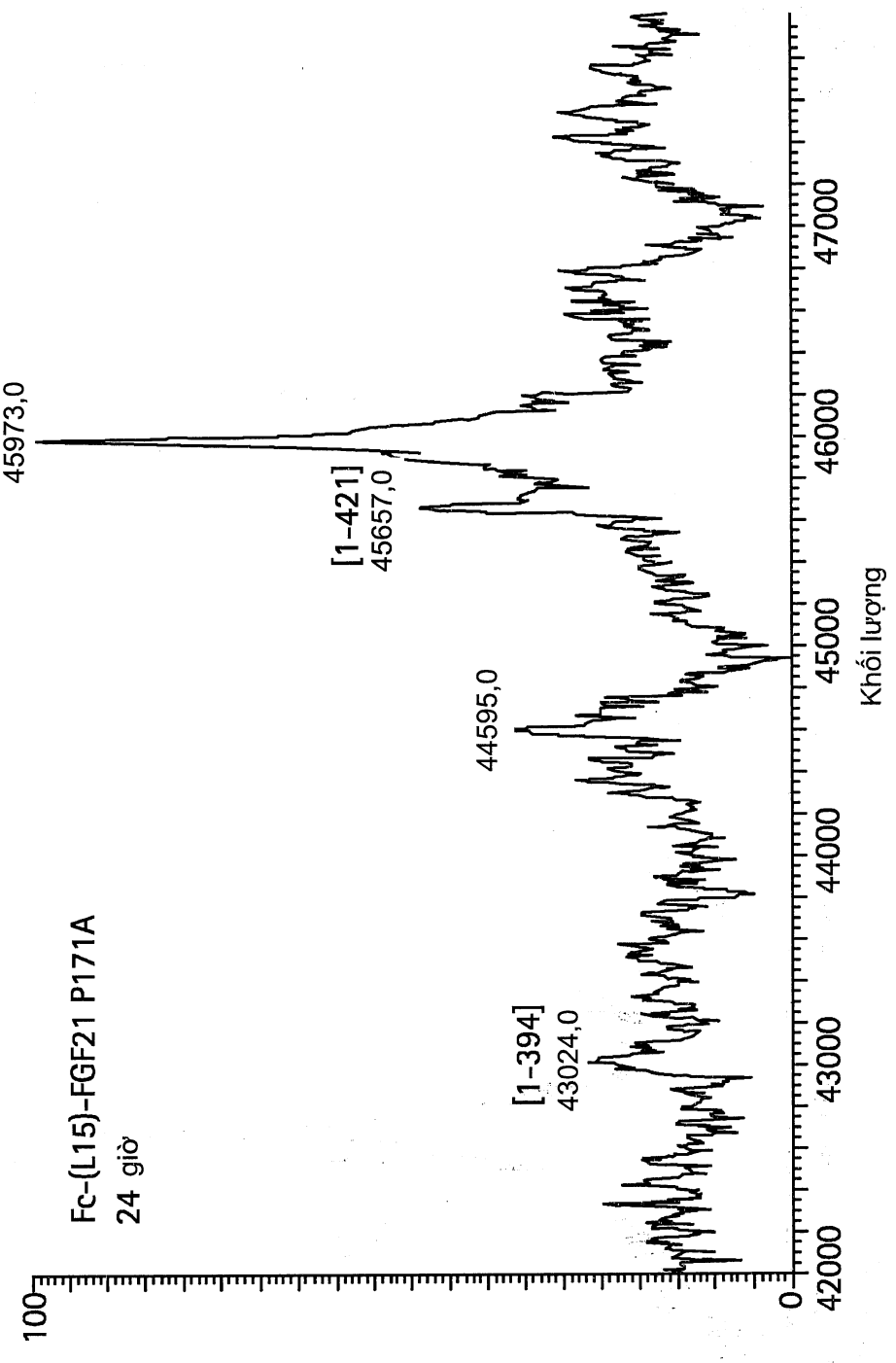

Fc-(L15)-FGF21 P171A
24 giờ
100
0
[1-424]
45973,0
[1-421]
45657,0
44595,0
[1-394]
43024,0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 21D

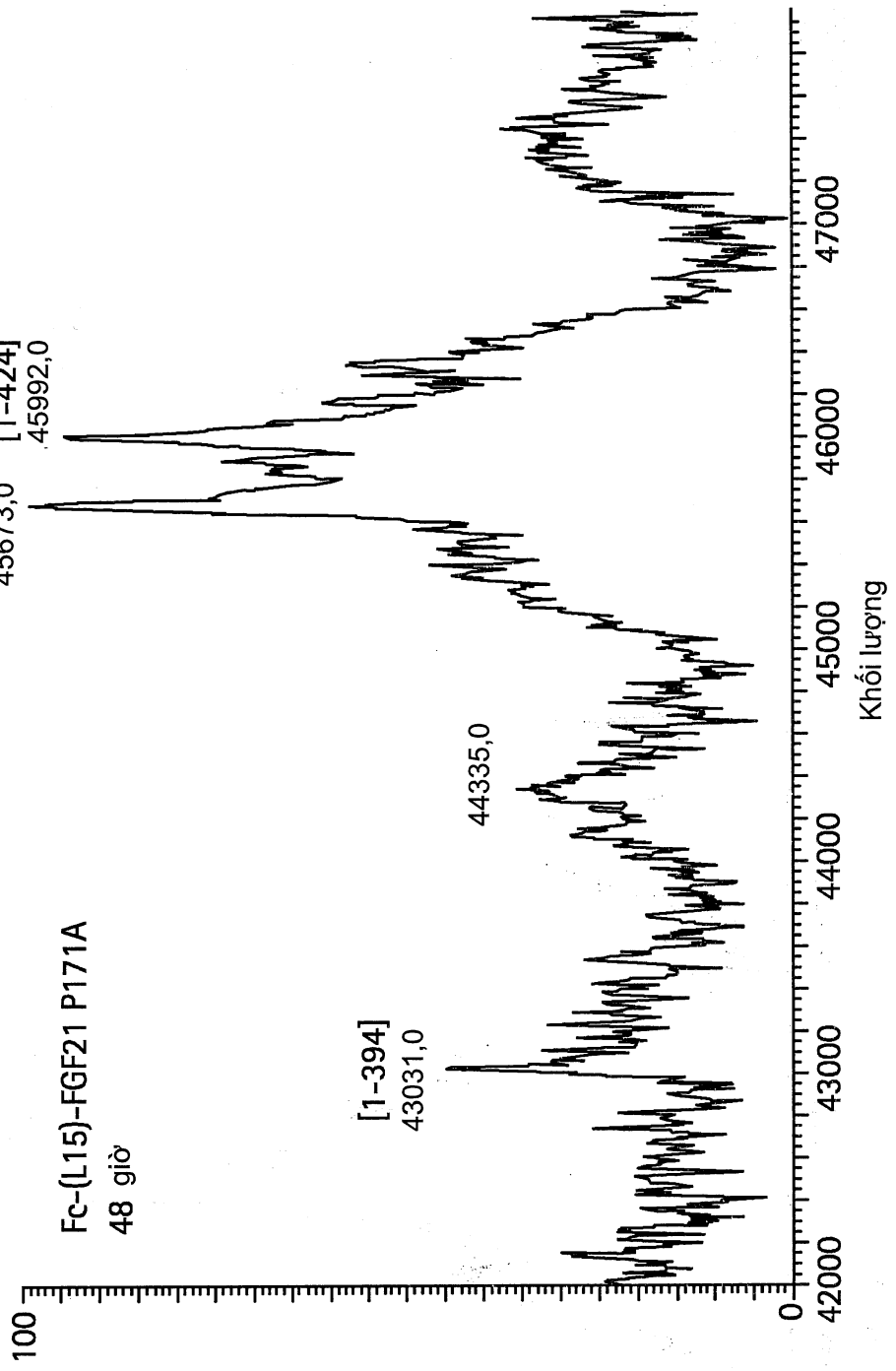

Fc-(L15)-FGF21 P171A
48 giờ
[1-421]
45673,0
[1-424]
45992,0
[1-394]
43031,0
44335,0
100
0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 22A

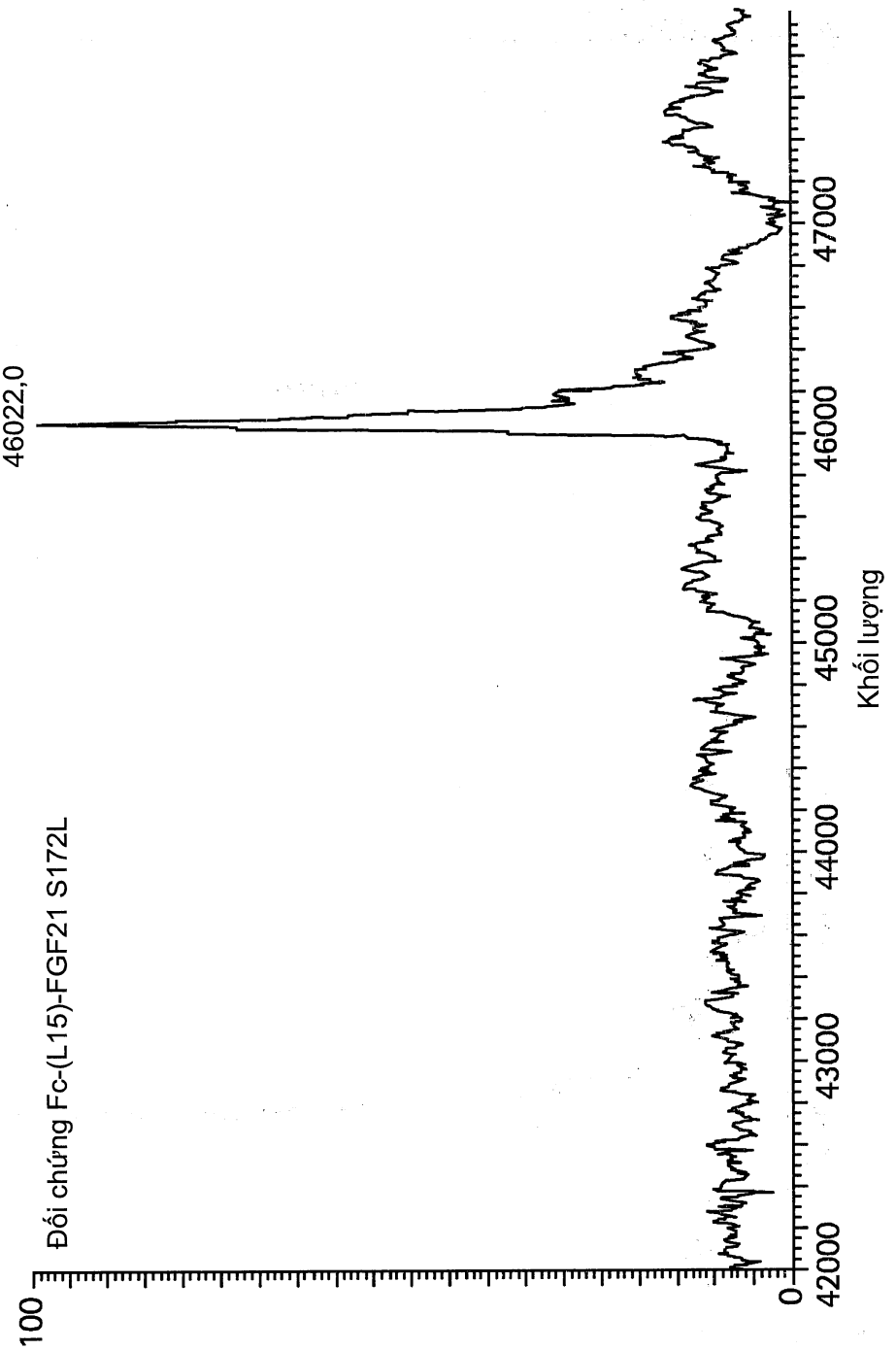

[1-424]
46022,0
Đối chứng Fc-(L15)-FGF21 S172L
100
0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 22B

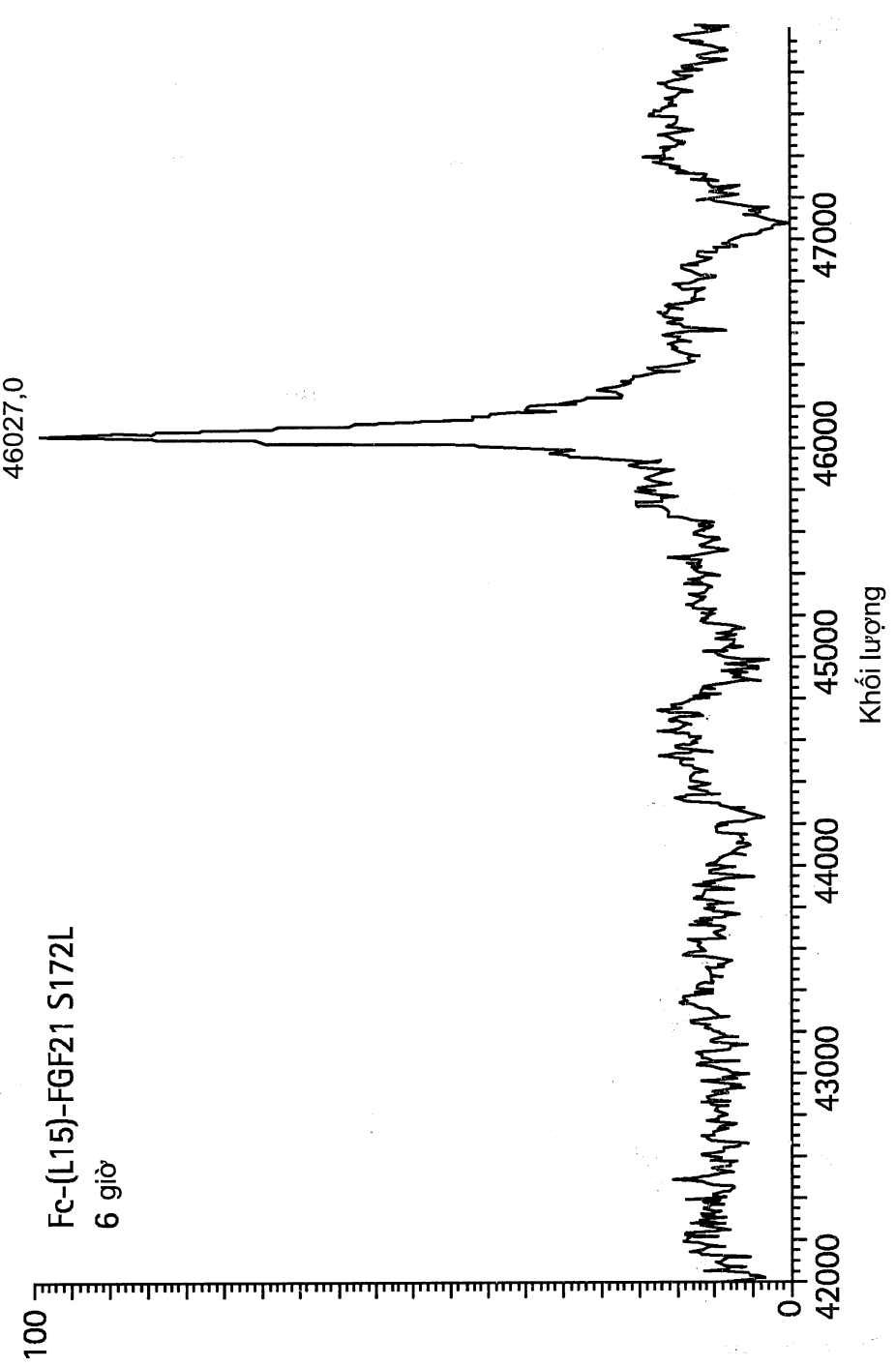

[1-424]
46027,0
Fc-(L15)-FGF21 S172L
6 giờ
100
0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 22C

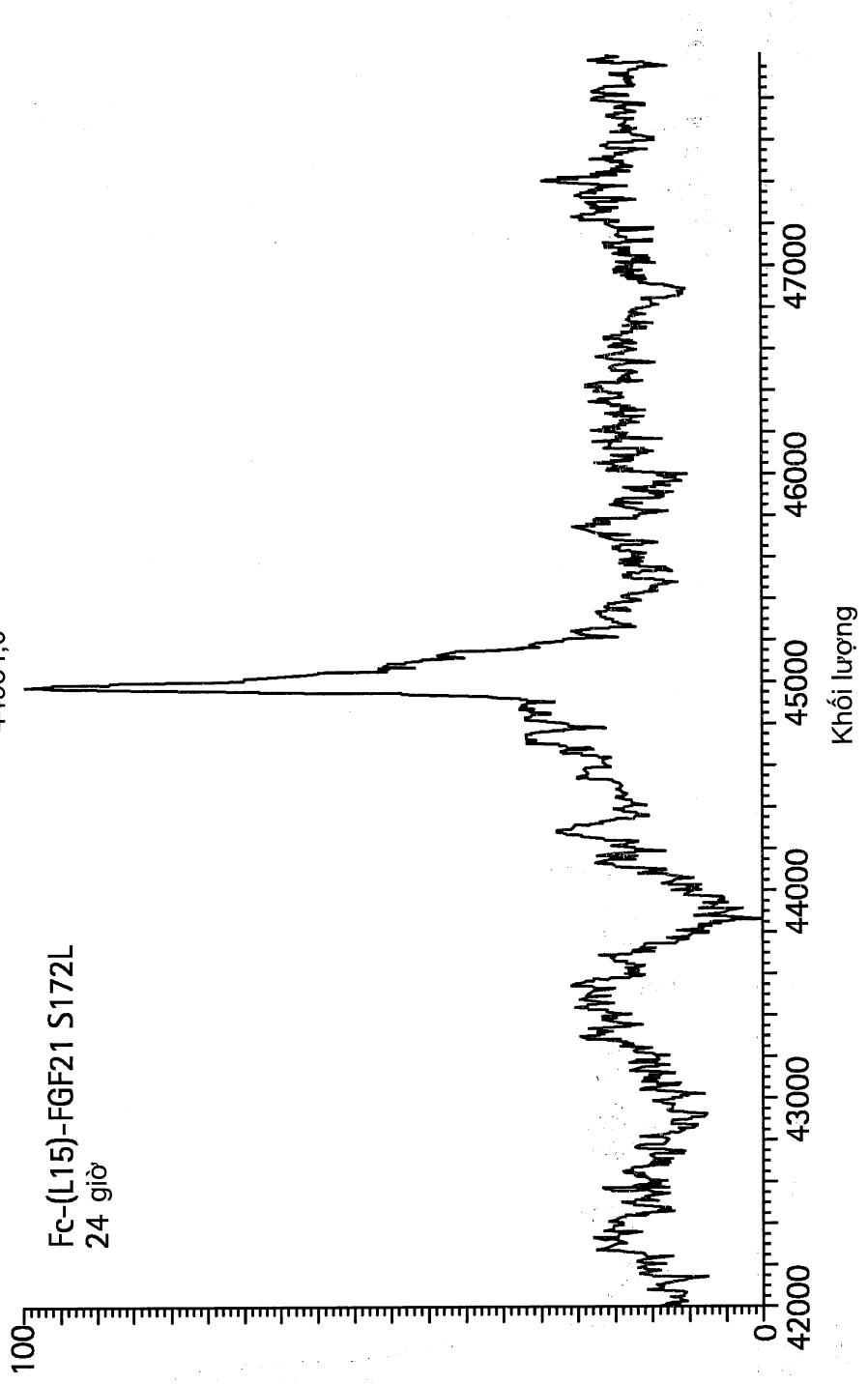

Fc-(L15)-FGF21 S172L
24 giờ
[1-414]
44984,0
100
0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 22D

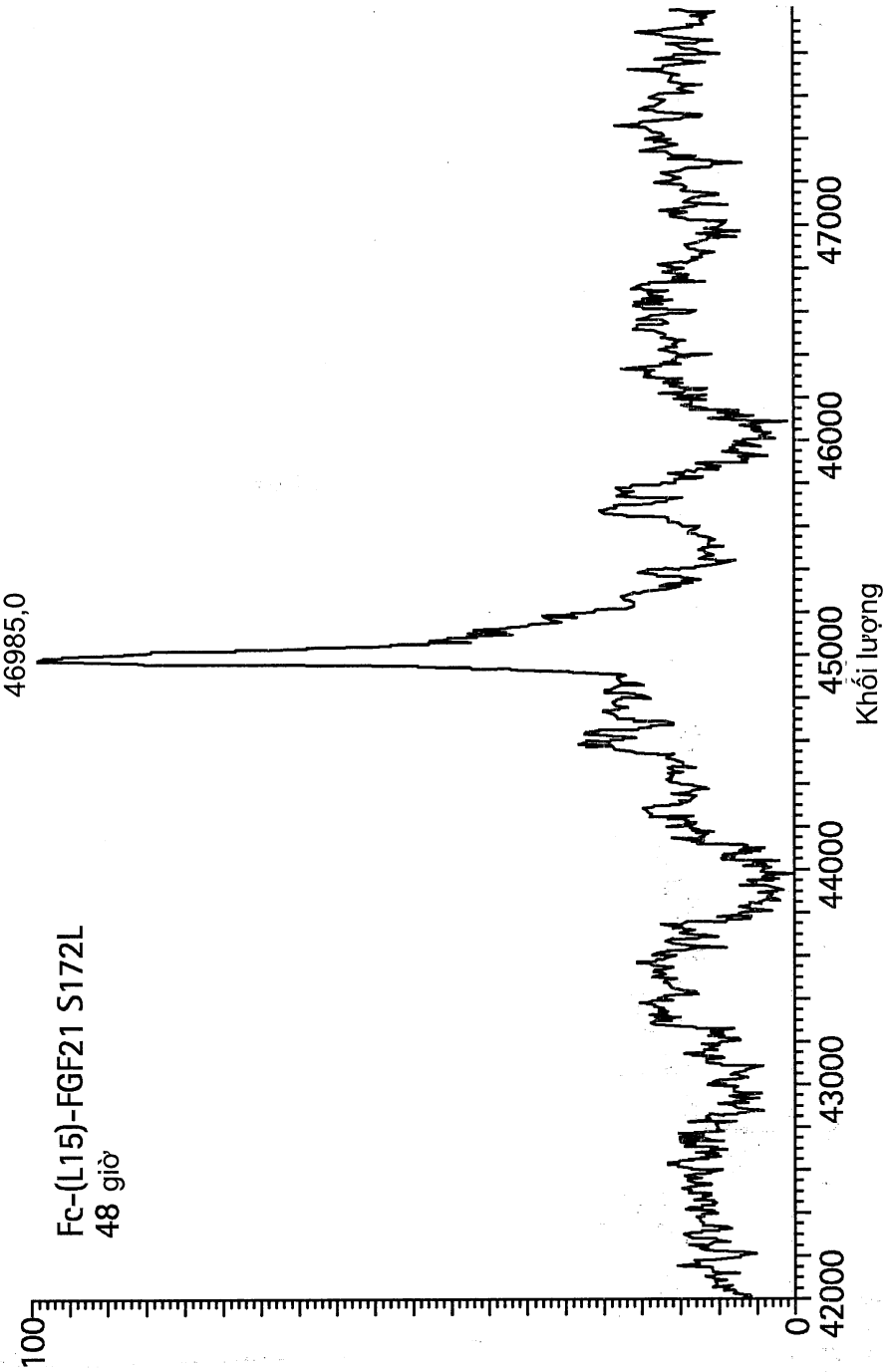

[1-414]
46985,0
Fc-(L15)-FGF21 S172L
48 giờ
100
0
42000
43000
44000
45000
46000
47000
Khối lượng

FIG. 23A

Fc-(L15)-FGF21

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGGSGGGSGG*
*GGS*HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQR
PDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQP
PDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

6 giờ (20%)
24 giờ (100%) [1-414]
48 giờ (~100%)

FIG. 23B

Fc-(L15)-FGF21 G170E

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGGSGGGSGG*
*GGS*HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQR
PDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQP
PDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS

6 giờ (0%)
24 giờ (20%) [1-442]
48 giờ (~40%)

FIG. 23C

Fc-(L15)-FGF21 P171A

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGGSGGGSGG*
*GGS*HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQR
PDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQP
PDVGSSDPLSMVGASQGRSPSYAS

6 giờ (0%)
24 giờ (~30%) [1-421]
48 giờ (~50%)

FIG. 23D

Fc-(L15)-FGF21 S172L

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELYKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGGSGGGSGG*
*GGS*HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQR
PDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQP
PDVGSSDPLSMVGPLQGRSPSYAS

6 giờ (0%)
24 giờ (100%) [1-414]
48 giờ (100%)

FIG. 24A

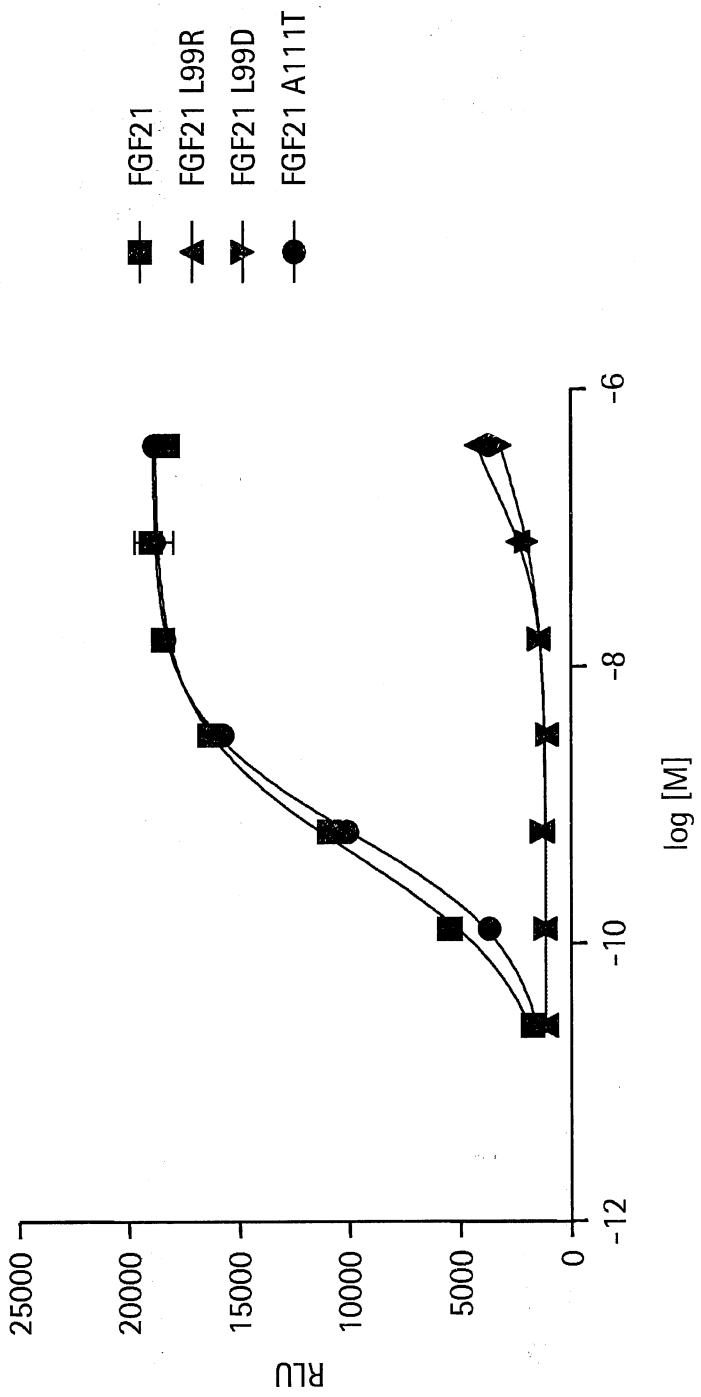

FGF21
FGF21 L99R
FGF21 L99D
FGF21 A111T
RLU
25000
20000
15000
10000
5000
0
-12
-10
-8
-6
log [M]

FIG. 24B

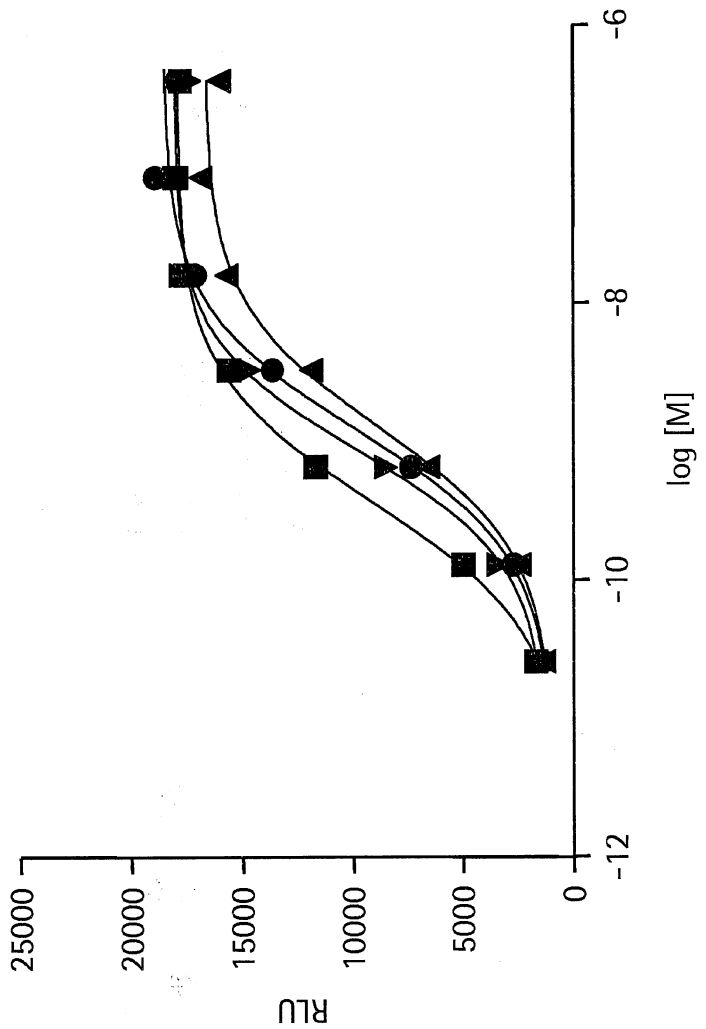

FGF21
FGF21 A129D
FGF21 A129Q
FGF21 A134K
RLU
25000
20000
15000
10000
5000
0
-12
-10
-8
-6
log [M]

FIG. 24C

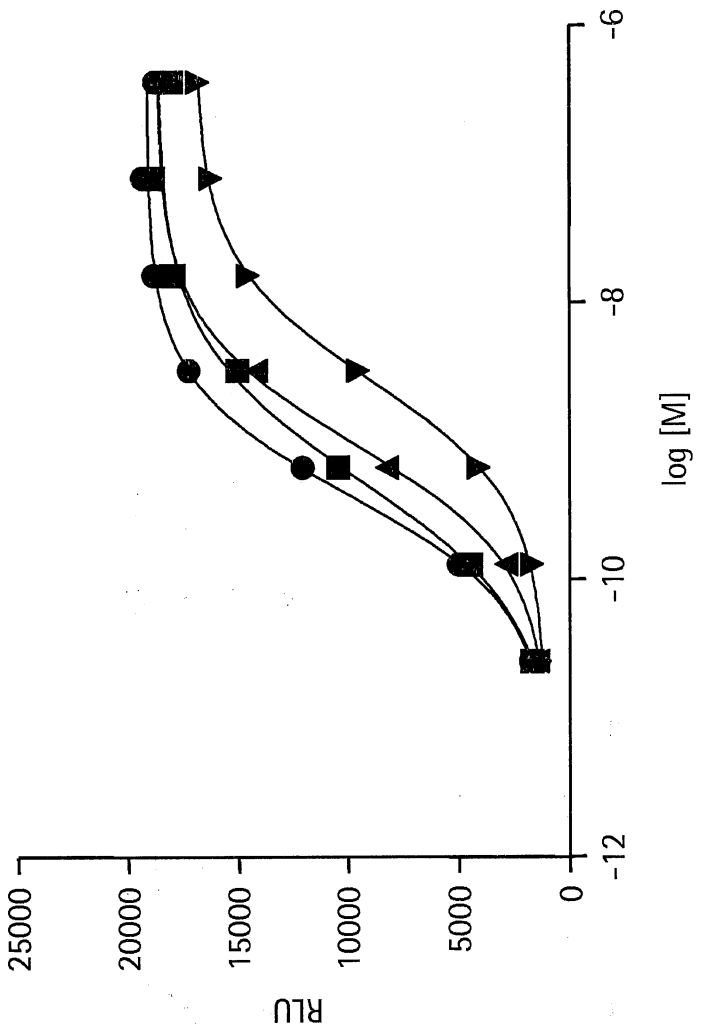

FGF21
FGF21 A134Y
FGF21 A134E
FGF21 A129K
RLU
25000
20000
15000
10000
5000
0
-12
-10
-8
-6
log [M]

FIG. 25A

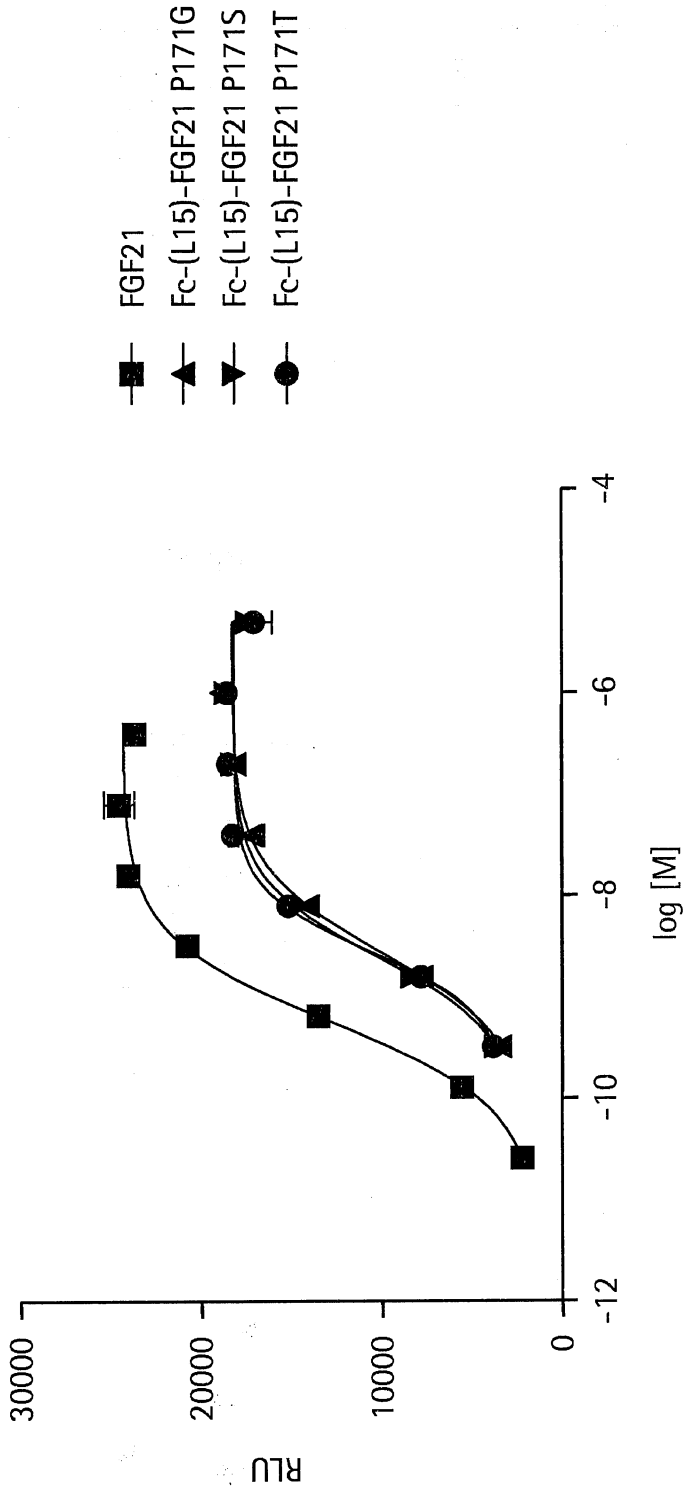

FGF21
Fc-(L15)-FGF21 P171G
Fc-(L15)-FGF21 P171S
Fc-(L15)-FGF21 P171T
RLU
30000
20000
10000
0
-12
-10
-8
-6
-4
log [M]

FIG. 25B

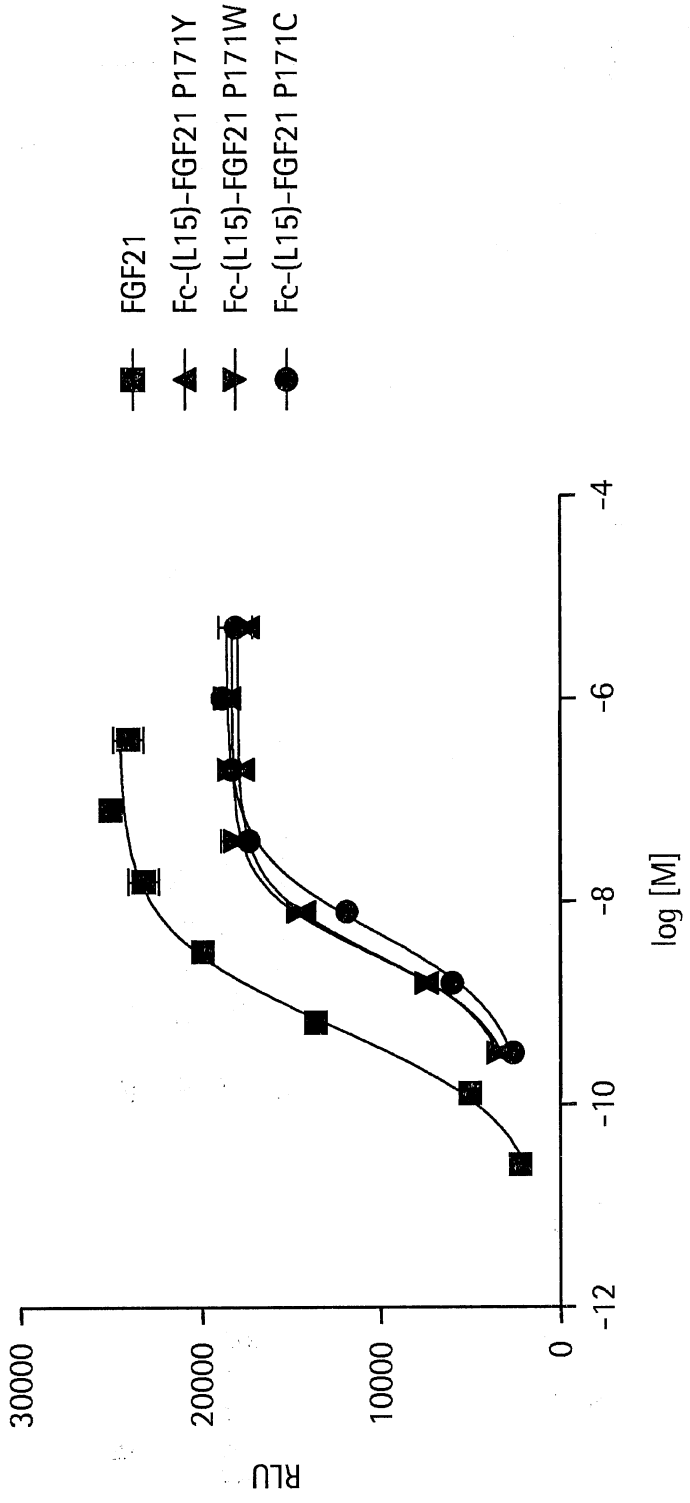

FGF21
Fc-(L15)-FGF21 P171Y
Fc-(L15)-FGF21 P171W
Fc-(L15)-FGF21 P171C
RLU
30000
20000
10000
0
-12
-10
-8
-6
-4
log [M]

FIG. 25C

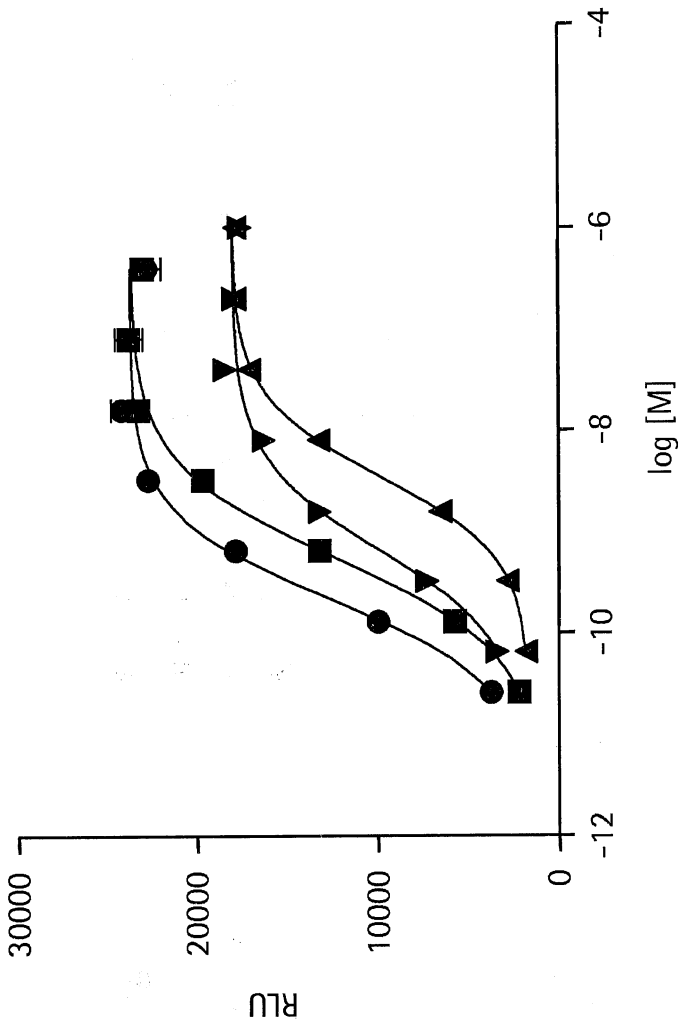

FGF21
Fc-(L15)-FGF21
Fc-(L15)-FGF21 (A45K, G170E)
FGF21 A45K
RLU
30000
20000
10000
0
-12
-10
-8
-6
-4
log [M]

FIG. 25D

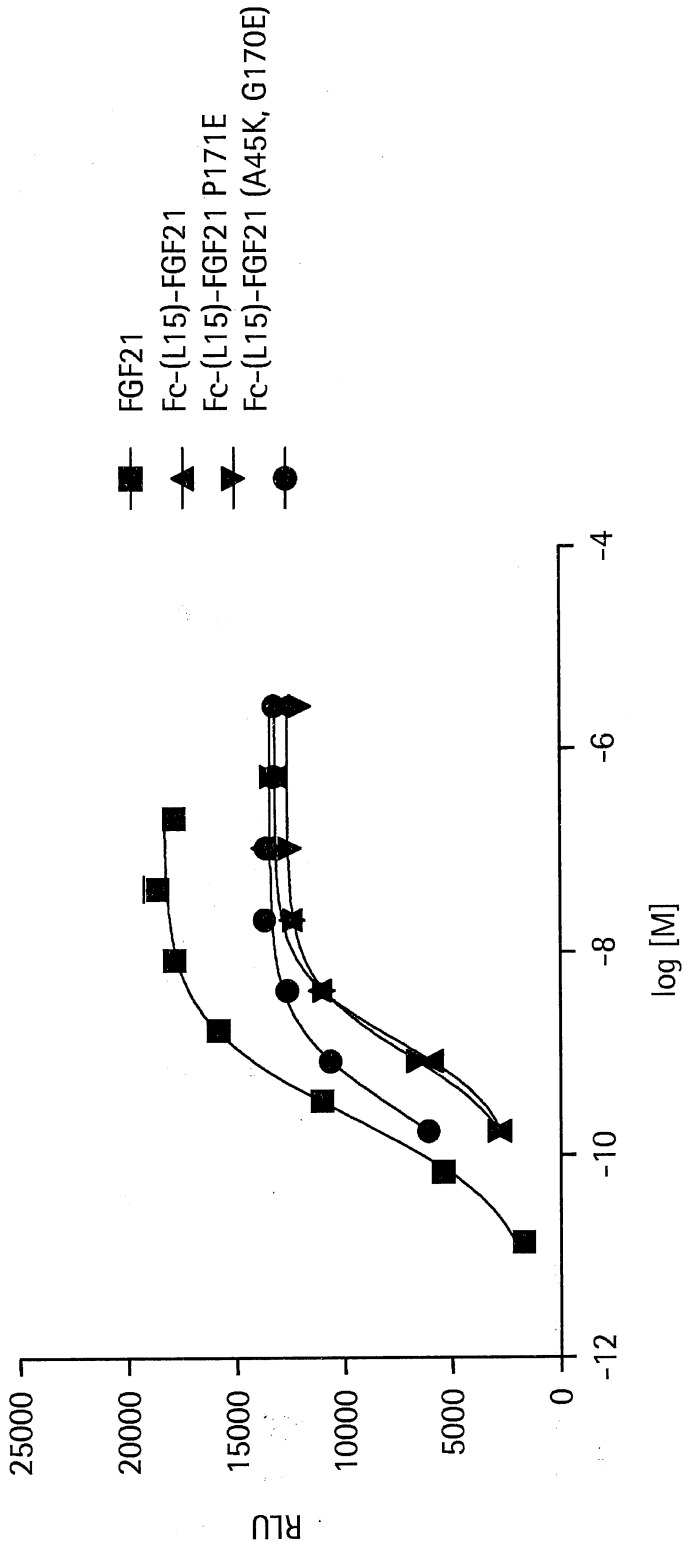

FGF21
Fc-(L15)-FGF21
Fc-(L15)-FGF21 P171E
Fc-(L15)-FGF21 (A45K, G170E)
RLU
25000
20000
15000
10000
5000
0
-12
-10
-8
-6
-4
log [M]

FIG. 26A

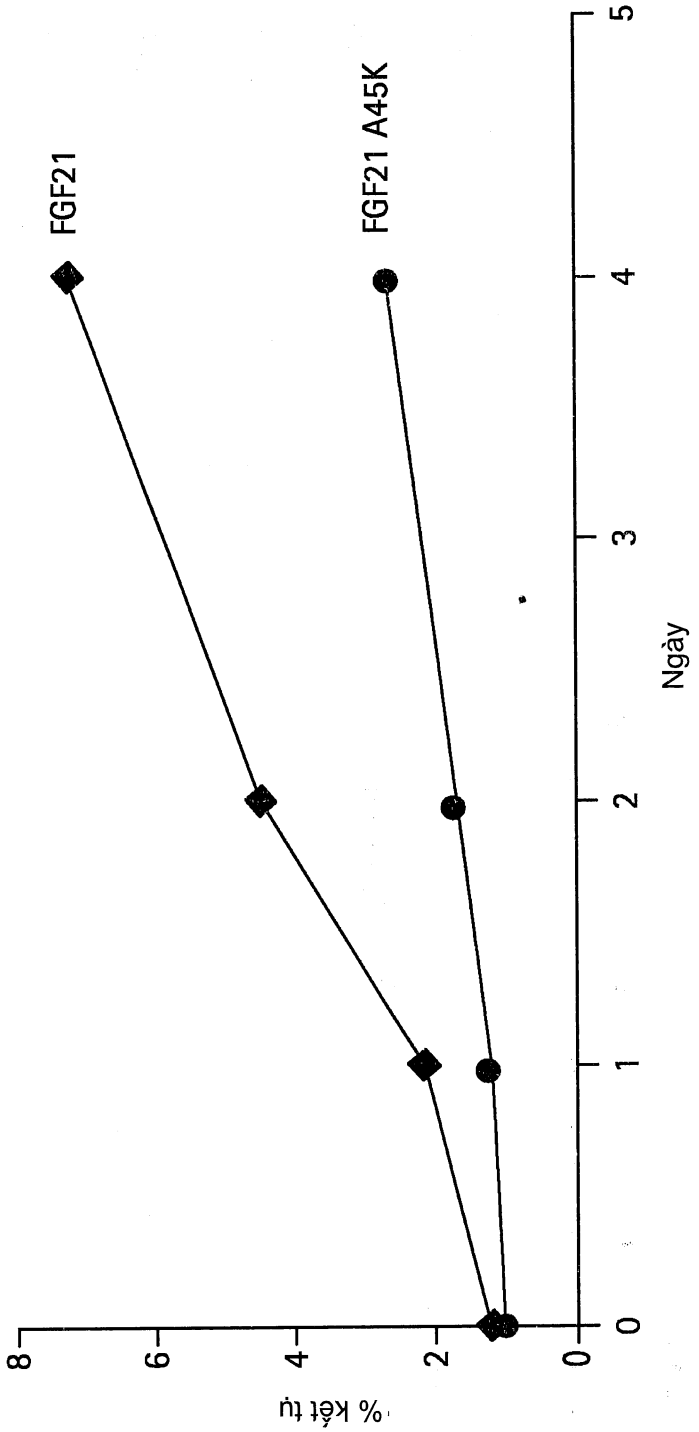


FIG. 26B

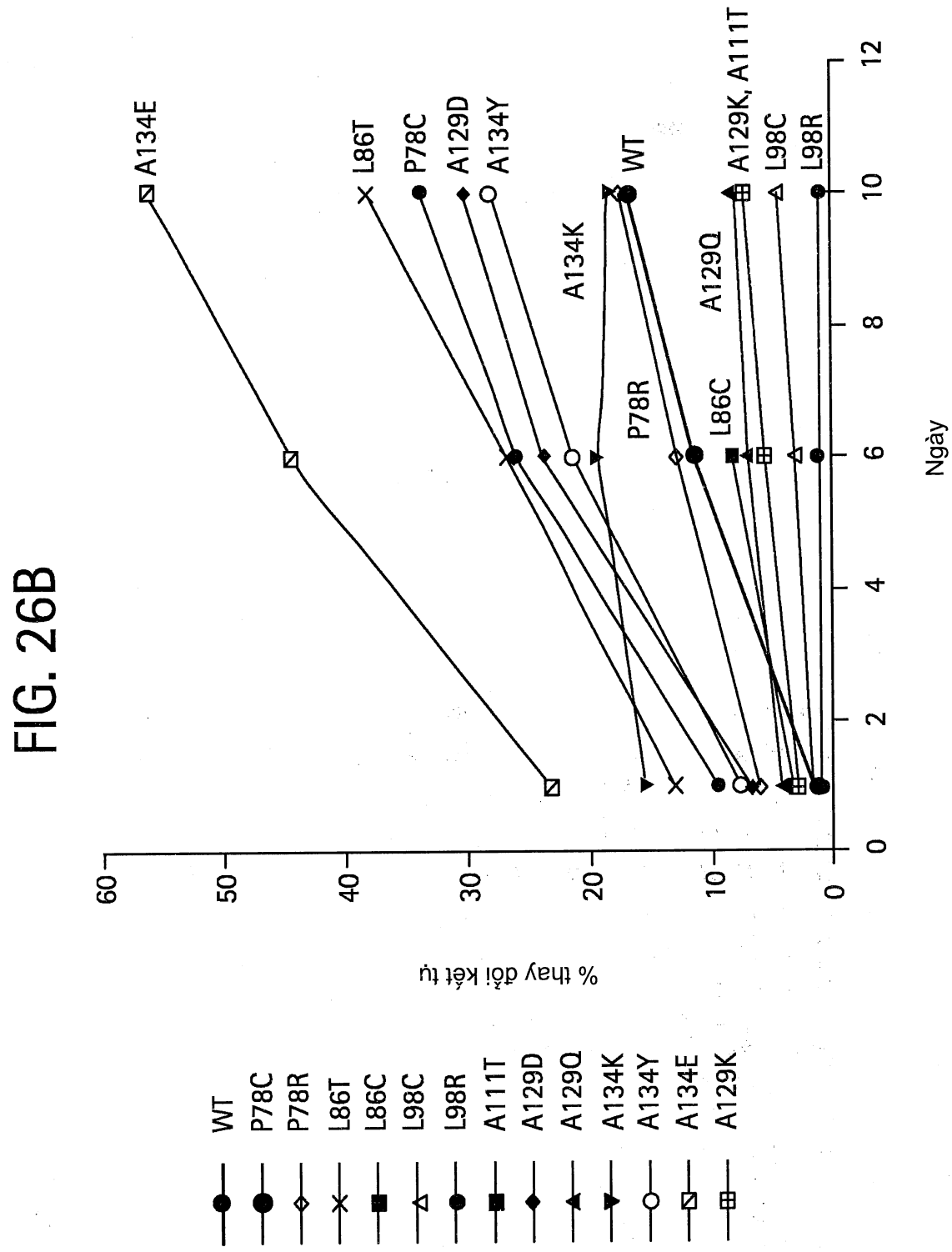

% thay đổi kết tụ
Ngày
0
10
20
30
40
50
60
0
2
4
6
8
10
12
A134E
L86T
P78C
A129D
A134Y
A134K
WT
P78R
L86C
A129Q
A129K, A111T
L98C
L98R
WT
P78C
P78R
L86T
L86C
L98C
L98R
A111T
A129D
A129Q
A134K
A134Y
A134E
A129K

FIG. 27

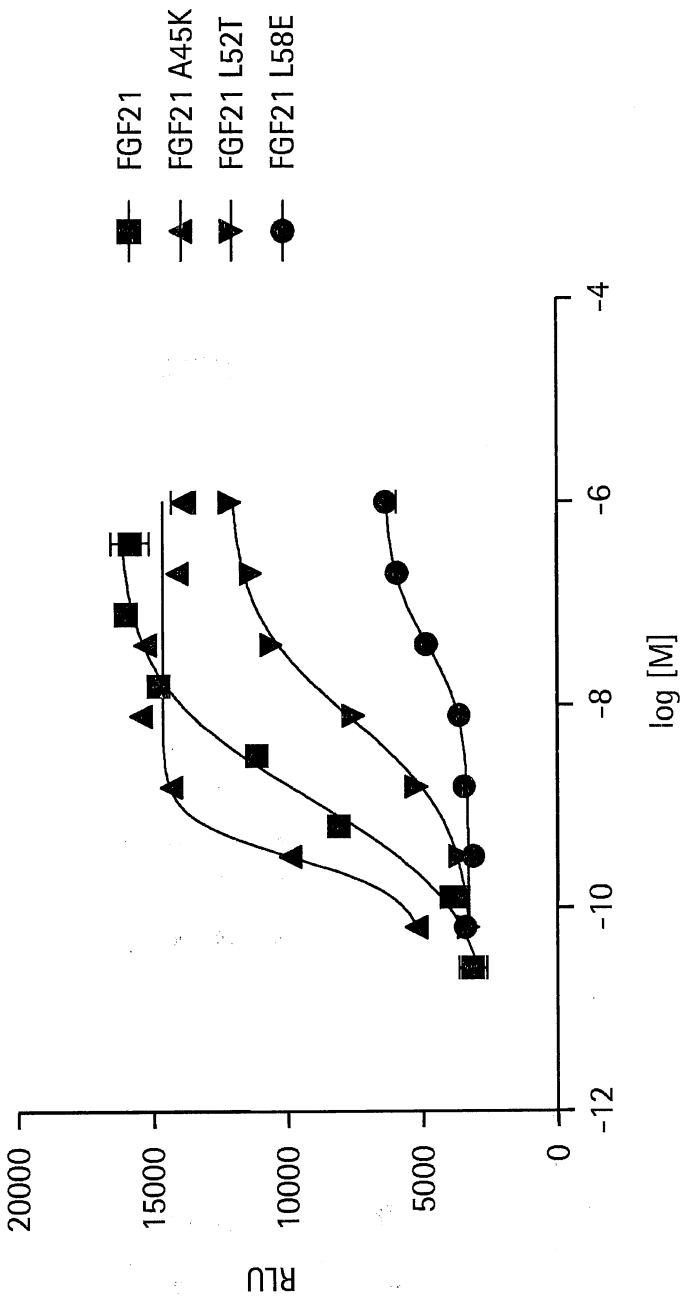

FGF21
FGF21 A45K
FGF21 L52T
FGF21 L58E
RLU
20000
15000
10000
5000
0
-12
-10
-8
-6
-4
log [M]

FIG. 28A

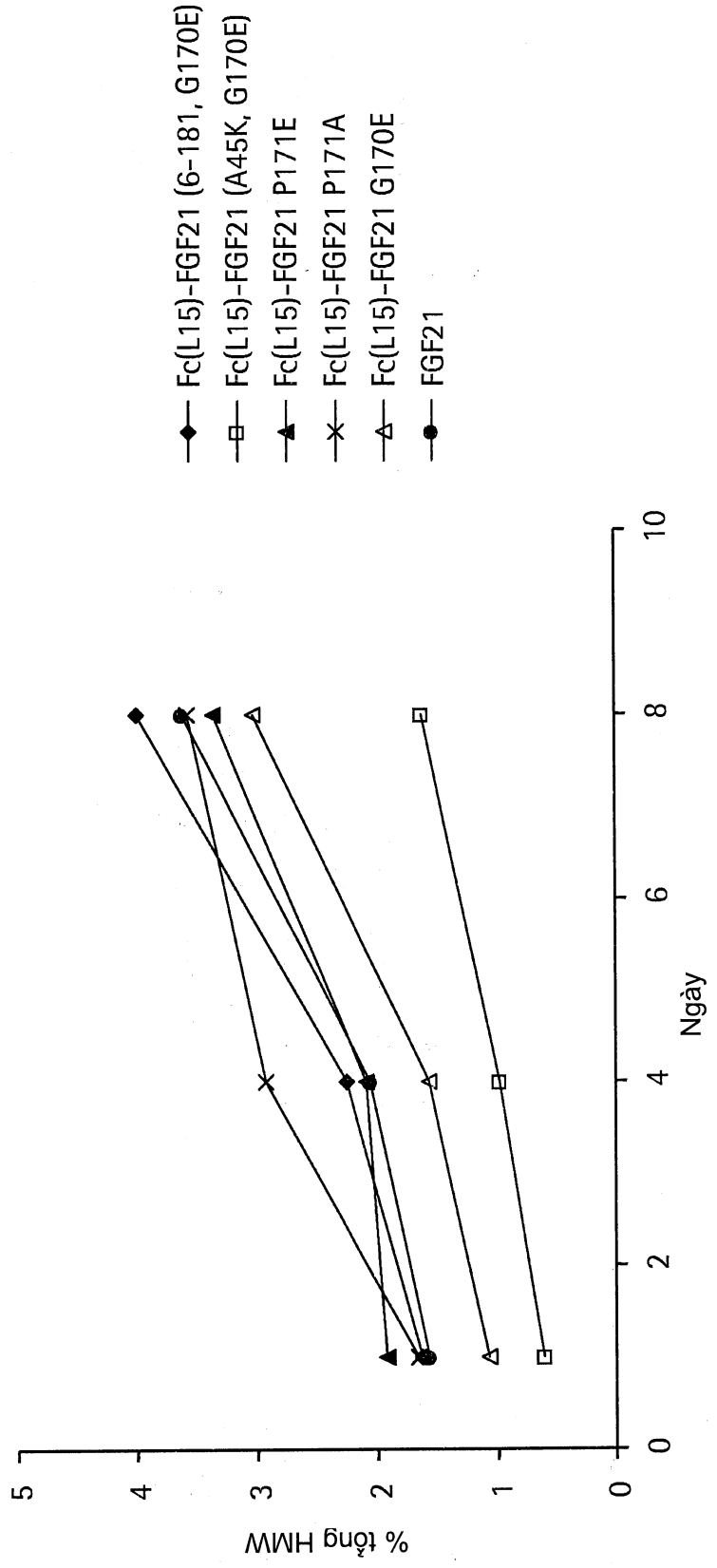

Fc(L15)-FGF21 (6-181, G170E)
Fc(L15)-FGF21 (A45K, G170E)
Fc(L15)-FGF21 P171E
Fc(L15)-FGF21 P171A
Fc(L15)-FGF21 G170E
FGF21
% tổng HMW
0
1
2
3
4
5
0
2
4
6
8
10
Ngày

FIG. 28B

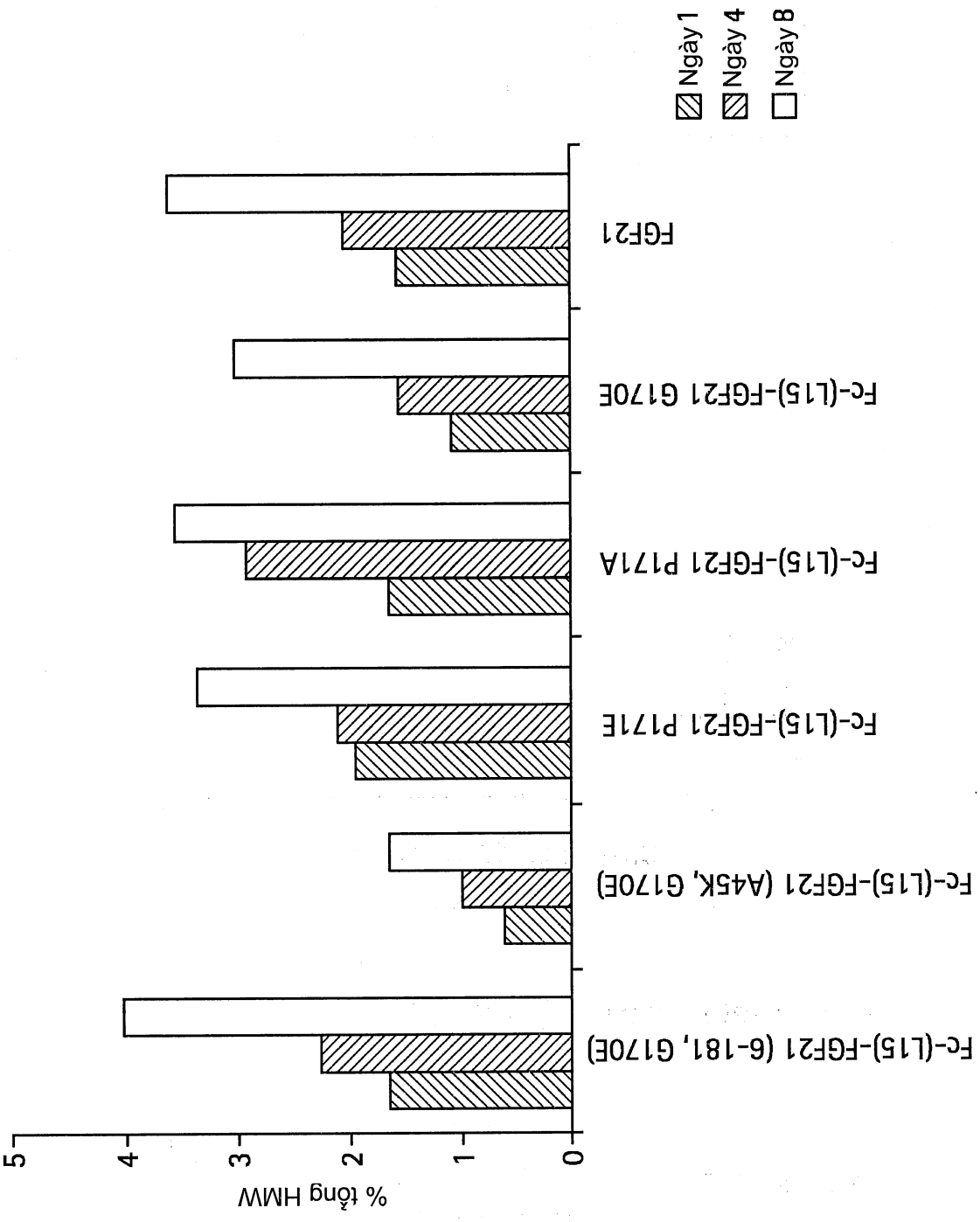

Ngày 1
Ngày 4
Ngày 8
% tổng HMW
0
1
2
3
4
5
Fc-(L15)-FGF21 (6-181, G170E)
Fc-(L15)-FGF21 (A45K, G170E)
Fc-(L15)-FGF21 P171E
Fc-(L15)-FGF21 P171A
Fc-(L15)-FGF21 G170E
FGF21

FIG. 29

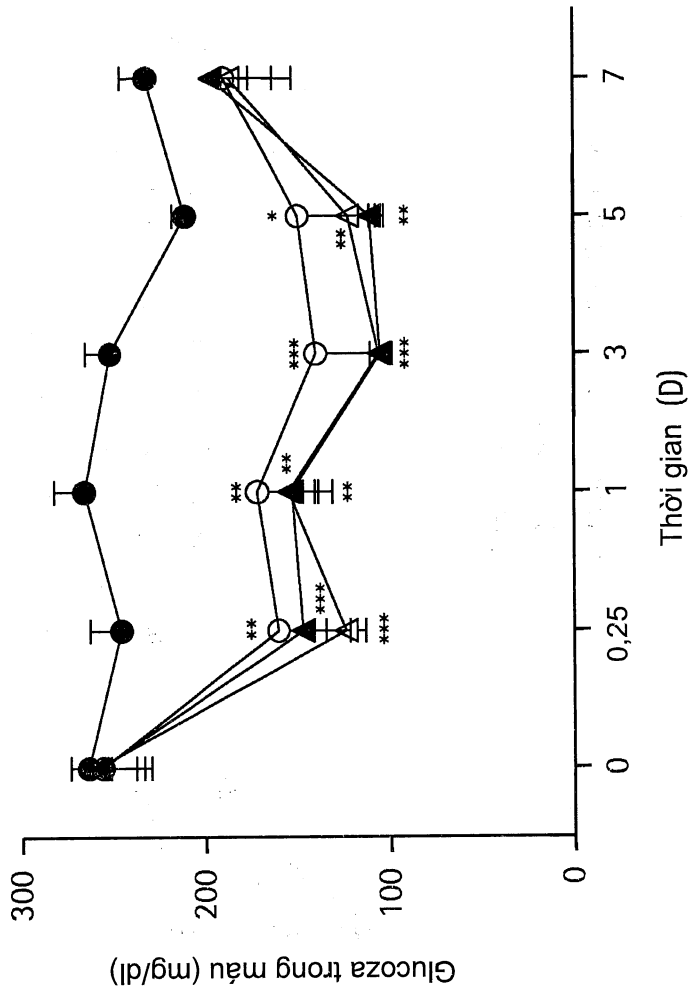

Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21 (A45K, G170E)
Fc-(L15)-FGF21 (A45K, P171G)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
* P< 0,05
** P< 0,0
*** P< 0,001
Điều trị so với môi trường dẫn thuốc
Glucoza trong máu (mg/dl)
300
200
100
0
0
0,25
1
3
5
7
Thời gian (D)

FIG. 30

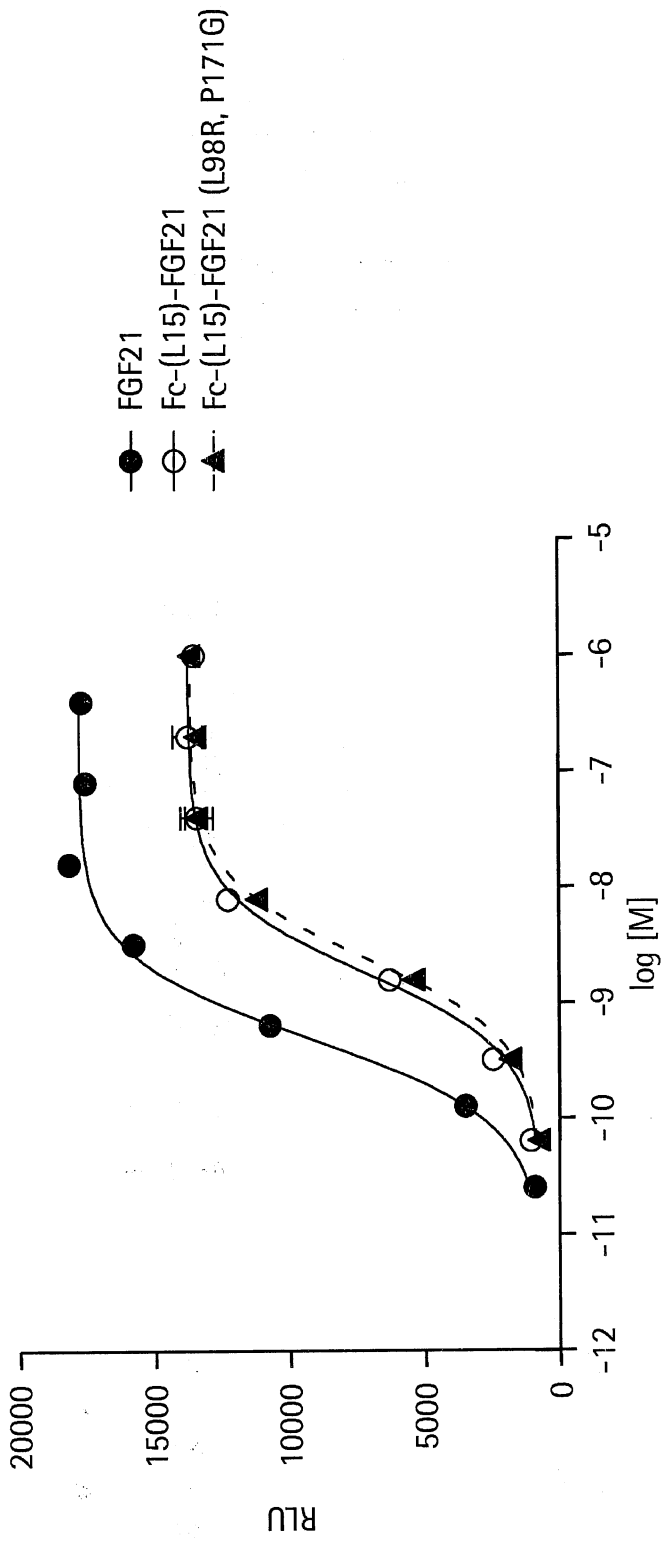

FGF21
Fc-(L15)-FGF21
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
RLU
20000
15000
10000
5000
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [M]

FIG. 31A

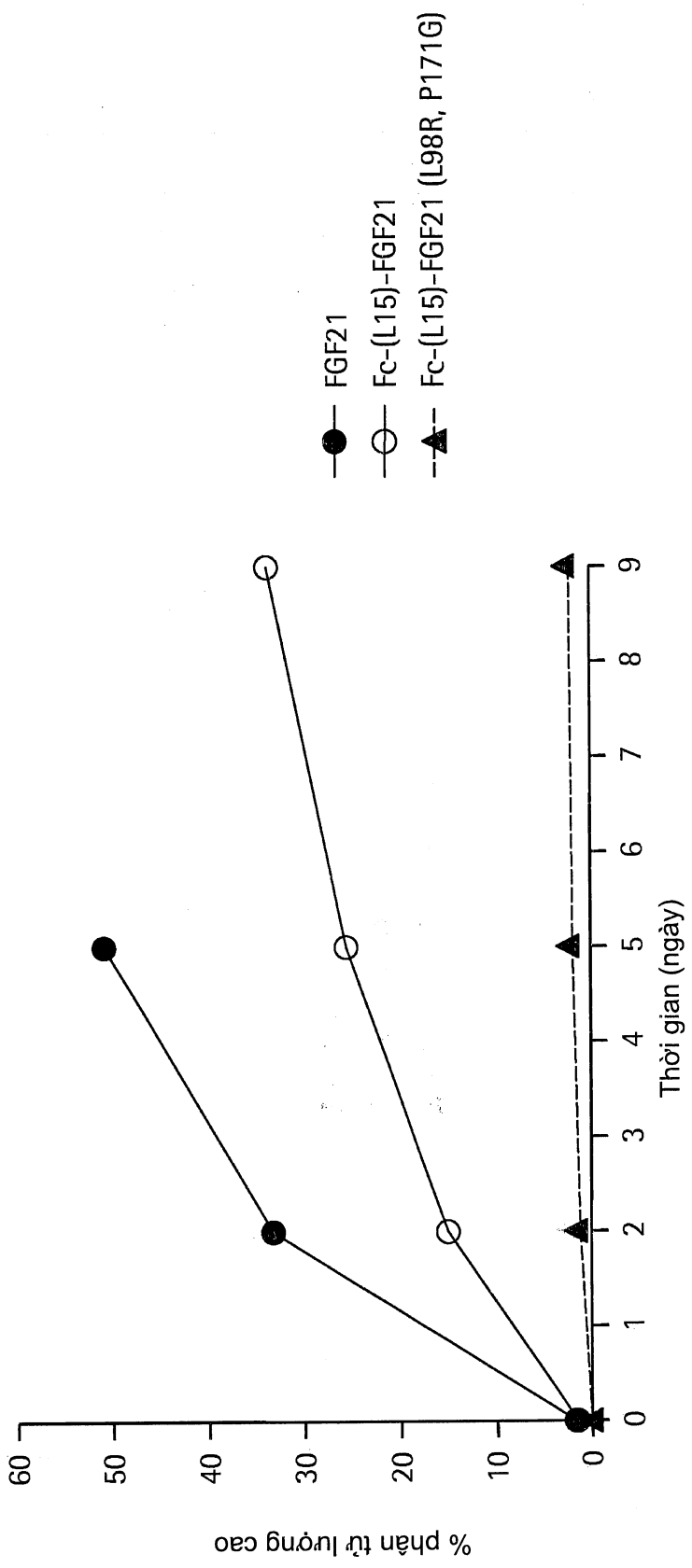

FGF21
Fc-(L15)-FGF21
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
% phân tử lượng cao
0
10
20
30
40
50
60
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Thời gian (ngày)

FIG. 31B

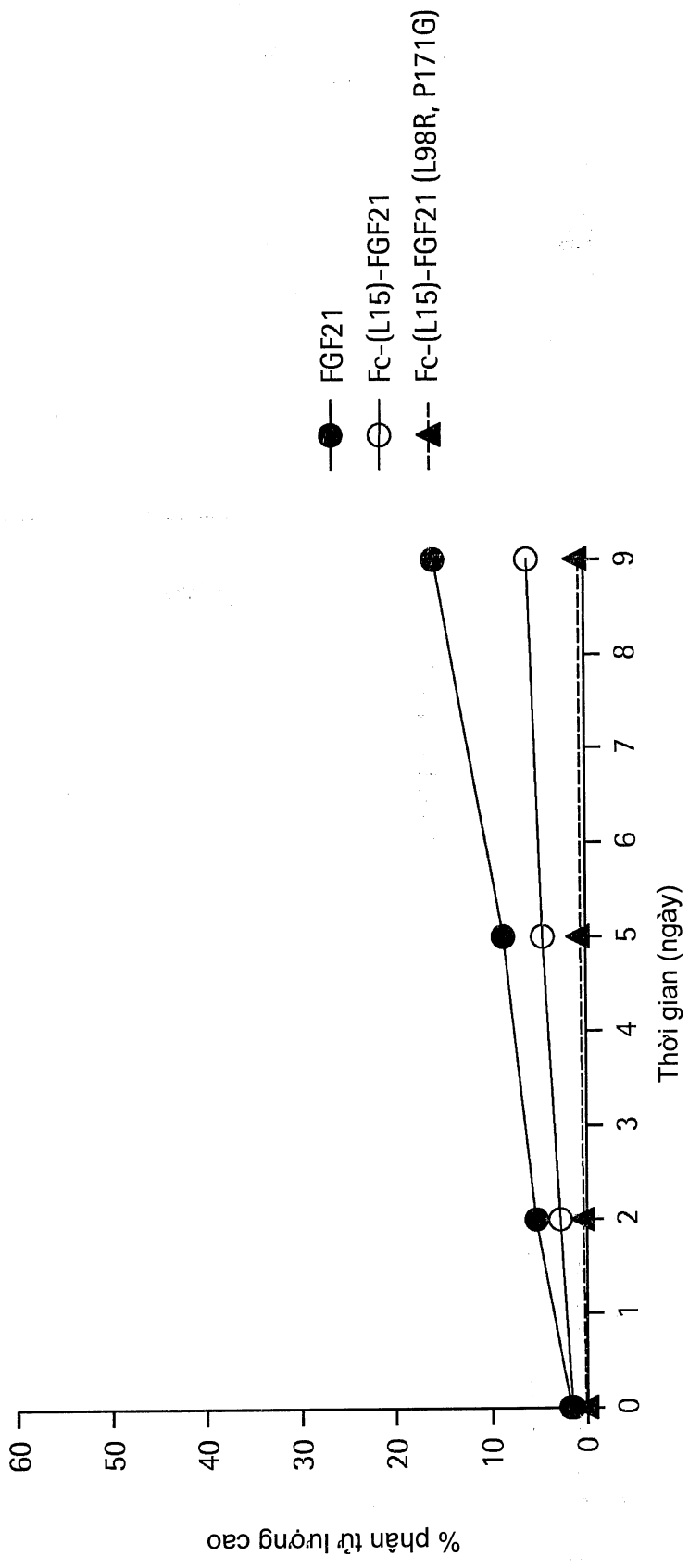

FGF21
Fc-(L15)-FGF21
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
% phân tử lượng cao
0
10
20
30
40
50
60
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Thời gian (ngày)

FIG. 32

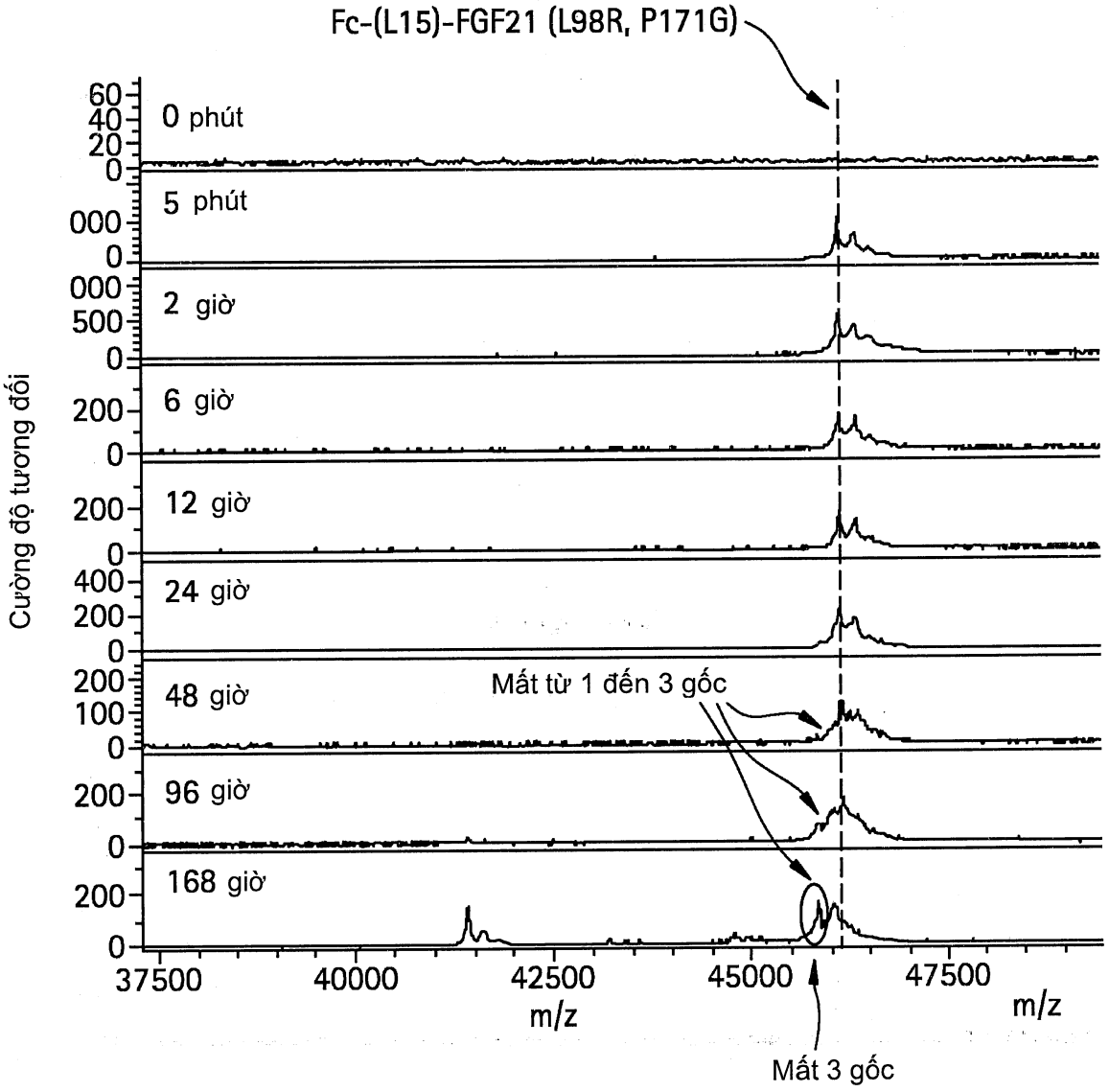

Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
0 phút
5 phút
2 giờ
6 giờ
12 giờ
24 giờ
48 giờ
96 giờ
168 giờ
Cường độ tương đối
Mất từ 1 đến 3 gốc
Mất 3 gốc
37500
40000
42500
45000
47500
m/z
m/z

FIG. 33

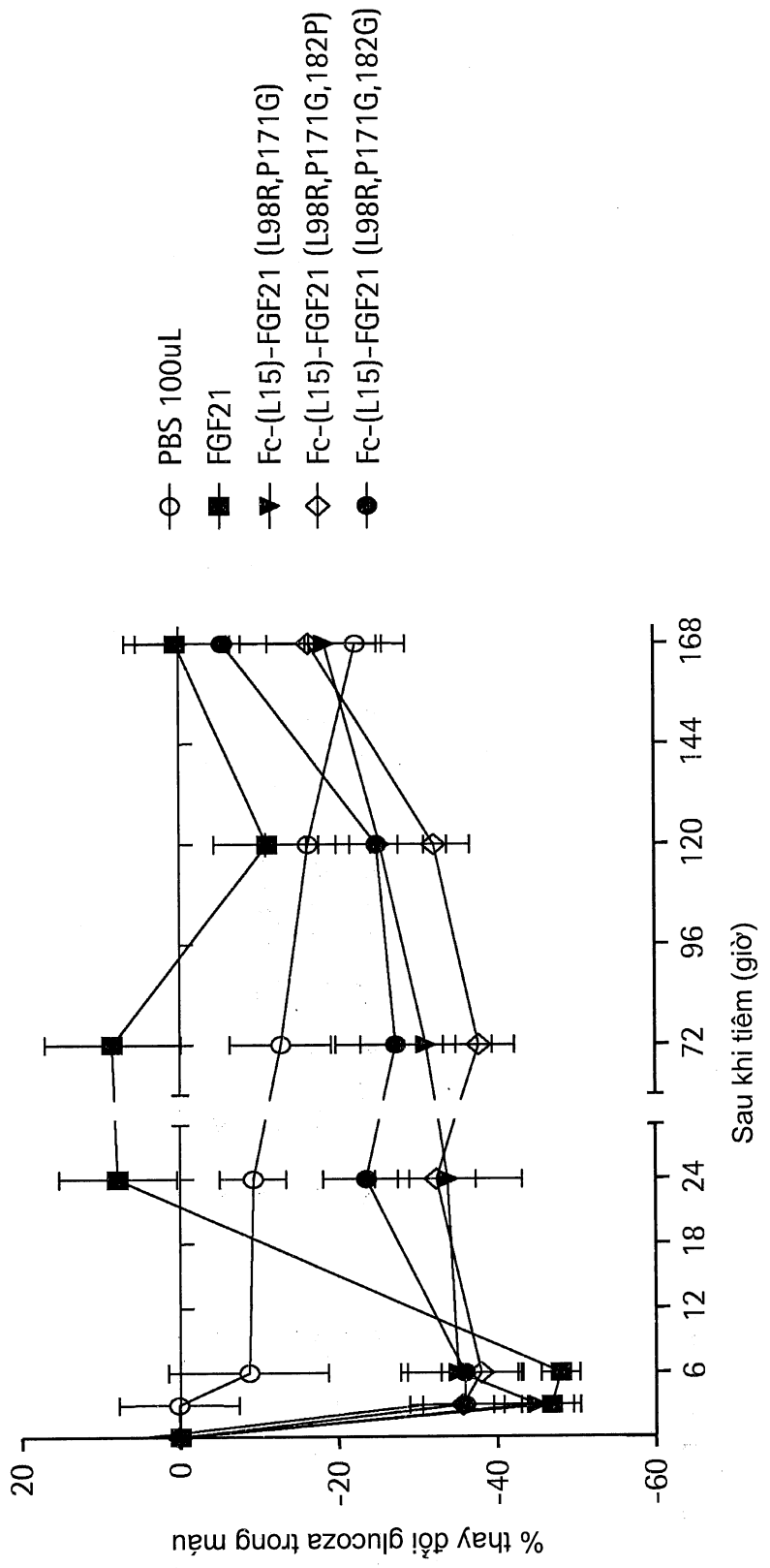

PBS 100uL
FGF21
Fc-(L15)-FGF21 (L98R,P171G)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R,P171G,182P)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R,P171G,182G)
% thay đổi glucoza trong máu
20
0
-20
-40
-60
6
12
18
24
72
96
120
144
168
Sau khi tiêm (giờ)

FIG. 34

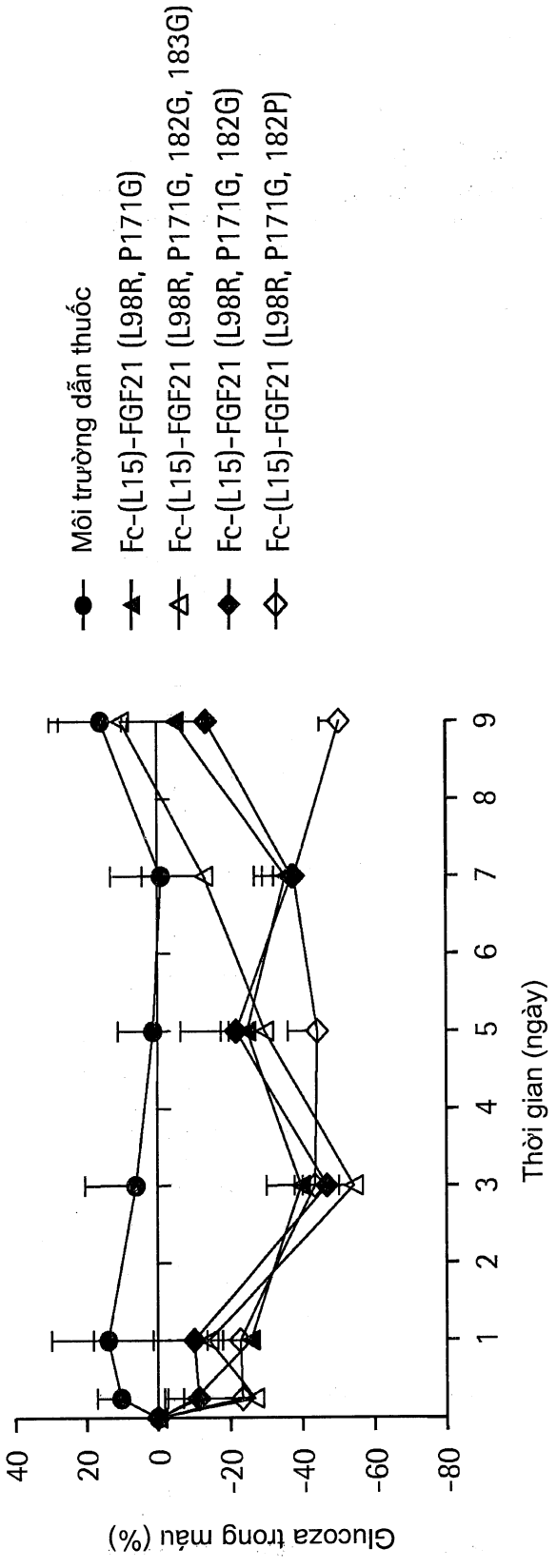

Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182G, 183G)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182G)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, 182P)
Glucoza trong máu (%)
40
20
0
-20
-40
-60
-80
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Thời gian (ngày)

FIG. 35

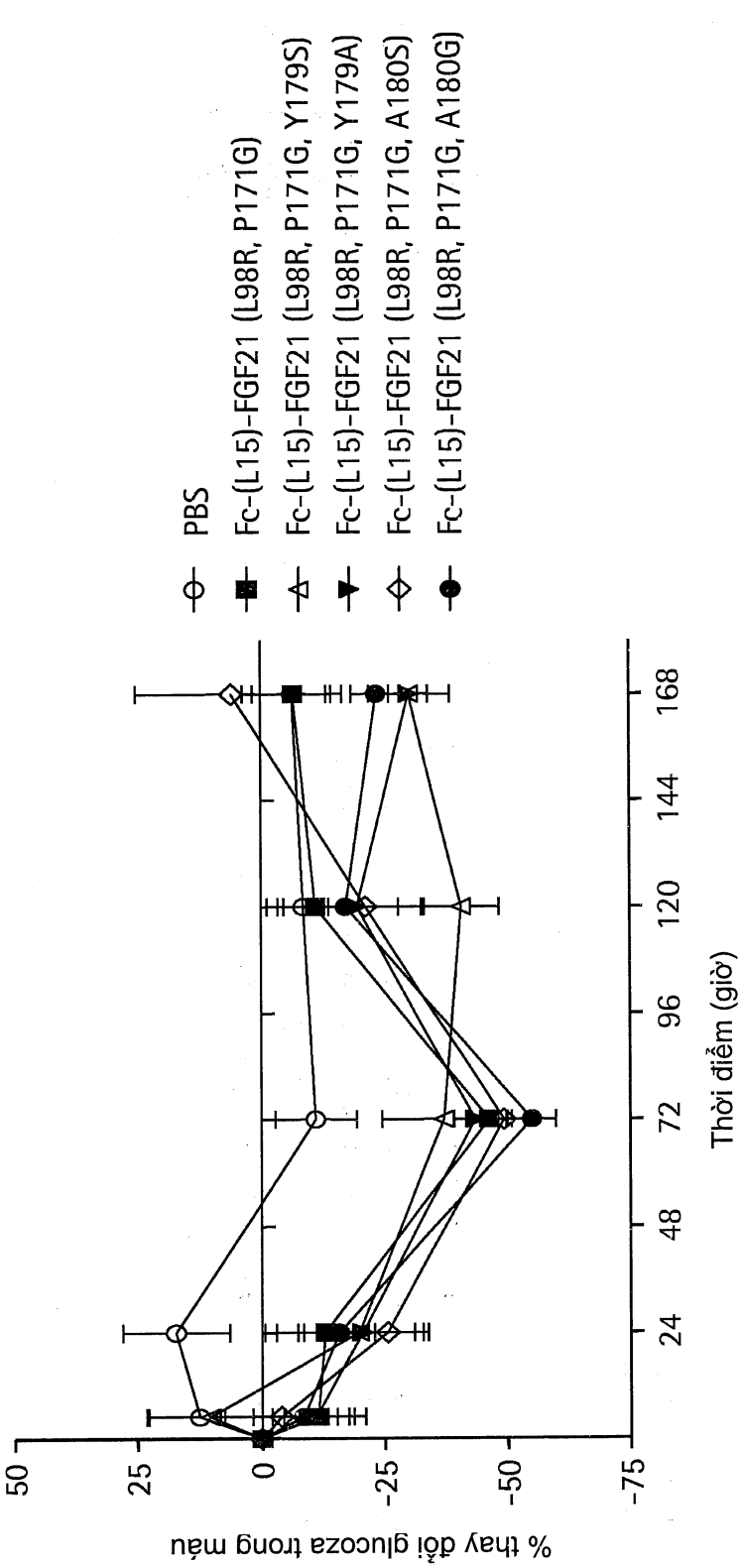

PBS
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, Y179S)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, Y179A)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180S)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180G)
% thay đổi glucoza trong máu
50
25
0
-25
-50
-75
24
48
72
96
120
144
168
Thời điểm (giờ)

FIG. 36

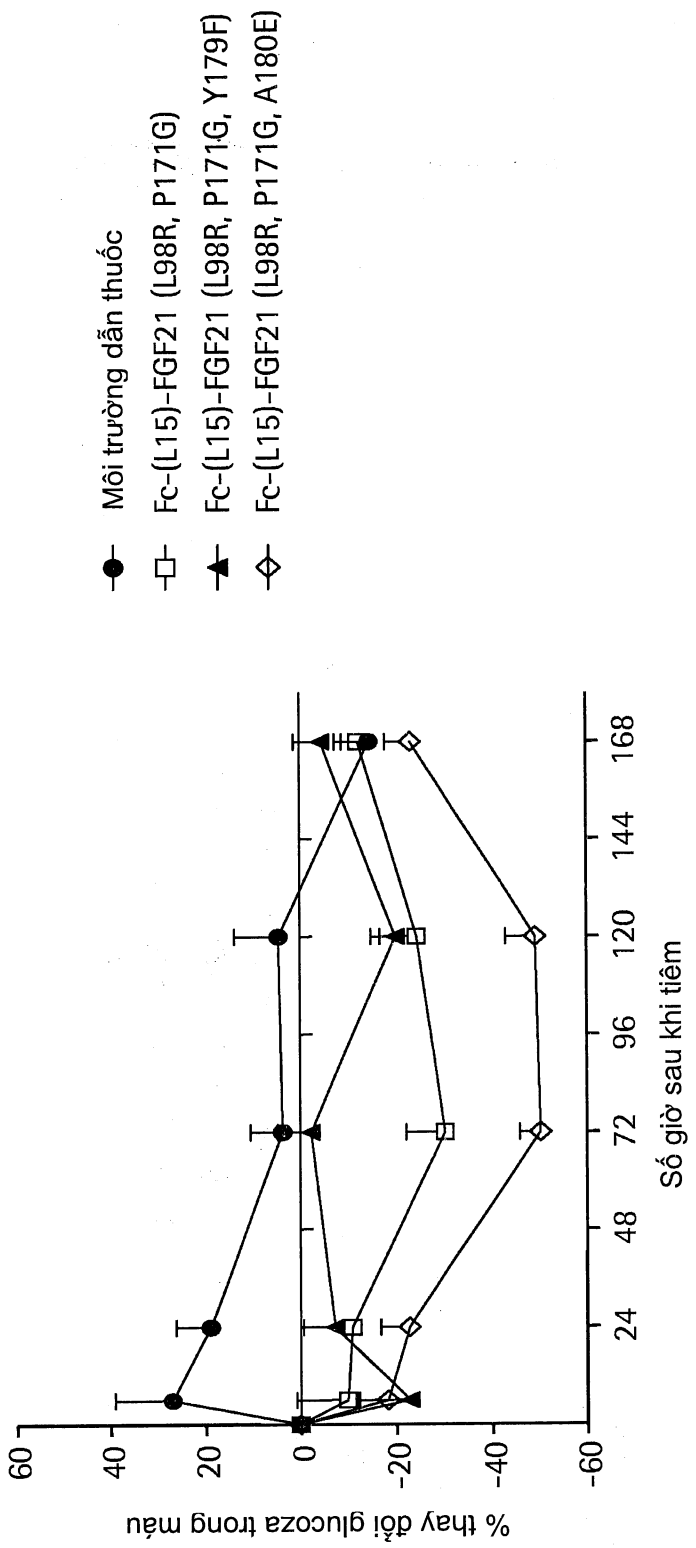

Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, Y179F)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E)
% thay đổi glucoza trong máu
60
40
20
0
-20
-40
-60
24
48
72
96
120
144
168
Số giờ sau khi tiêm

FIG. 37

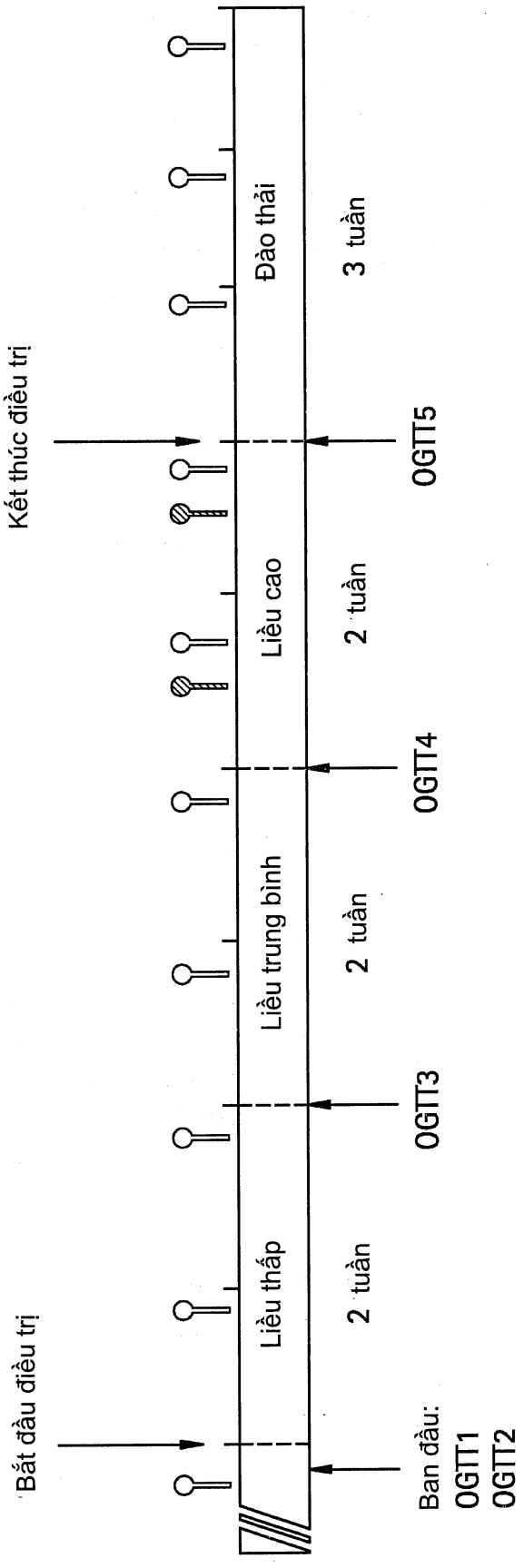

Bắt đầu điều trị
Kết thúc điều trị
Liều thấp
Liều trung bình
Liều cao
Đào thải
2 tuần
2 tuần
2 tuần
3 tuần
Ban đầu:
OGTT1
OGTT2
OGTT3
OGTT4
OGTT5

FIG. 38A

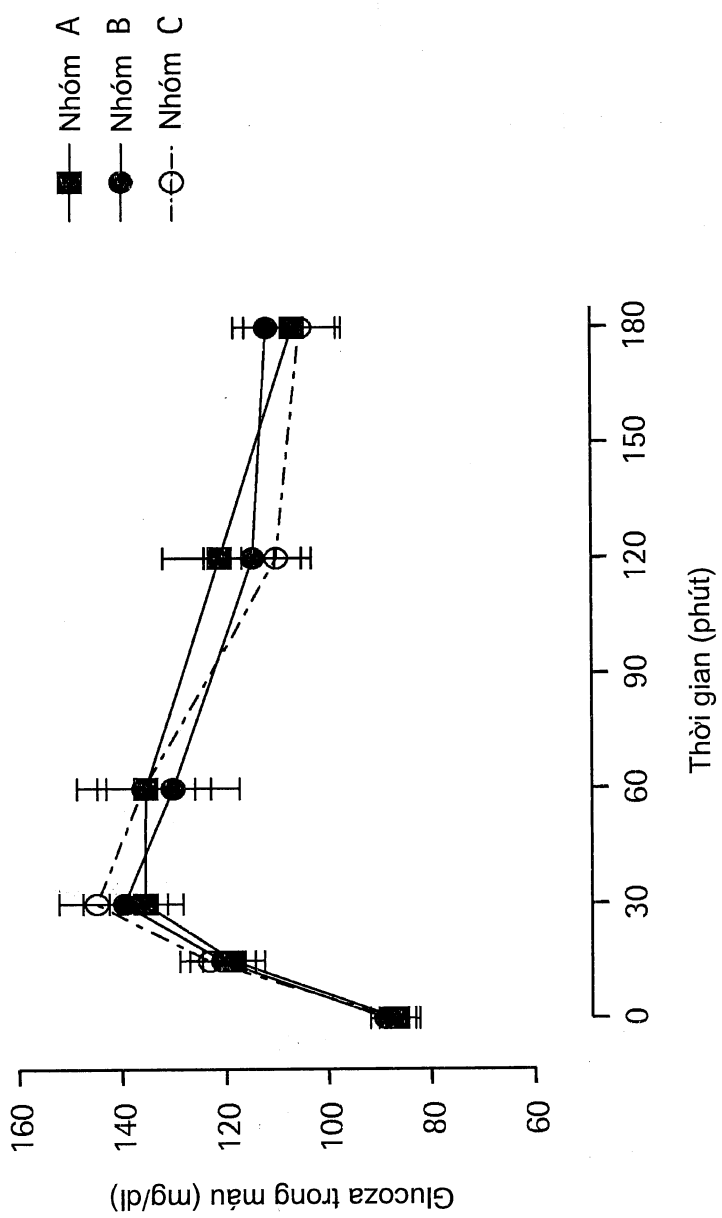

Nhóm A
Nhóm B
Nhóm C
Glucoza trong máu (mg/dl)
160
140
120
100
80
60
0
30
60
90
120
150
180
Thời gian (phút)

FIG. 38B

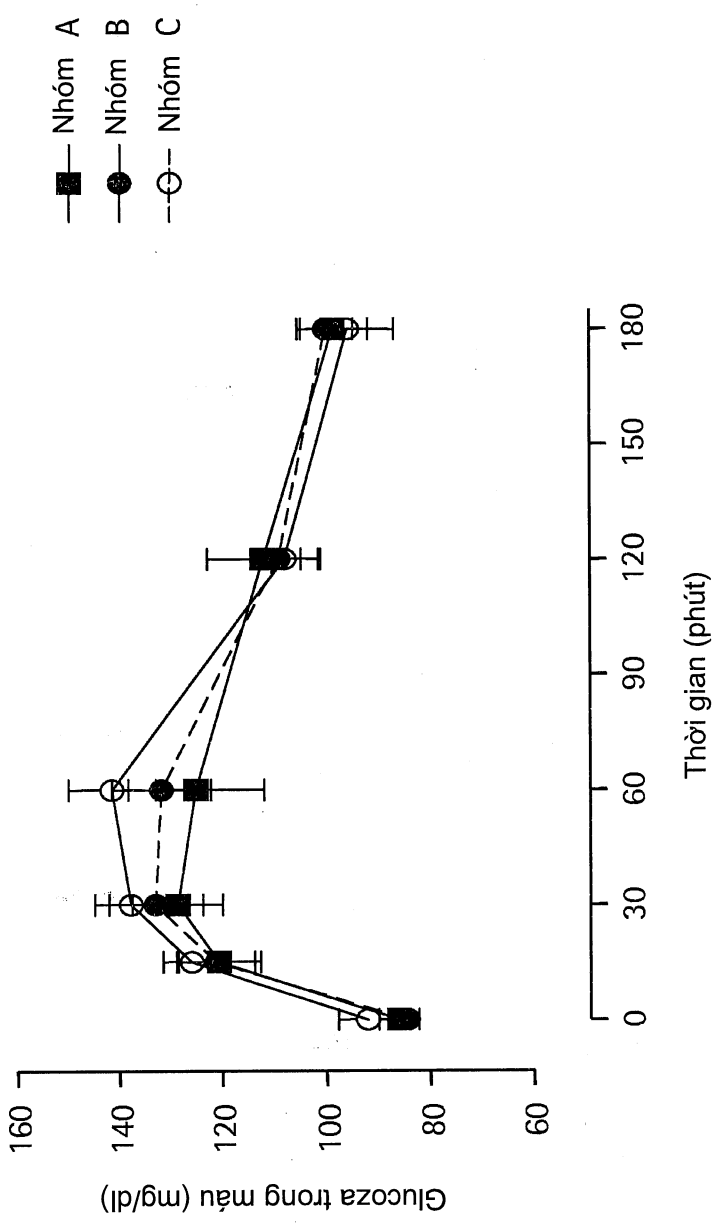

Nhóm A
Nhóm B
Nhóm C
Glucoza trong máu (mg/dl)
160
140
120
100
80
60
0
30
60
90
120
150
180
Thời gian (phút)

FIG. 38C

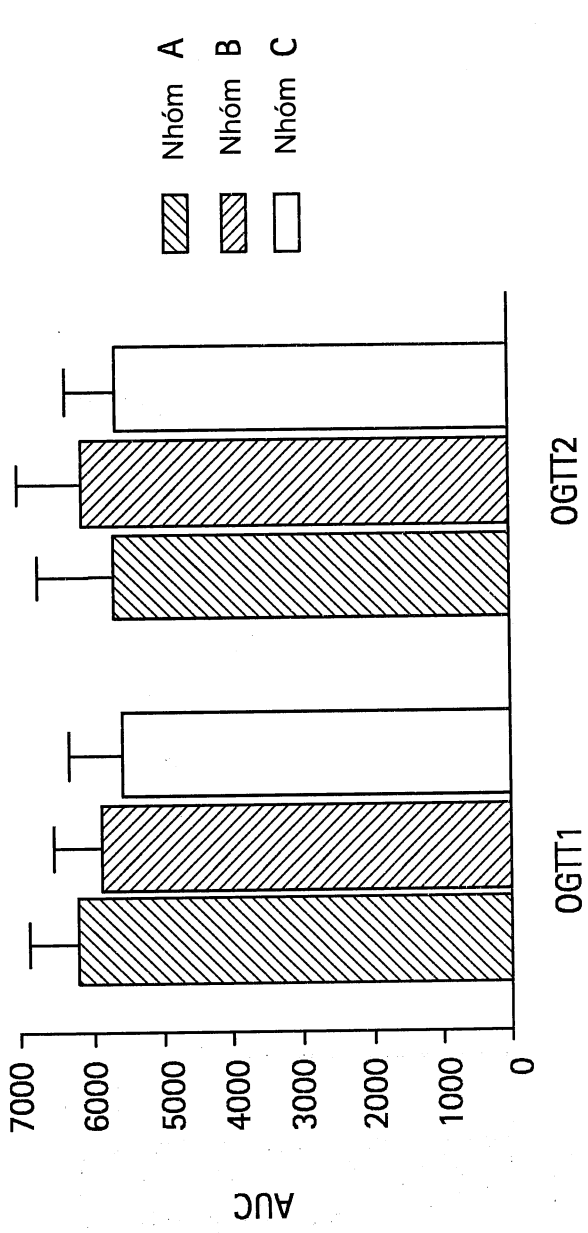

Nhóm A
Nhóm B
Nhóm C
AUC
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
OGTT1
OGTT2

FIG. 38D

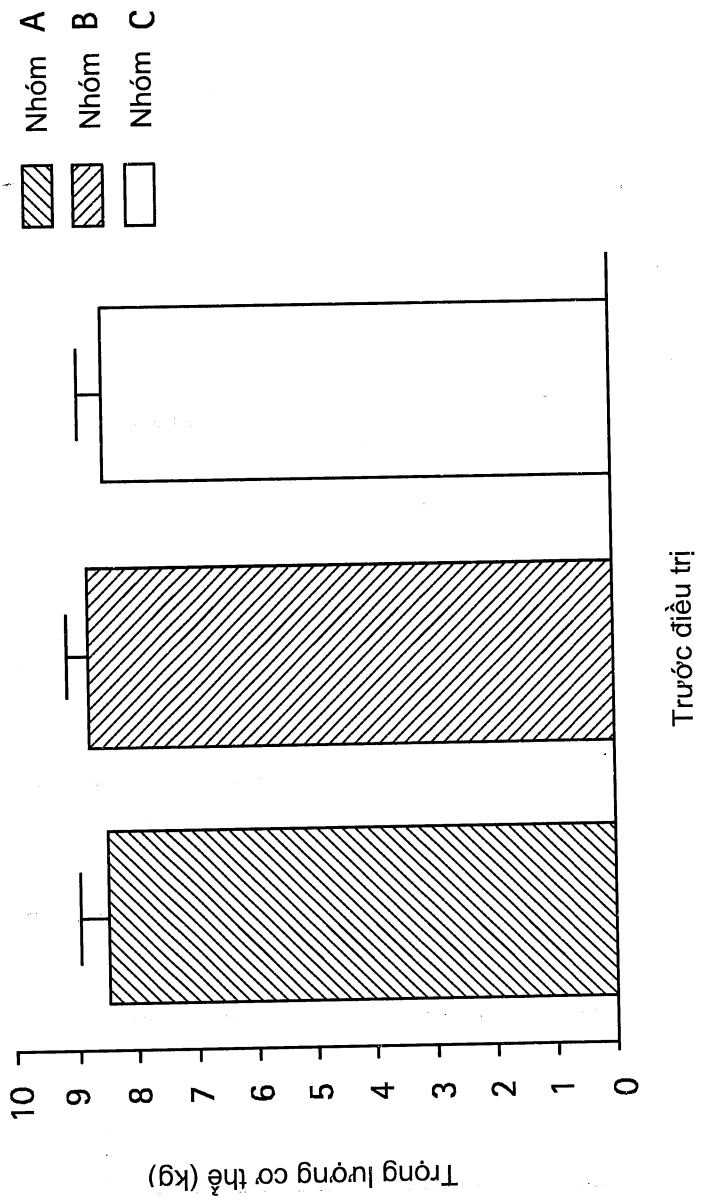

Nhóm A
Nhóm B
Nhóm C
Trọng lượng cơ thể (kg)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Trước điều trị

FIG. 39

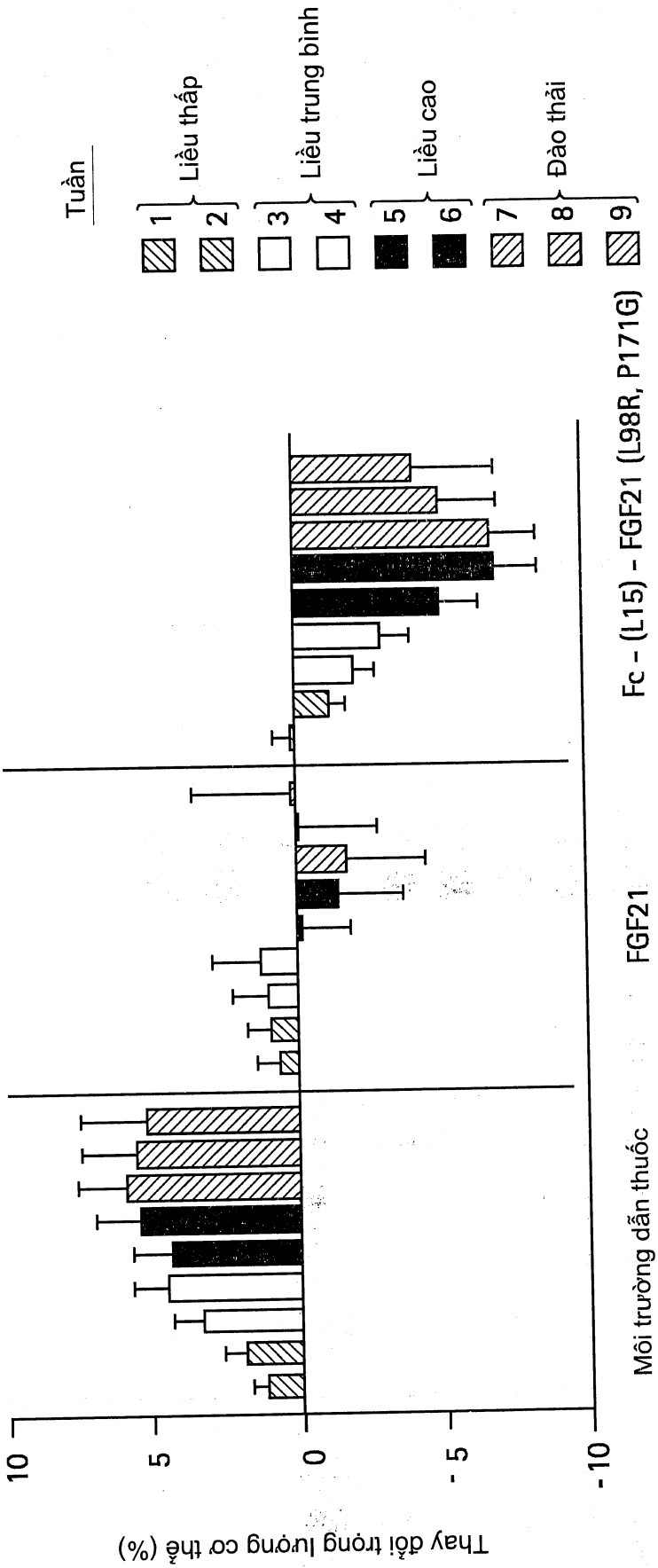

Tuần
1
2
Liều thấp
3
4
Liều trung bình
5
6
Liều cao
7
8
9
Đào thải
Thay đổi trọng lượng cơ thể (%)
10
5
0
- 5
- 10
Môi trường dẫn thuốc
FGF21
Fc - (L15) - FGF21 (L98R, P171G)

FIG. 40

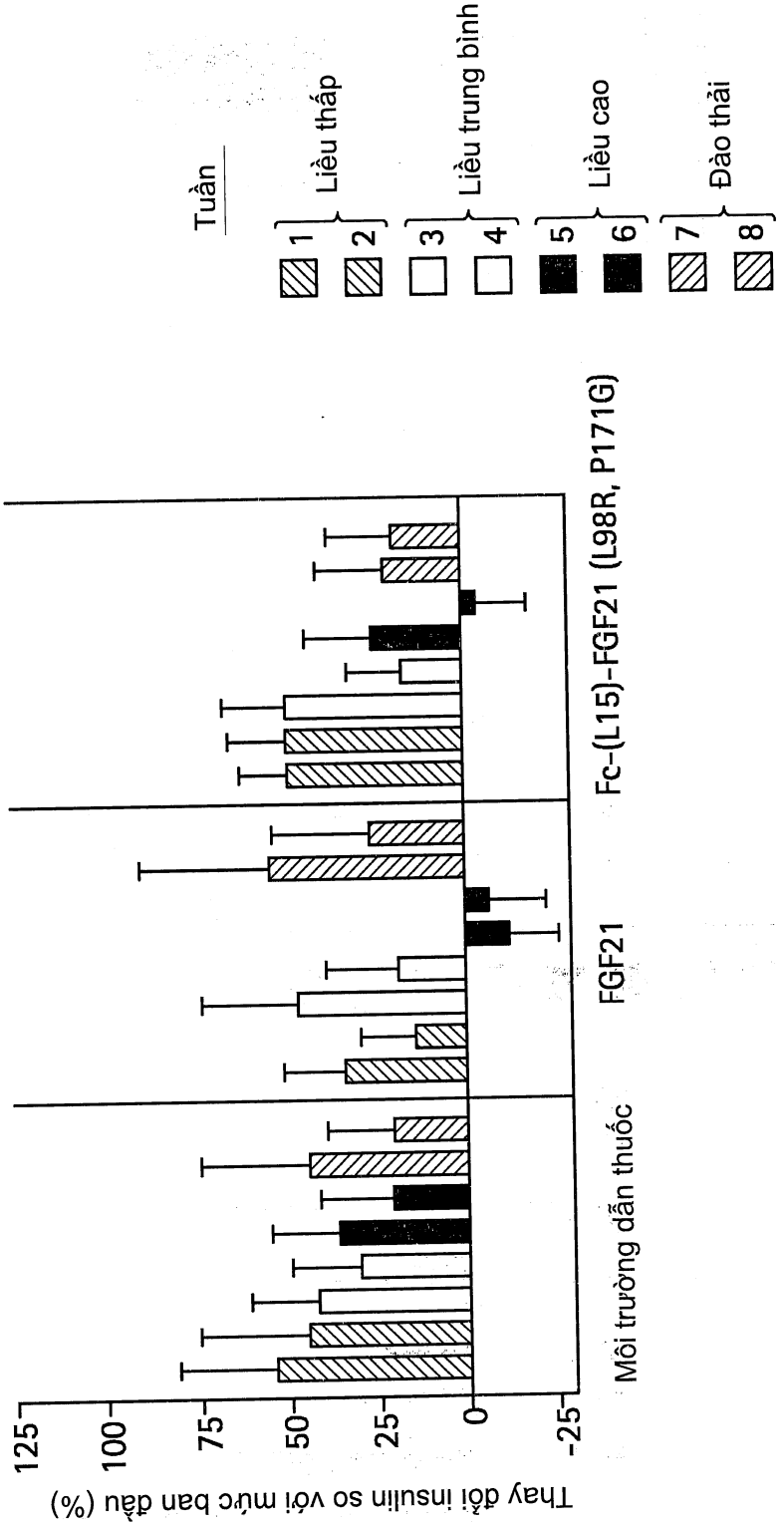

Thay đổi insulin so với mức ban đầu (%)
125
100
75
50
25
0
-25
Môi trường dẫn thuốc
FGF21
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
Tuần
1
2
Liều thấp
3
4
Liều trung bình
5
6
Liều cao
7
8
Đào thải

FIG. 41

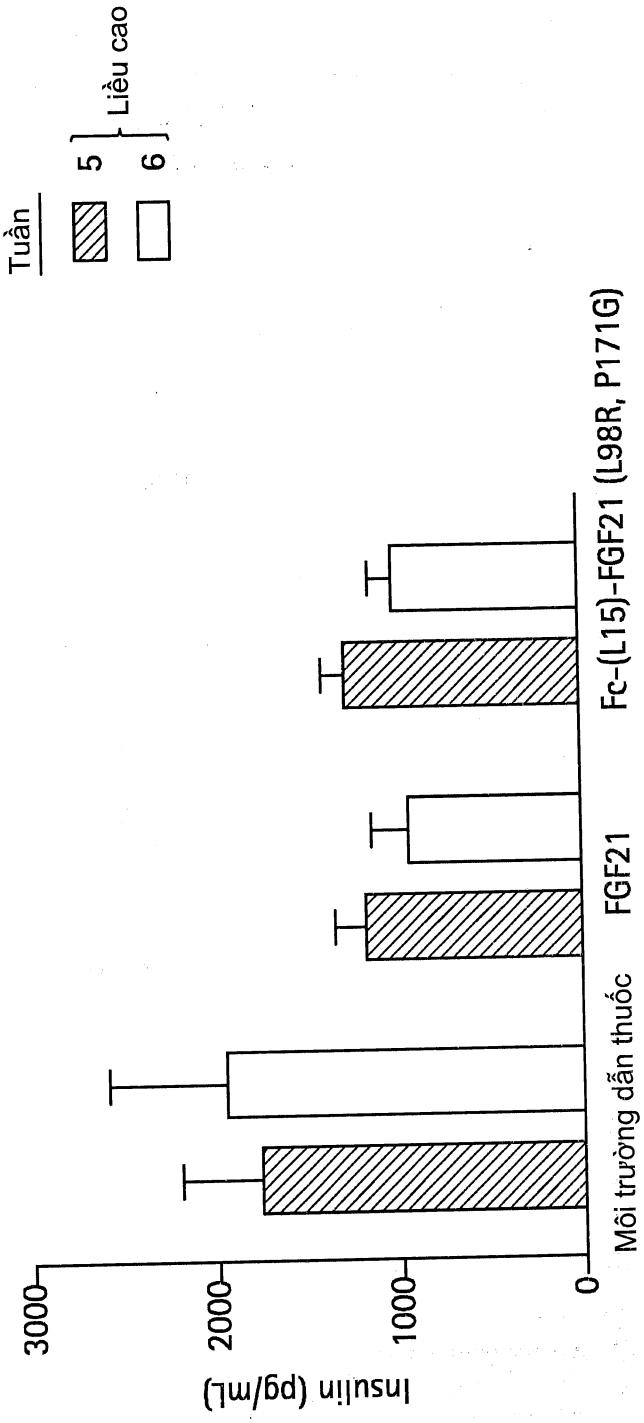

Tuần
5
6
Liều cao
Insulin (pg/mL)
3000
2000
1000
0
Môi trường dẫn thuốc
FGF21
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)

FIG. 42

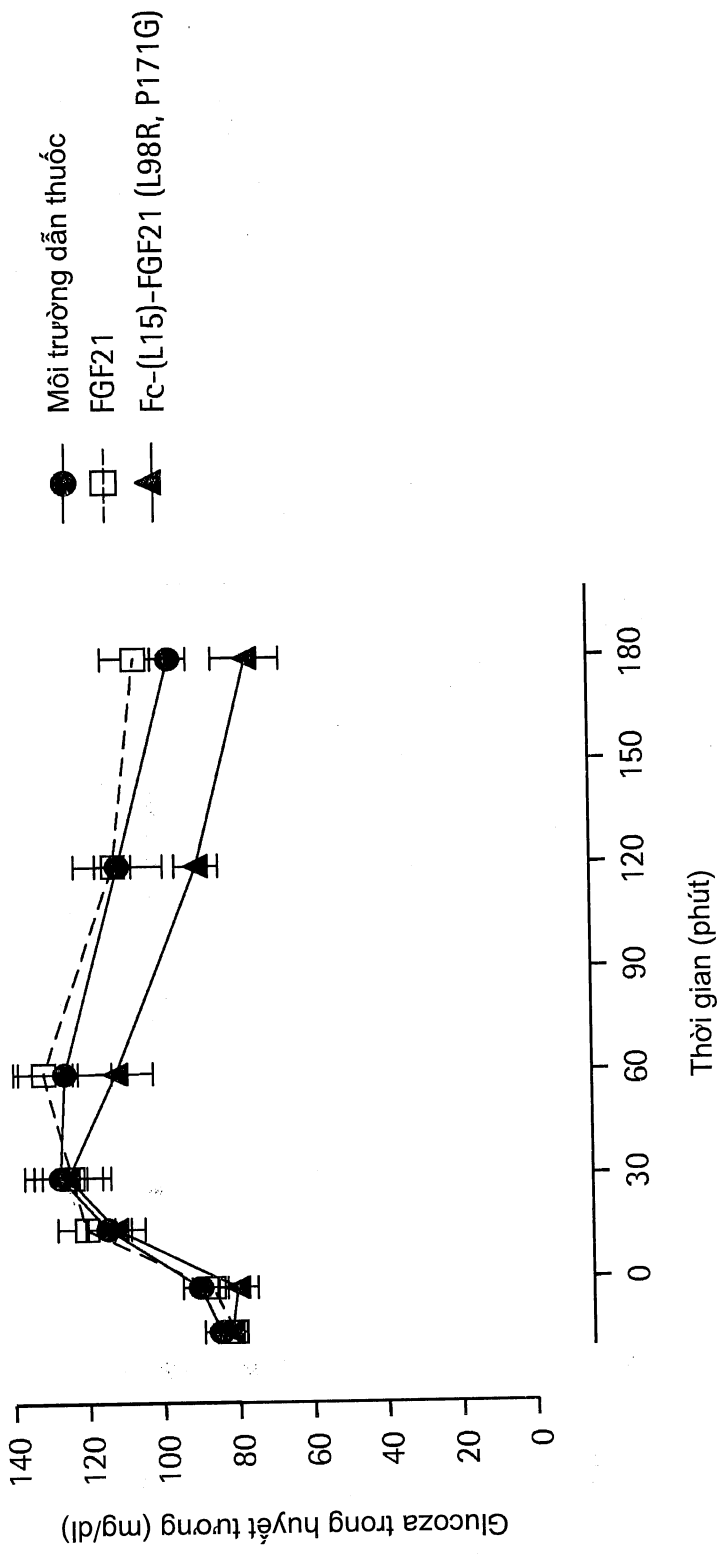

Môi trường dẫn thuốc
FGF21
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
Glucoza trong huyết tương (mg/dl)
0
20
40
60
80
100
120
140
0
30
60
90
120
150
180
Thời gian (phút)

FIG. 43

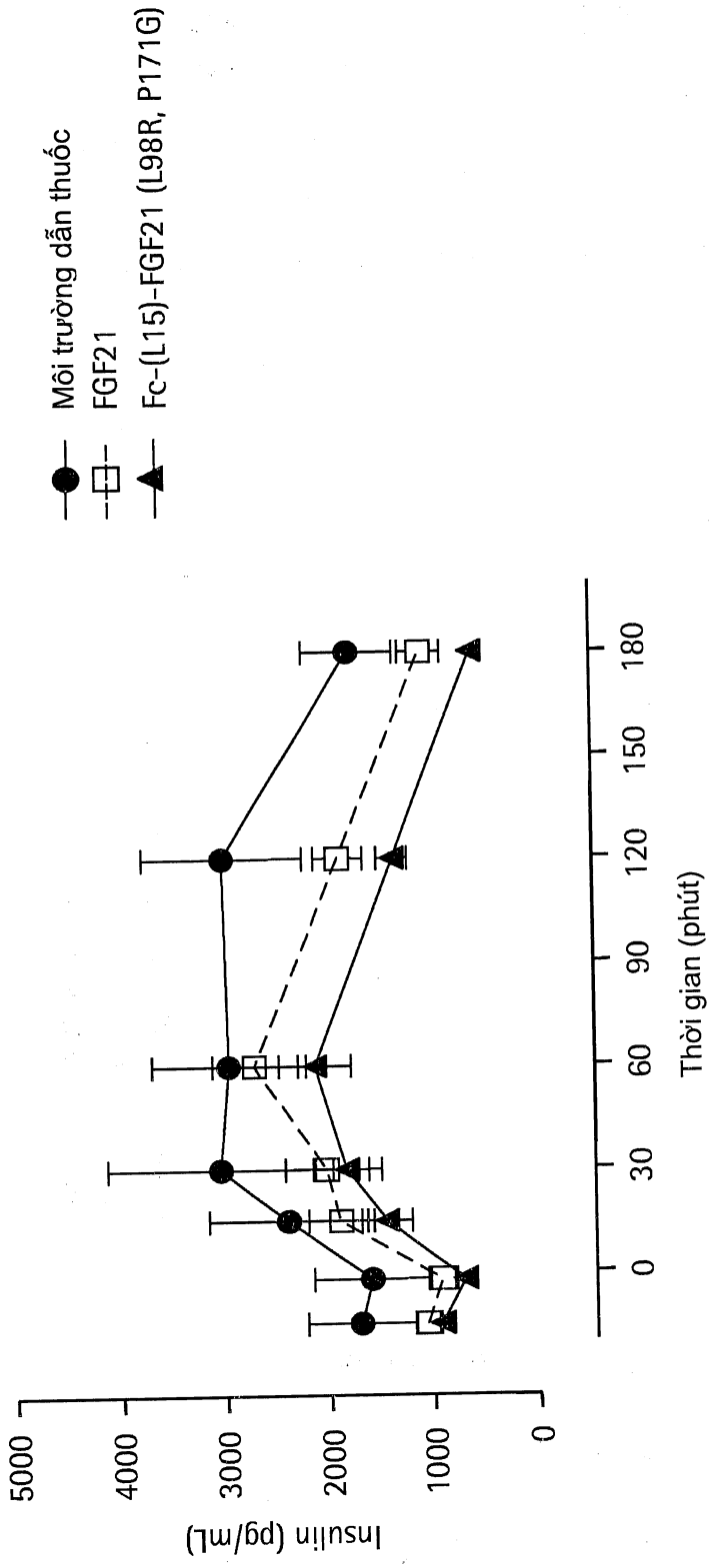

Môi trường dẫn thuốc
FGF21
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
Insulin (pg/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
30
60
90
120
150
180
Thời gian (phút)

FIG. 44

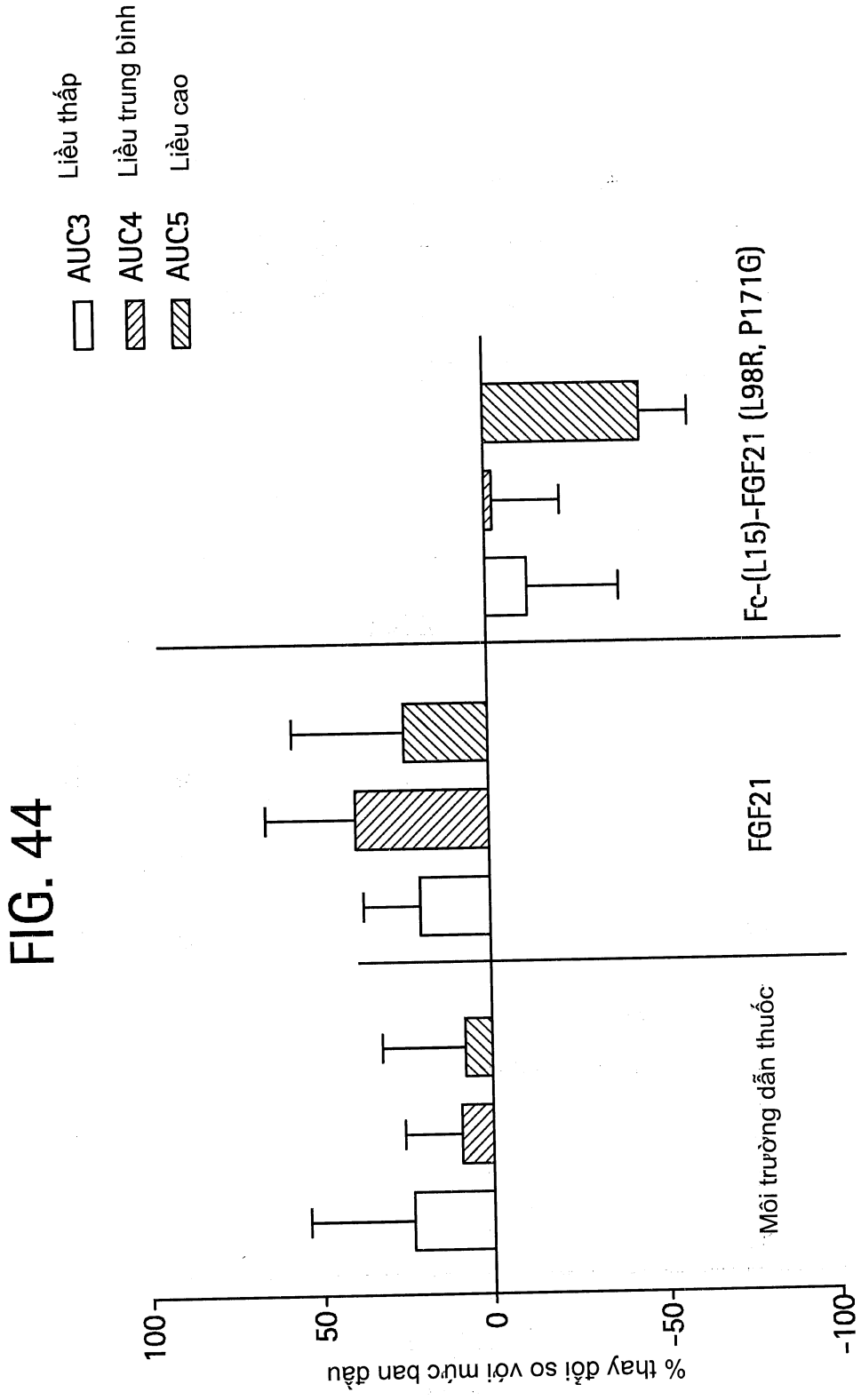

AUC3 Liều thấp
AUC4 Liều trung bình
AUC5 Liều cao
% thay đổi so với mức ban đầu
100
50
0
-50
-100
Môi trường dẫn thuốc
FGF21
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)

FIG. 45

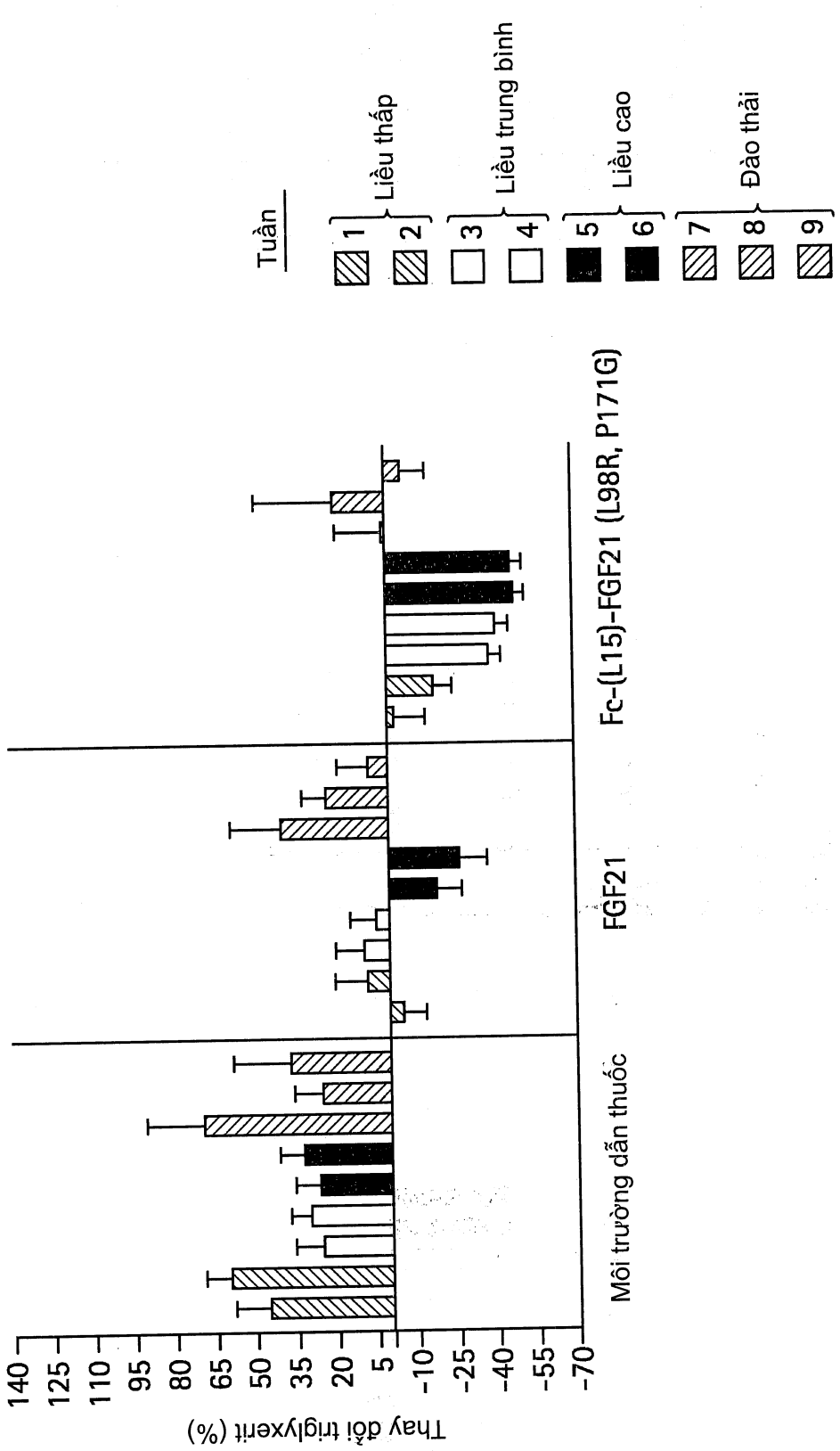

Tuần
1
2
Liều thấp
3
4
Liều trung bình
5
6
Liều cao
7
8
9
Đào thải
Thay đổi triglyxerit (%)
140
125
110
95
80
65
50
35
20
5
-10
-25
-40
-55
-70
Môi trường dẫn thuốc
FGF21
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)

FIG. 46

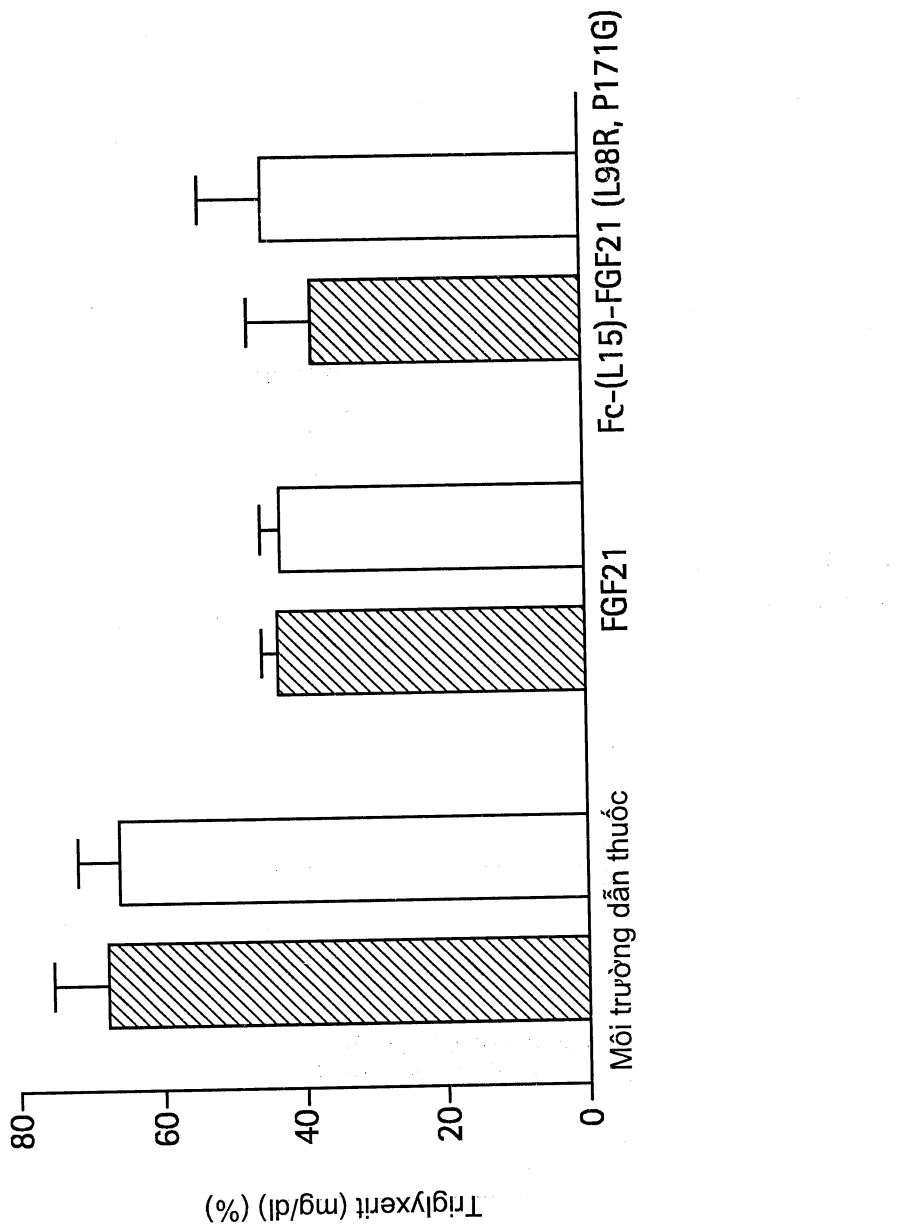

Triglyxerit (mg/dl) (%)
80
60
40
20
0
Môi trường dẫn thuốc
FGF21
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
Tuần
5
6

FIG. 47

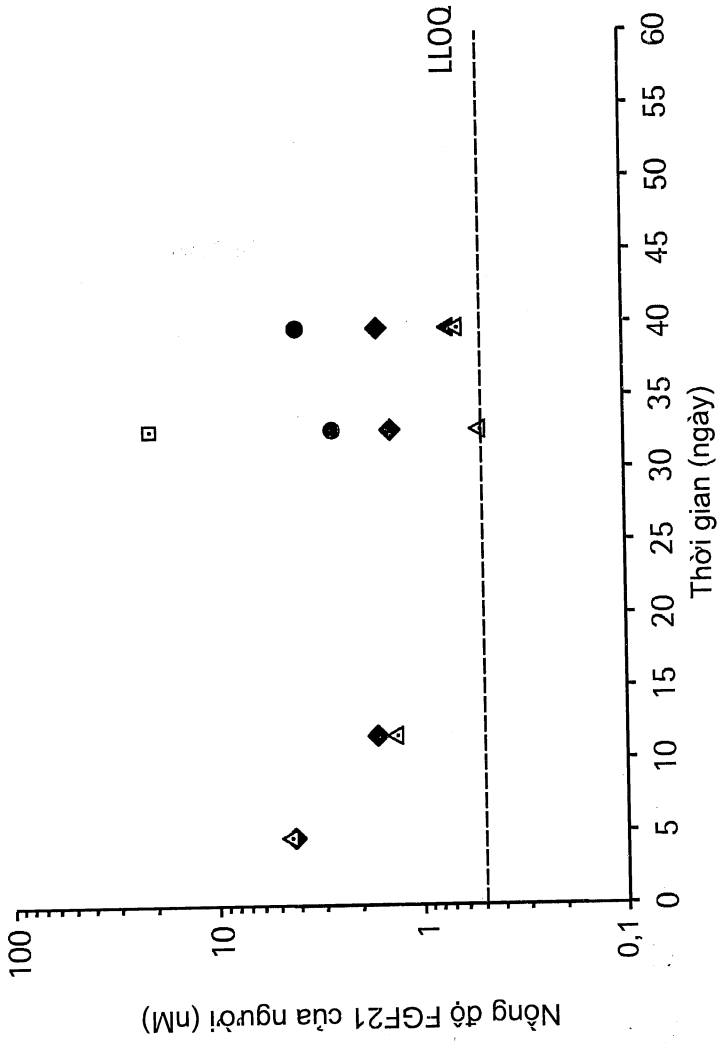

Nồng độ FGF21 của người (nM)
100
10
1
0,1
LLOQ
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Thời gian (ngày)

FIG. 48

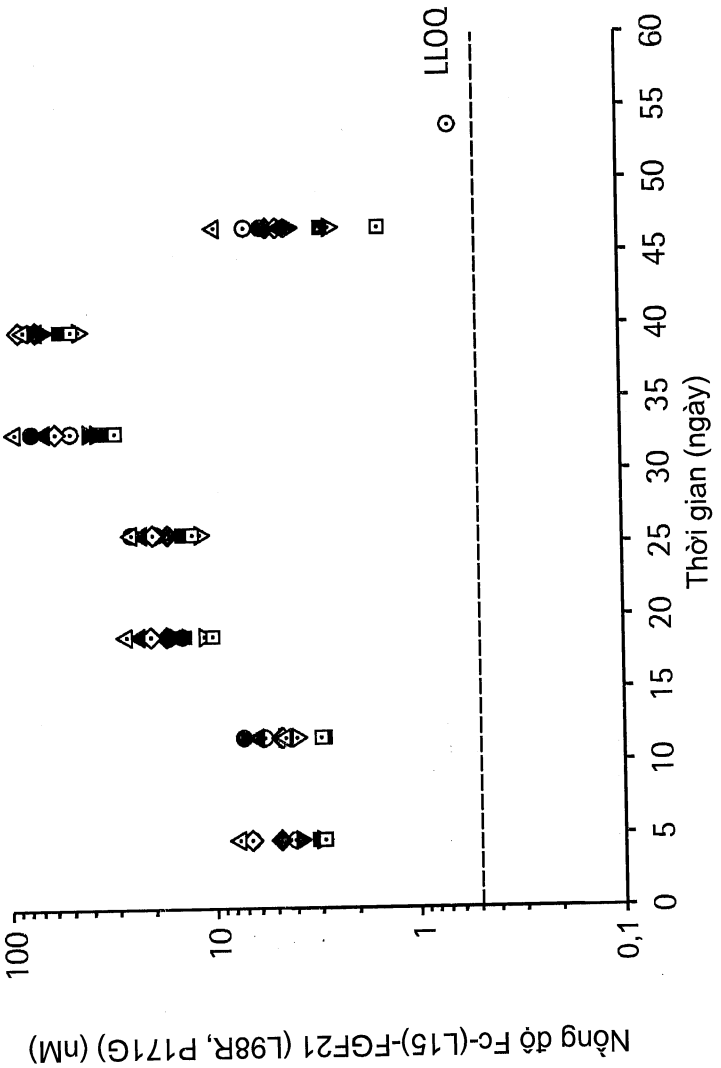

LLOQ
100
10
1
0,1
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Thời gian (ngày)
Nồng độ Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G) (nM)

FIG. 49

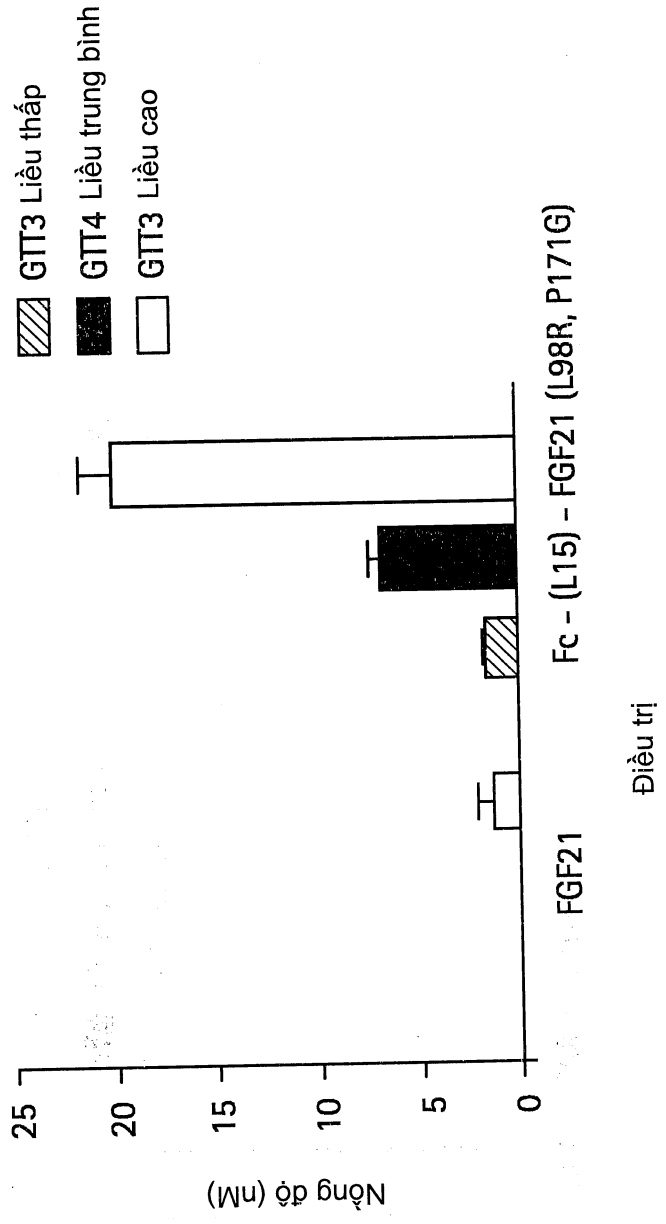
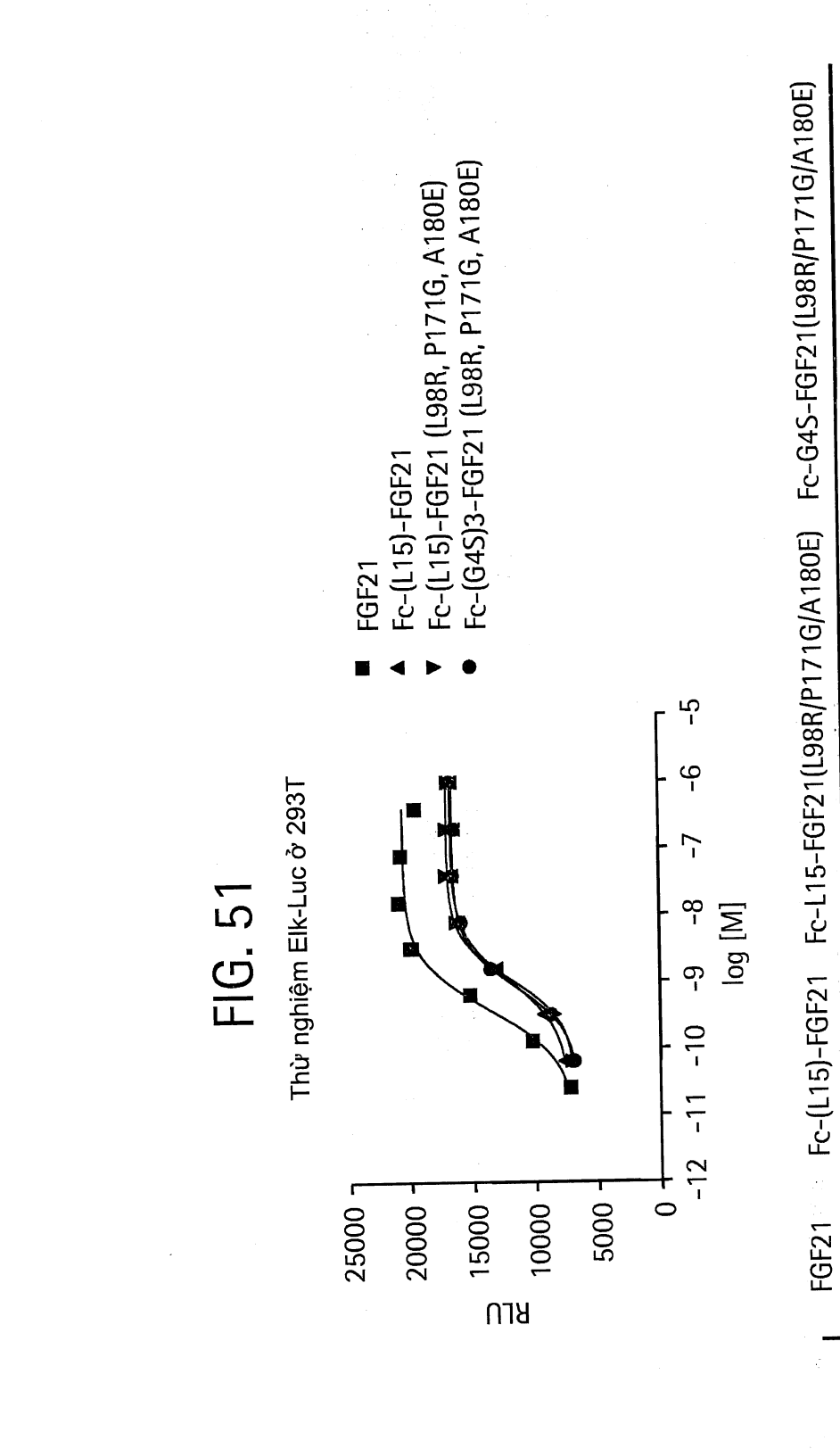

GTT3 Liều thấp
GTT4 Liều trung bình
GTT3 Liều cao
25
20
15
10
5
0
Nồng độ (nM)
FGF21
Fc - (L15) - FGF21 (L98R, P171G)
Điều trị

FIG. 50

Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A190E)

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGG*
*GGS*HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQR
PDGALYGSLHFDPEACSFRE**R**LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQP
PDVGSSDPLSMVG**G**SQGRSPSY**E**S

FIG. 51



	FGF21	Fc-(L15)-FGF21	Fc-L15-FGF21(L98R/P171G/A180E)	Fc-G4S-FGF21(L98R/P171G/A180E)
EC50	3,831e-010	1,034e-009	1,095e-009	8,515e-010

FIG. 52

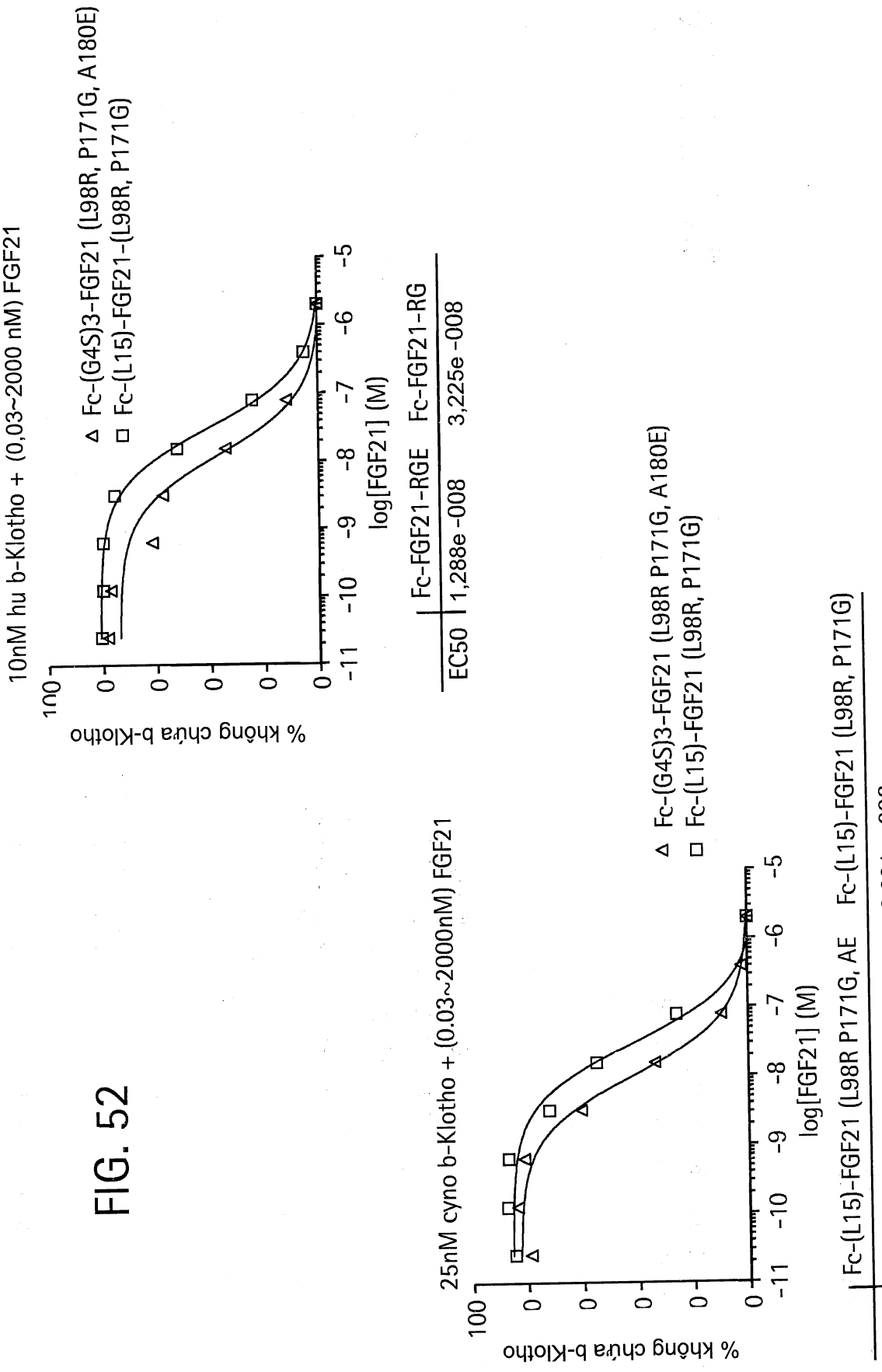

10nM hu b-Klotho + (0,03~2000 nM) FGF21
Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E)
Fc-(L15)-FGF21-(L98R, P171G)
% không chứa b-Klotho
100
0
0
0
0
0
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log[FGF21] (M)
Fc-FGF21-RGE
Fc-FGF21-RG
EC50
1,288e -008
3,225e -008
25nM cyno b-Klotho + (0.03~2000nM) FGF21
Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R P171G, A180E)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
% không chứa b-Klotho
100
0
0
0
0
0
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log[FGF21] (M)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R P171G, AE
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
EC50
1,038e -008
3,081e -008

FIG. 53A

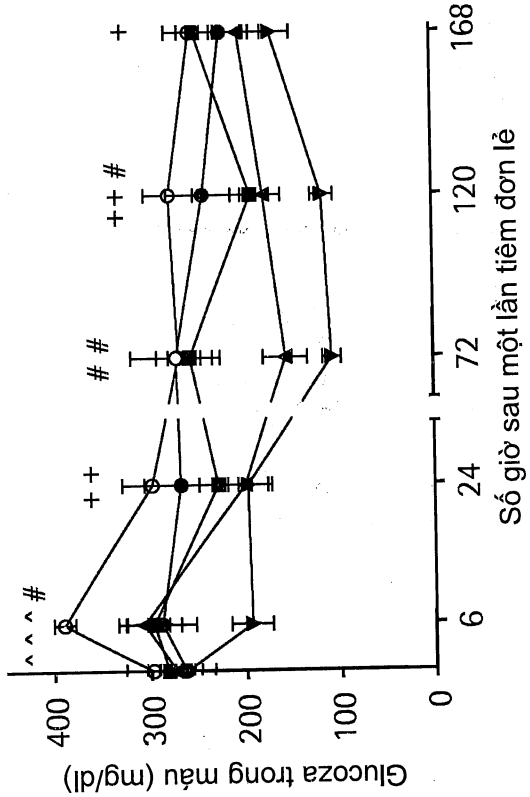


FIG. 53B

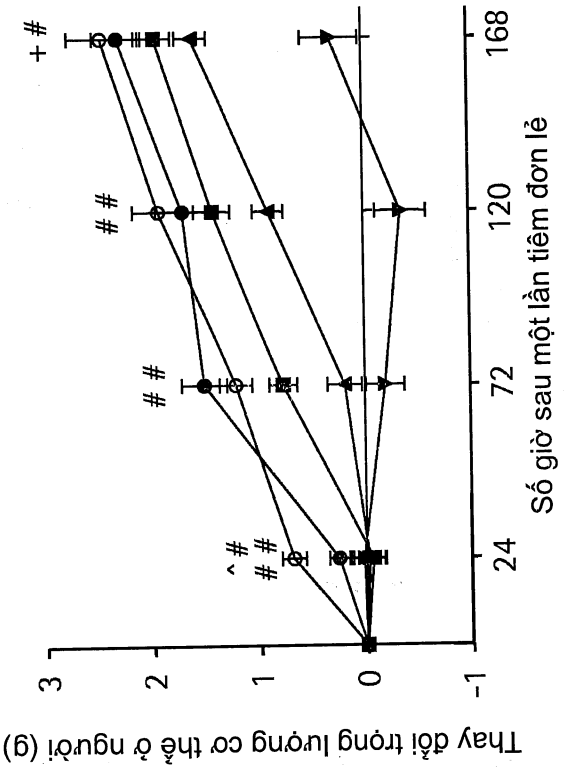
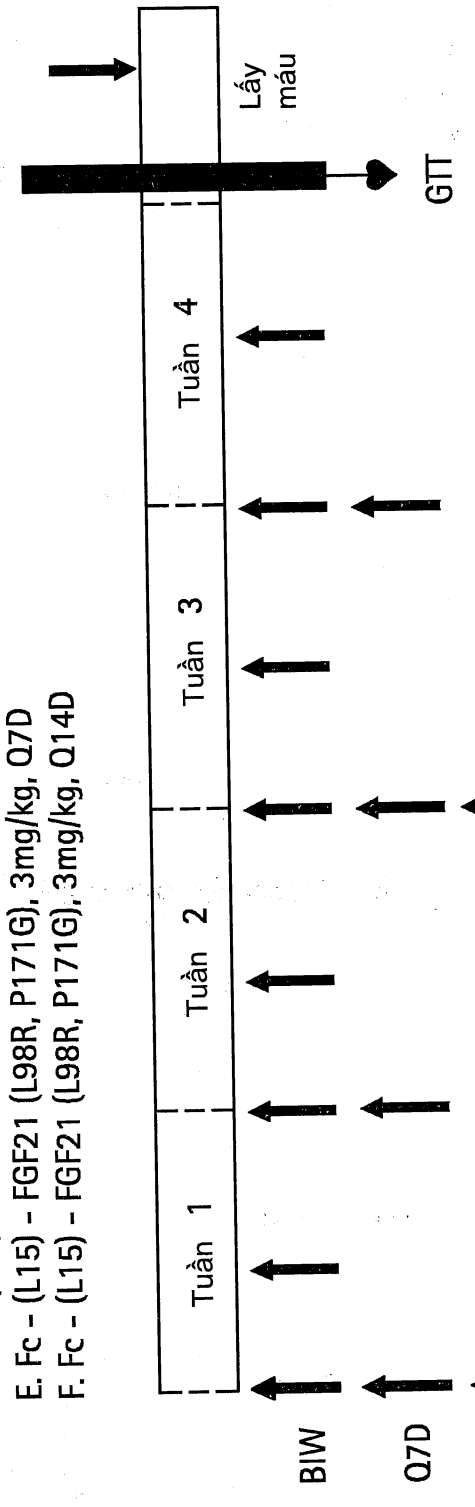


FIG. 54

A. Môi trường dẫn thuốc Q7D
B. Fc - (G4S)3 - FGF21 (L98R, P171G, A180E), 3mg/kg, Q7D
C. Fc - (G4S)3 - FGF21 (L98R, P171G, A180E), 3mg/kg, Q14D
D. Fc - (L15) - FGF21 (L98R, P171G), 3mg/kg, BIW
E. Fc - (L15) - FGF21 (L98R, P171G), 3mg/kg, Q7D
F. Fc - (L15) - FGF21 (L98R, P171G), 3mg/kg, Q14D



Đệm : 10mM Tris, 2,2% sucroza , 3,3% Sorbitol; pH 8,5

FIG. 55

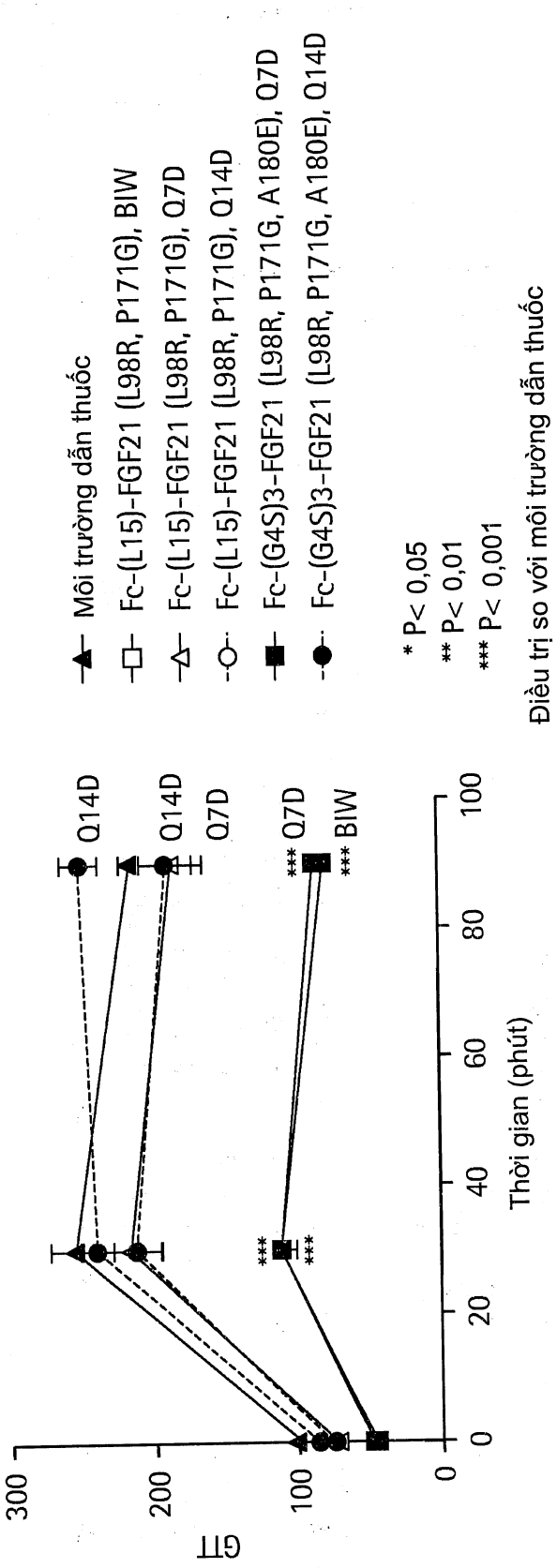

Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G), BIW
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G), Q7D
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G), Q14D
Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E), Q7D
Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E), Q14D
* P< 0,05
** P< 0,01
*** P< 0,001
Điều trị so với môi trường dẫn thuốc
GTT
300
200
100
0
0
20
40
60
80
100
Thời gian (phút)
Q14D
Q14D
Q7D
*** Q7D
*** BIW
***
***

FIG. 56

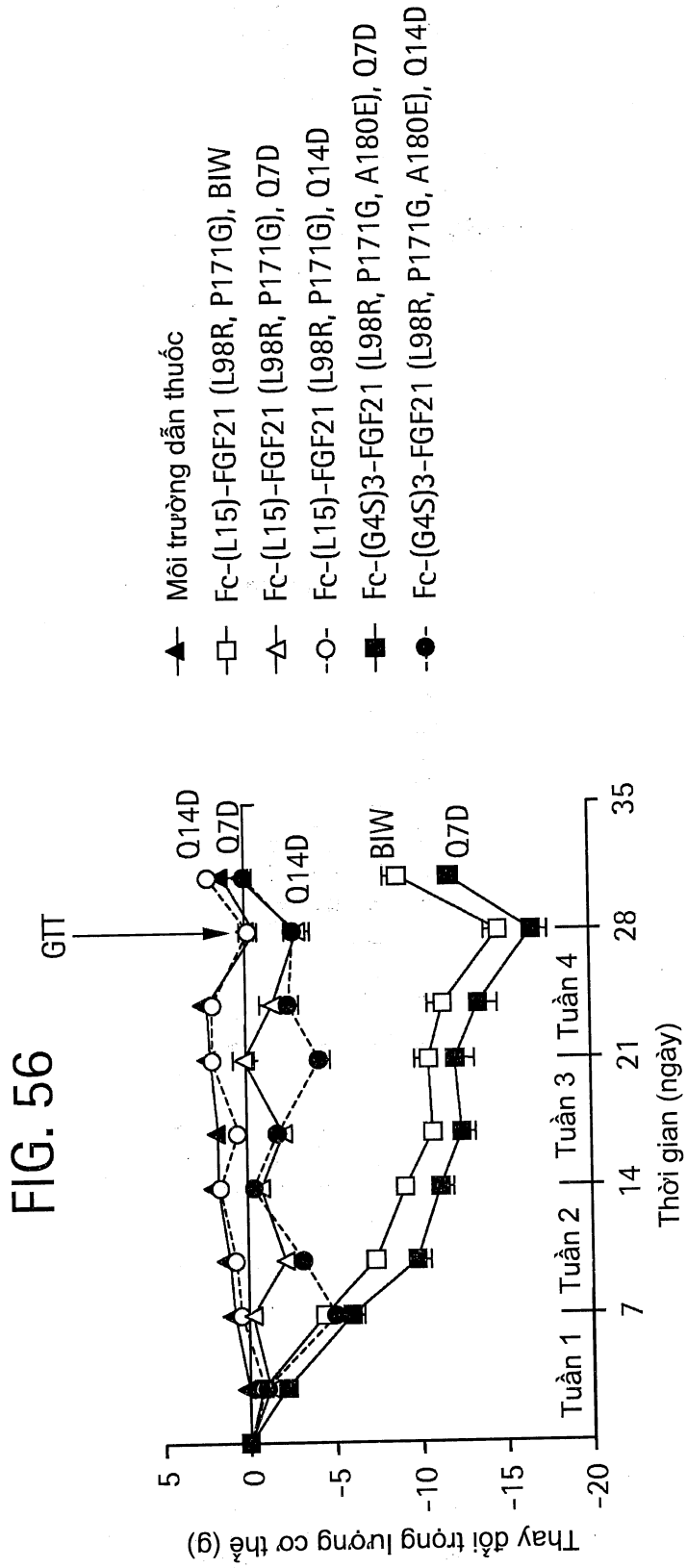

Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G), BIW
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G), Q7D
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G), Q14D
Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E), Q7D
Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E), Q14D
GTT
Q14D
Q7D
Q14D
BIW
Q7D
Thay đổi trọng lượng cơ thể (g)
5
0
-5
-10
-15
-20
Tuần 1
Tuần 2
Tuần 3
Tuần 4
7
14
21
28
35
Thời gian (ngày)

FIG. 57

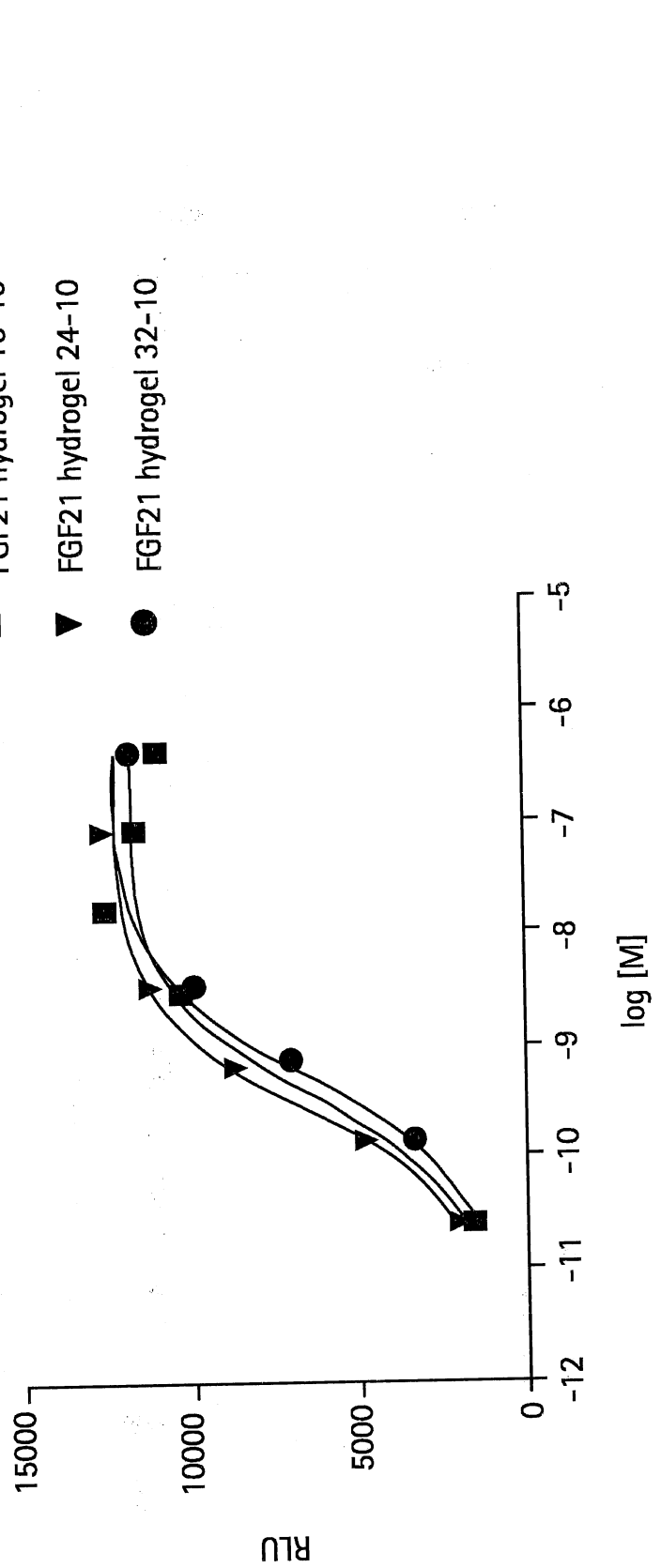

Fc - (L15) - FGF21 (L98R, P171G) đối chứng
FGF21 hydrogel 16-10
FGF21 hydrogel 24-10
FGF21 hydrogel 32-10
RLU
15000
10000
5000
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [M]

FIG. 58

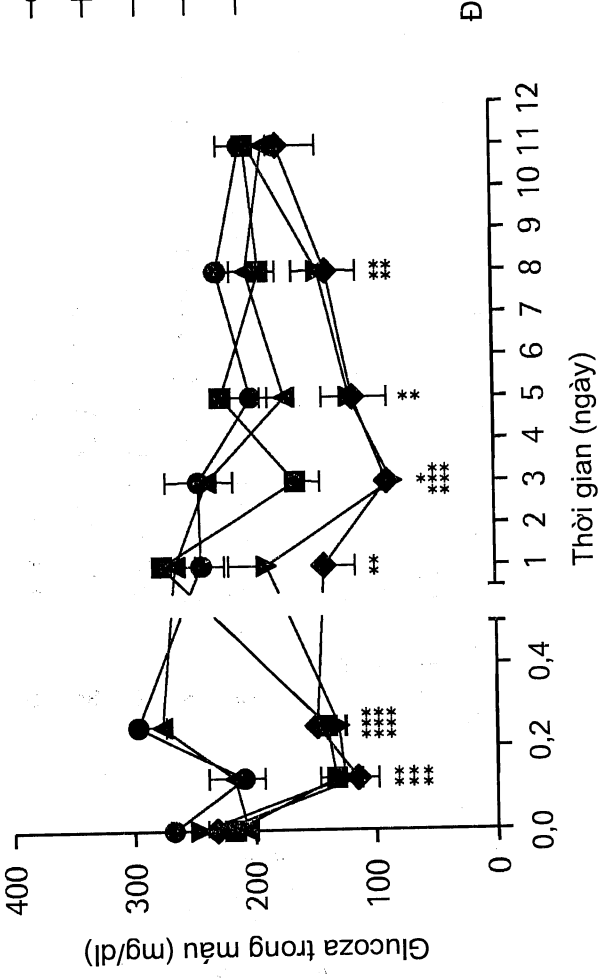

Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G)
Hydrogel đối chứng 16:1
Fc-(L15)-FGF21(L98R,P171G) hydrogel 24:1
FC-(L15)-FGF21(L98R, P171G) hydrogel 32:1
* P< 0,05
** P< 0,01
*** P< 0,001
Điều trị so với môi trường dẫn thuốc
Glucoza trong máu (mg/dl)
400
300
200
100
0
0,0
0,2
0,4
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Thời gian (ngày)

FIG. 59

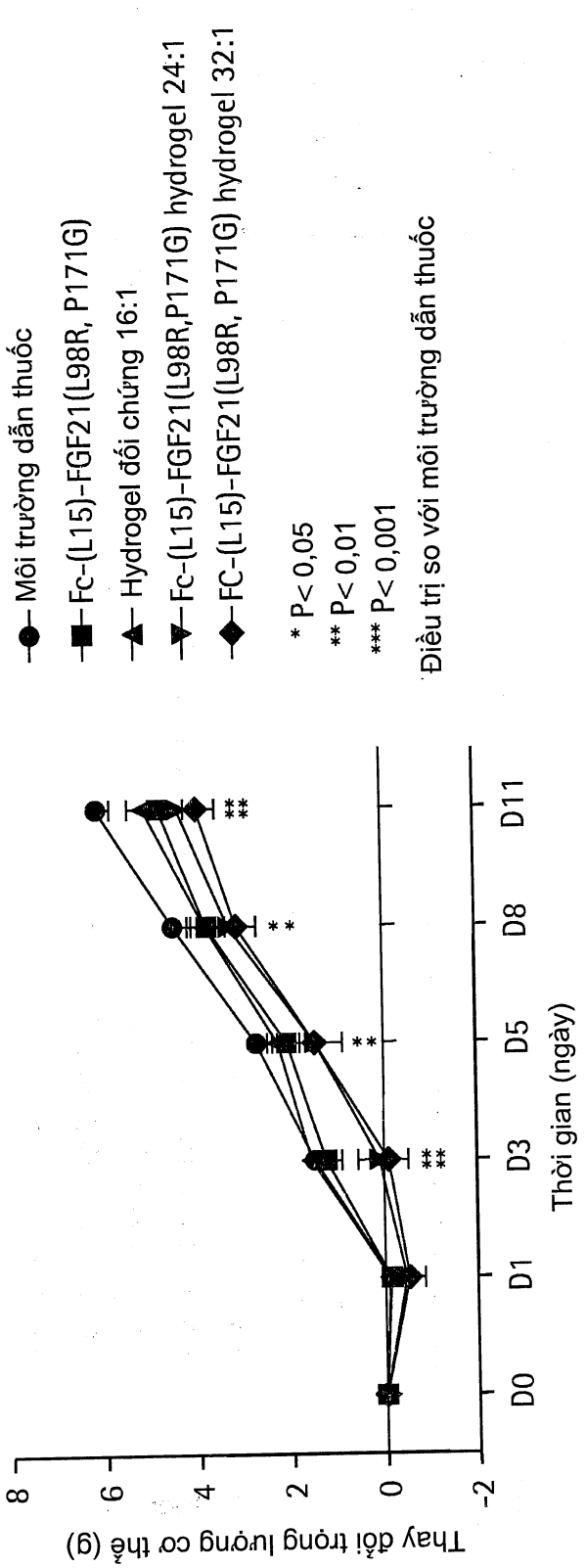

Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G)
Hydrogel đối chứng 16:1
Fc-(L15)-FGF21(L98R,P171G) hydrogel 24:1
FC-(L15)-FGF21(L98R, P171G) hydrogel 32:1
* P< 0,05
** P< 0,01
*** P< 0,001
Điều trị so với môi trường dẫn thuốc
Thay đổi trọng lượng cơ thể (g)
8
6
4
2
0
-2
D0
D1
D3
D5
D8
D11
Thời gian (ngày)

FIG. 60

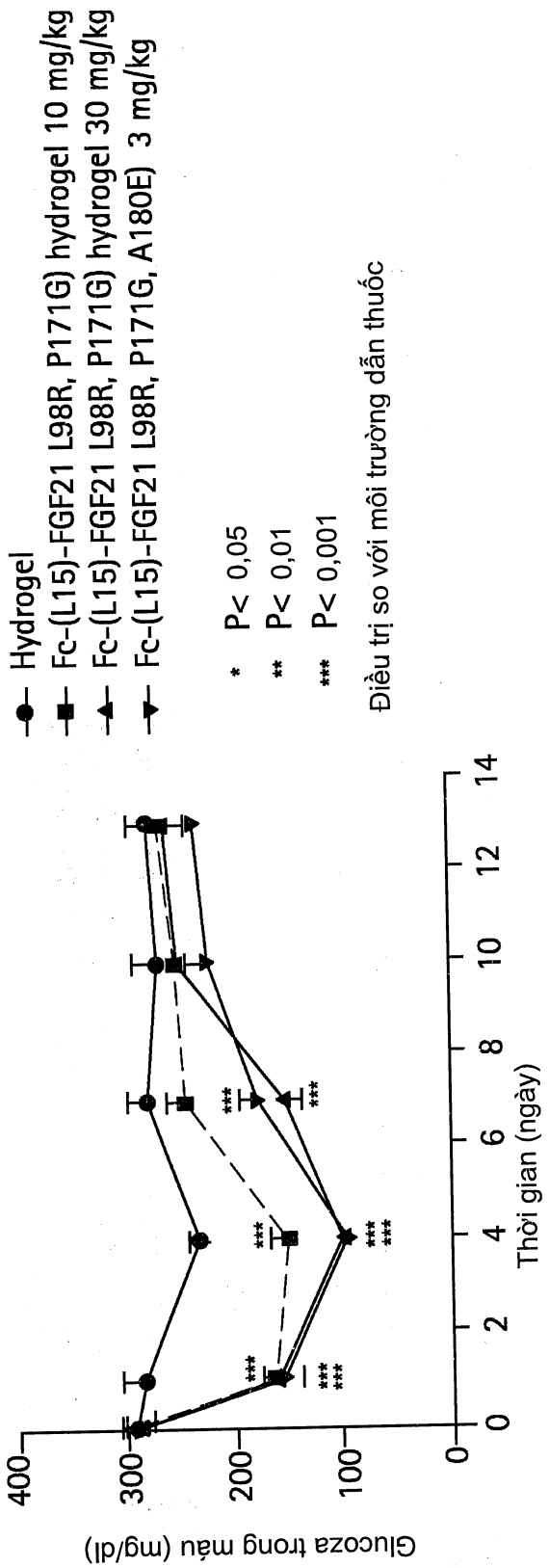

Hydrogel
Fc-(L15)-FGF21 L98R, P171G) hydrogel 10 mg/kg
Fc-(L15)-FGF21 L98R, P171G) hydrogel 30 mg/kg
Fc-(L15)-FGF21 L98R, P171G, A180E) 3 mg/kg
* P< 0,05
** P< 0,01
*** P< 0,001
Điều trị so với môi trường dẫn thuốc
Glucoza trong máu (mg/dl)
Thời gian (ngày)
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
12
14

FIG. 61

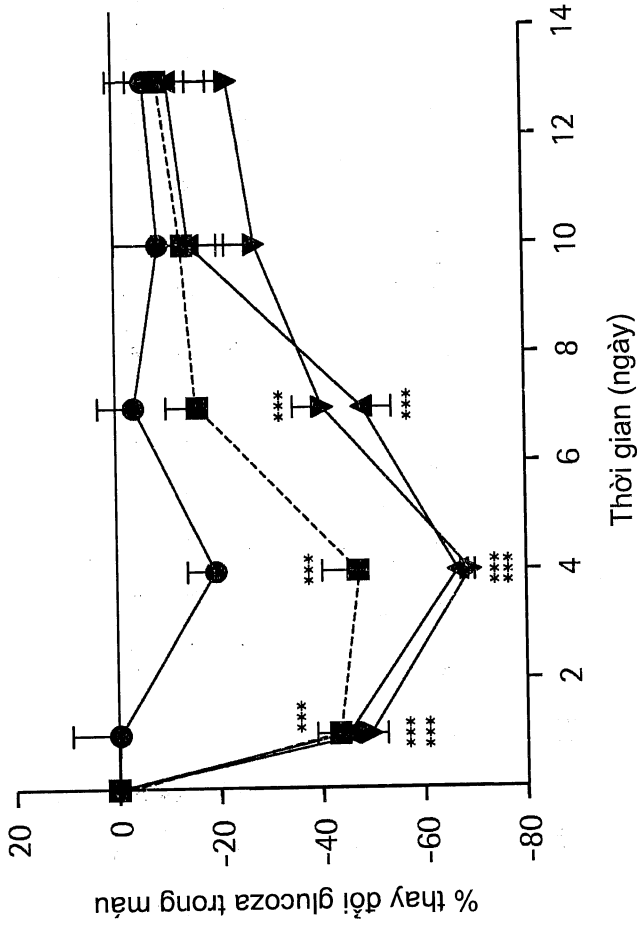

Hydrogel
Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) hydrogel 10 mg/kg
Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) hydrogel 30 mg/kg
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) 3mg/kg
* P< 0,05
** P< 0,01
*** P< 0,001
Điều trị so với môi trường dẫn thuốc
% thay đổi glucoza trong máu
20
0
-20
-40
-60
-80
2
4
6
8
10
12
14
Thời gian (ngày)
***

FIG. 62

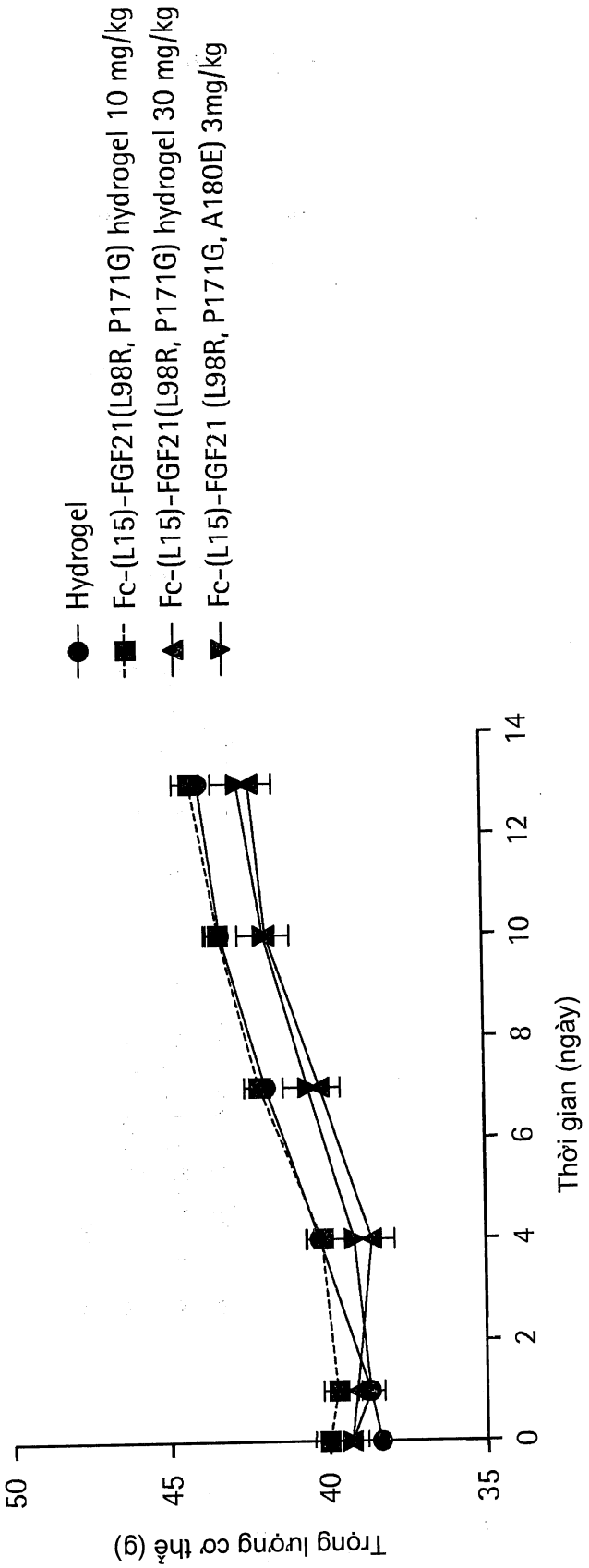

Hydrogel
Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) hydrogel 10 mg/kg
Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) hydrogel 30 mg/kg
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) 3mg/kg
Trọng lượng cơ thể (g)
50
45
40
35
0
2
4
6
8
10
12
14
Thời gian (ngày)

FIG. 63

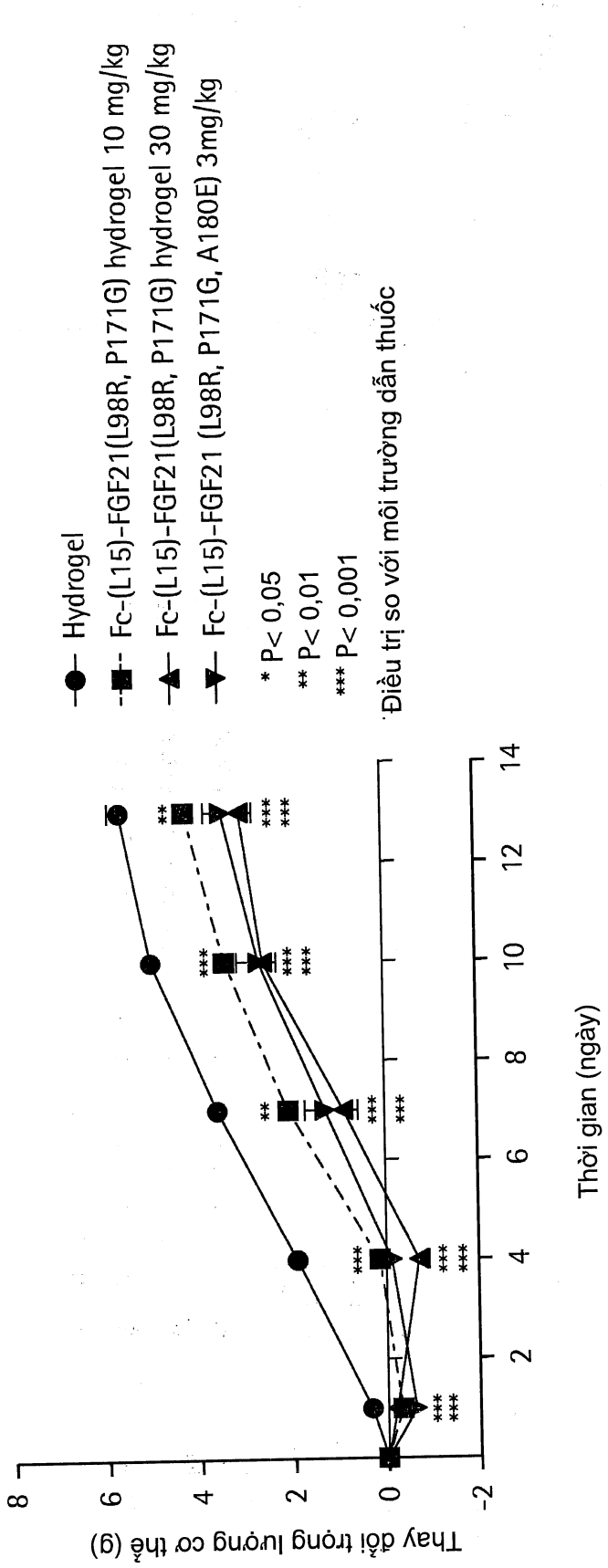

Hydrogel
Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) hydrogel 10 mg/kg
Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G) hydrogel 30 mg/kg
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) 3mg/kg
* P< 0,05
** P< 0,01
*** P< 0,001
Điều trị so với môi trường dẫn thuốc
Thay đổi trọng lượng cơ thể (g)
Thời gian (ngày)
8
6
4
2
0
-2
2
4
6
8
10
12
14

FIG. 64

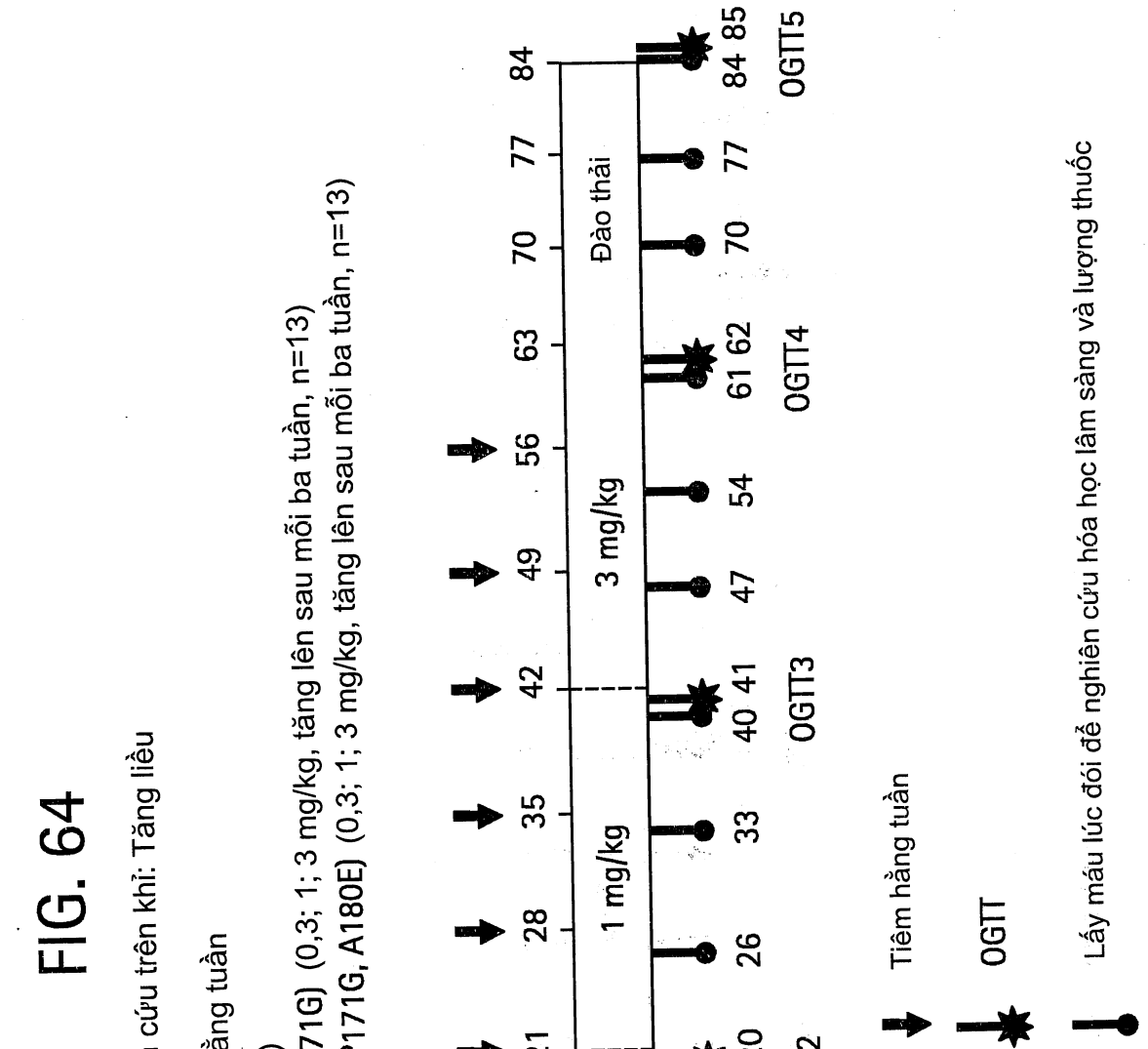

Thiết kế nghiên cứu trên khỉ: Tăng liều
Nhóm dùng liều, dùng liều hằng tuần
Môi trường dẫn thuốc (n=14)
Fc - (L15) – FGF21 (L98R, P171G) (0,3; 1; 3 mg/kg, tăng lên sau mỗi ba tuần, n=13)
Fc - (G4S)3 – FGF21 (L98R, P171G, A180E) (0,3; 1; 3 mg/kg, tăng lên sau mỗi ba tuần, n=13)
Tiêm
Thích nghi môi trường
0,3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
Đào thải
-14 -12 -7 -6 0 5 7 12 14 19 20 21 26 28 33 35 40 41 42 47 49 54 56 61 62 63 70 77 84 84 85
OGTT1
OGTT2
OGTT3
OGTT4
OGTT5
Tiêm hằng tuần
OGTT
Lấy máu lúc đói để nghiên cứu hóa học lâm sàng và lượng thuốc

FIG. 65

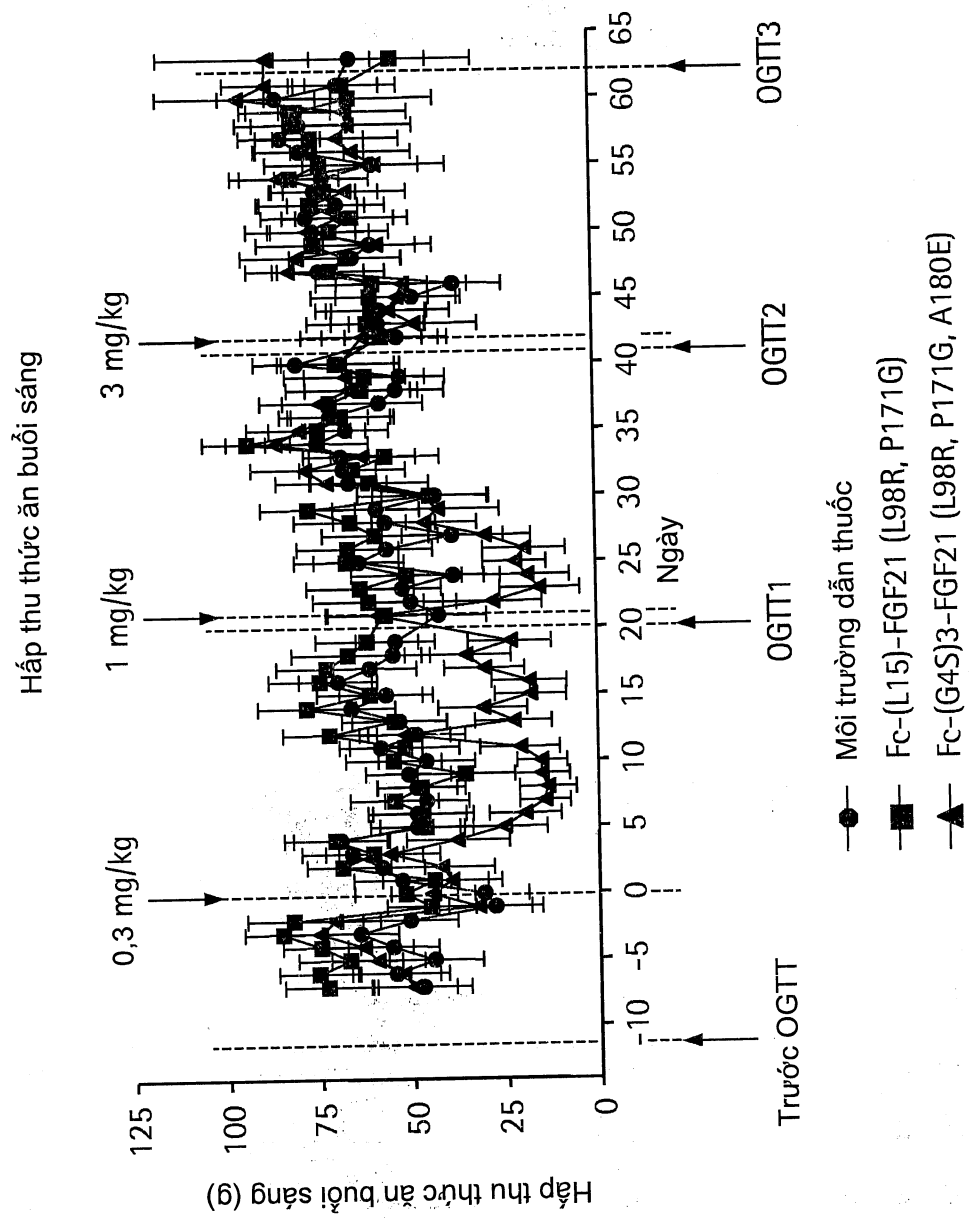

Hấp thu thức ăn buổi sáng
0,3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
Hấp thu thức ăn buổi sáng (g)
125
100
75
50
25
0
-10
-5
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
Ngày
Trước OGTT
OGTT1
OGTT2
OGTT3
Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E)

FIG. 66

Hấp thu hoa quả

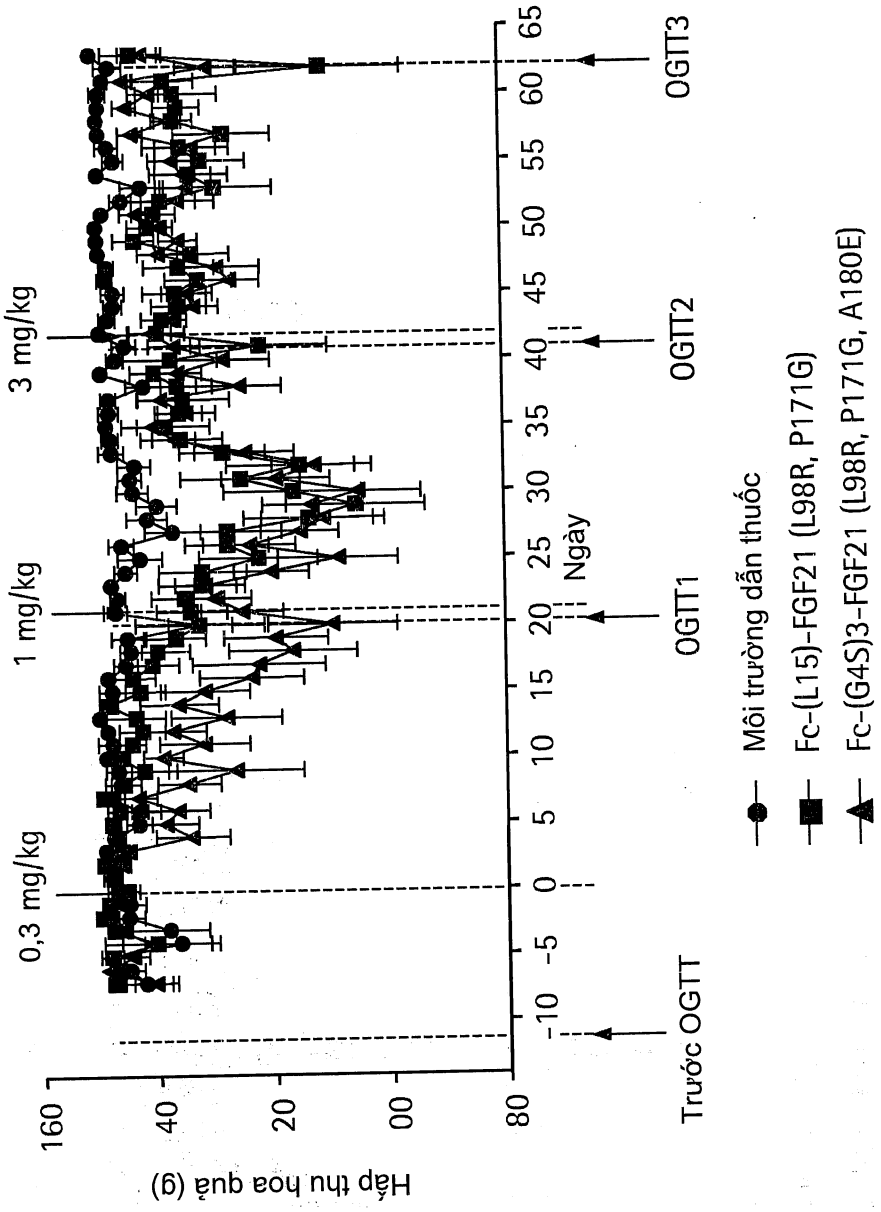


FIG. 67

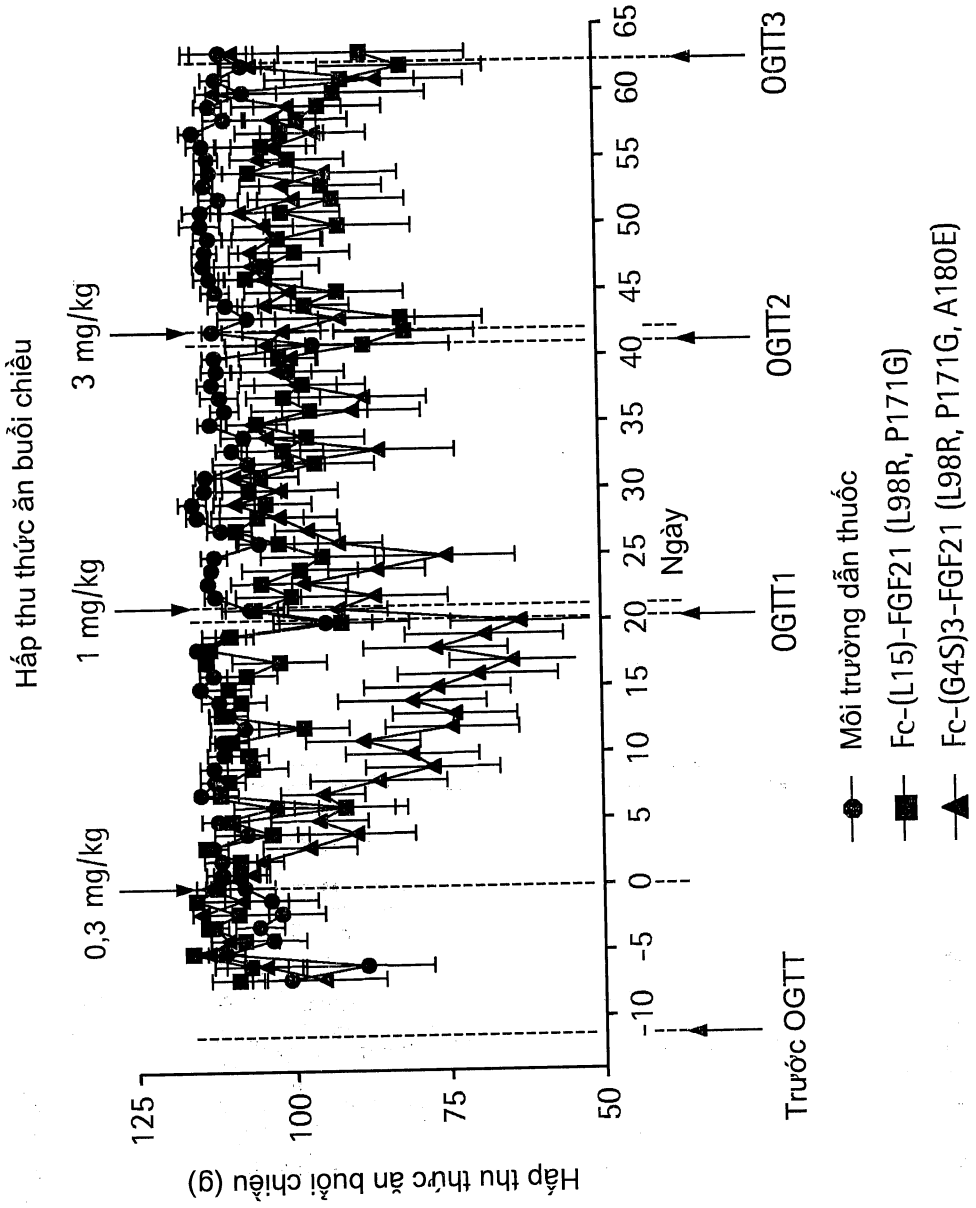

Hấp thu thức ăn buổi chiều
0,3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
Hấp thu thức ăn buổi chiều (g)
125
100
75
50
-10
-5
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
Ngày
Trước OGTT
OGTT1
OGTT2
OGTT3
Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E)

FIG. 68

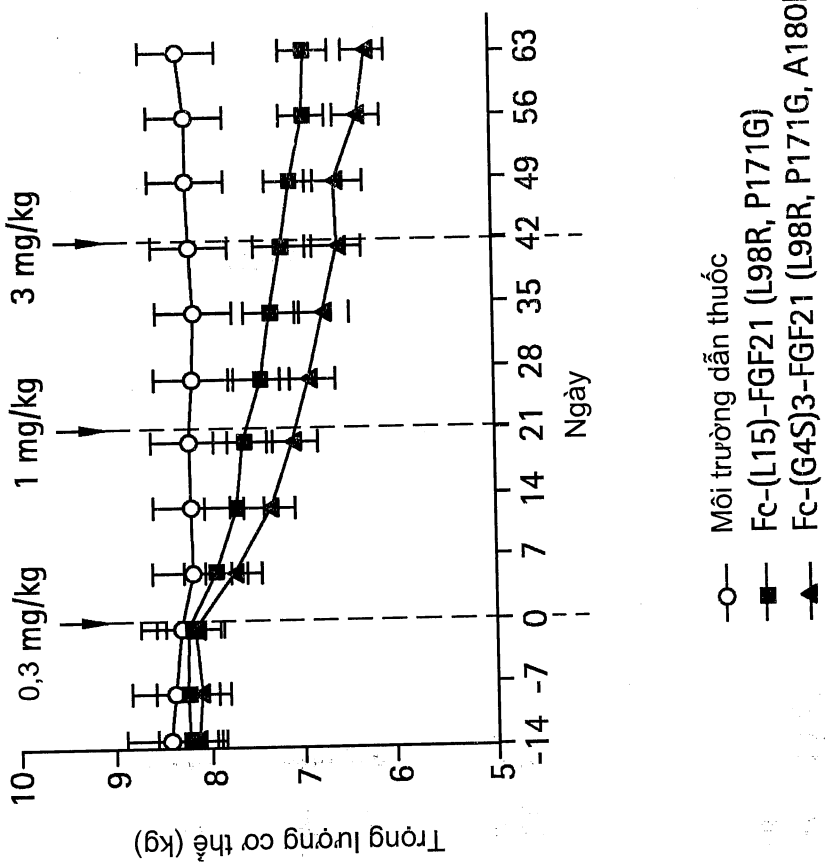

Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E)
Trọng lượng cơ thể (kg)
10
9
8
7
6
5
BMt
0,3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
-14
-7
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
Ngày

FIG. 69

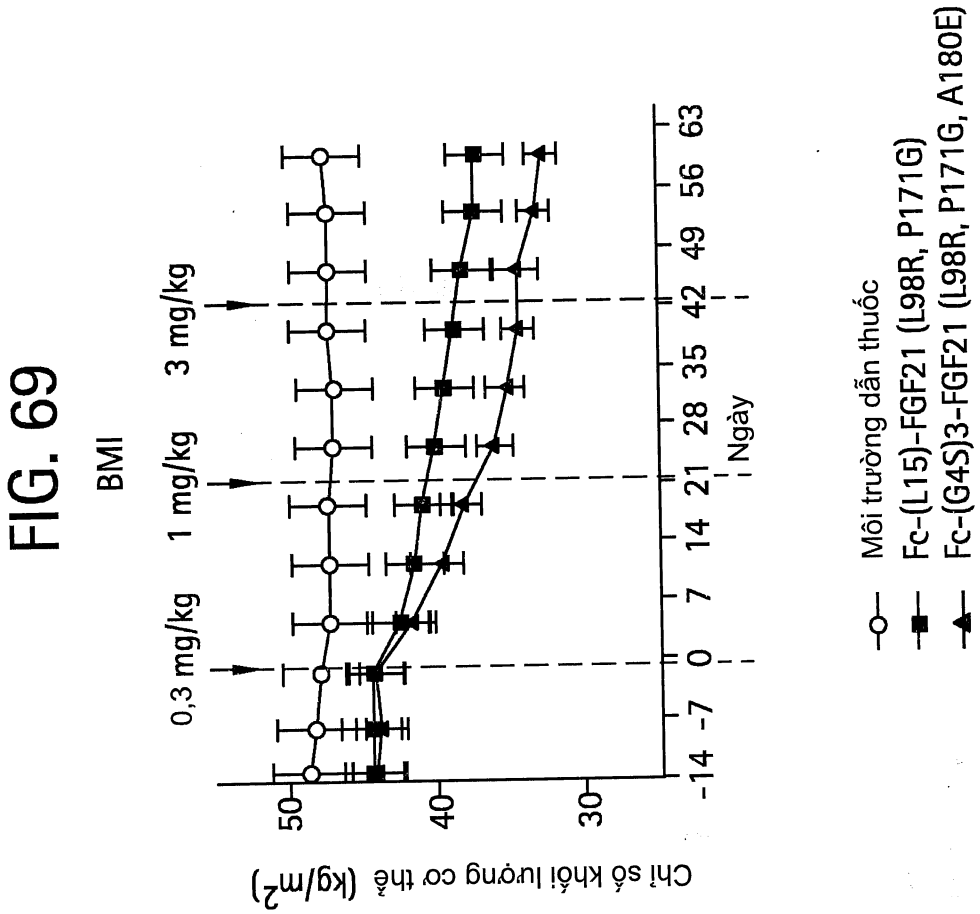

BMI
0,3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
Chỉ số khối lượng cơ thể (kg/m²)
50
40
30
-14
-7
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
Ngày
Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E)

FIG. 70

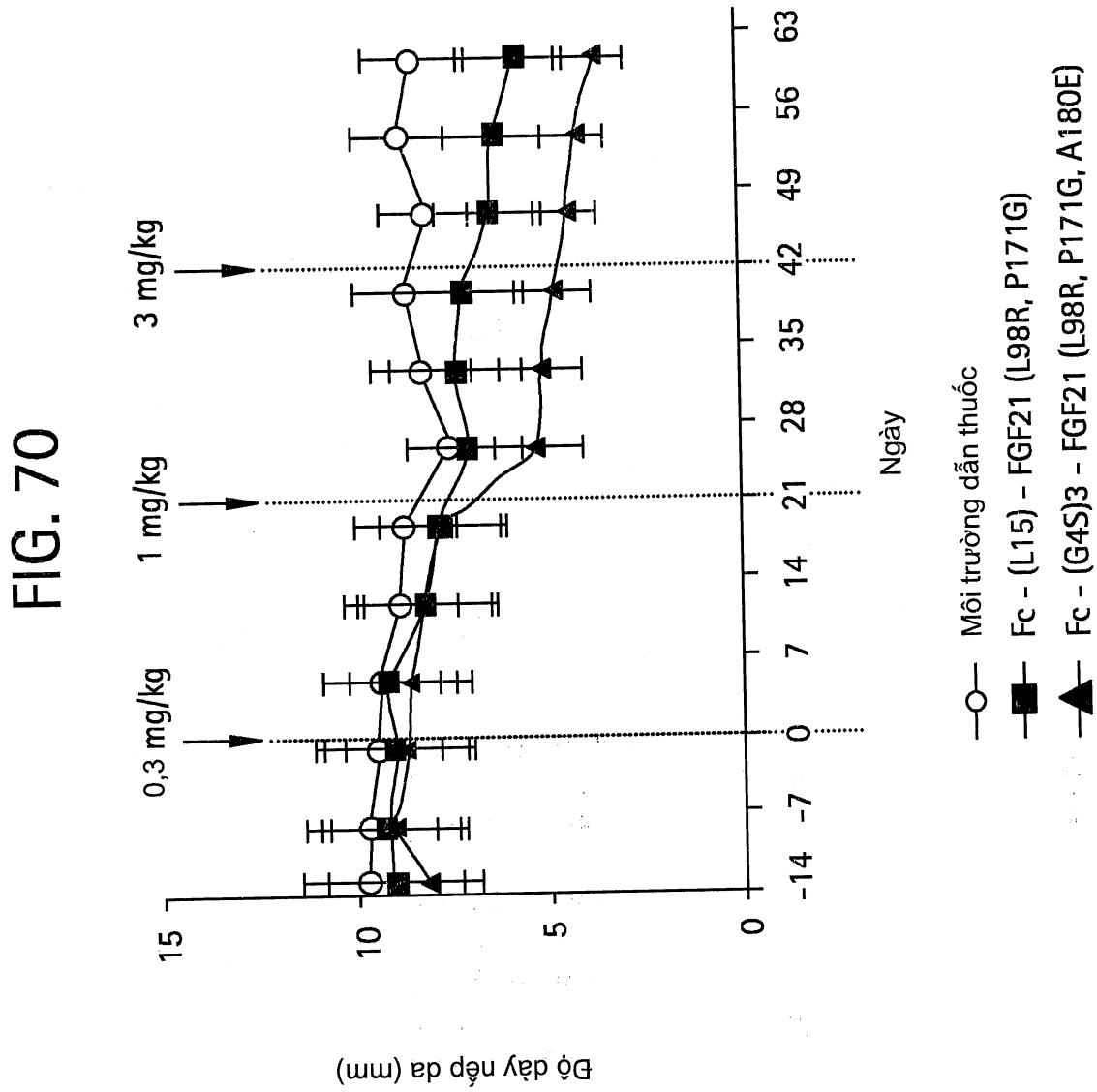

Độ dày nếp da (mm)
15
10
5
0
0,3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
-14
-7
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
Ngày
Môi trường dẫn thuốc
Fc - (L15) - FGF21 (L98R, P171G)
Fc - (G4S)3 - FGF21 (L98R, P171G, A180E)

FIG. 71

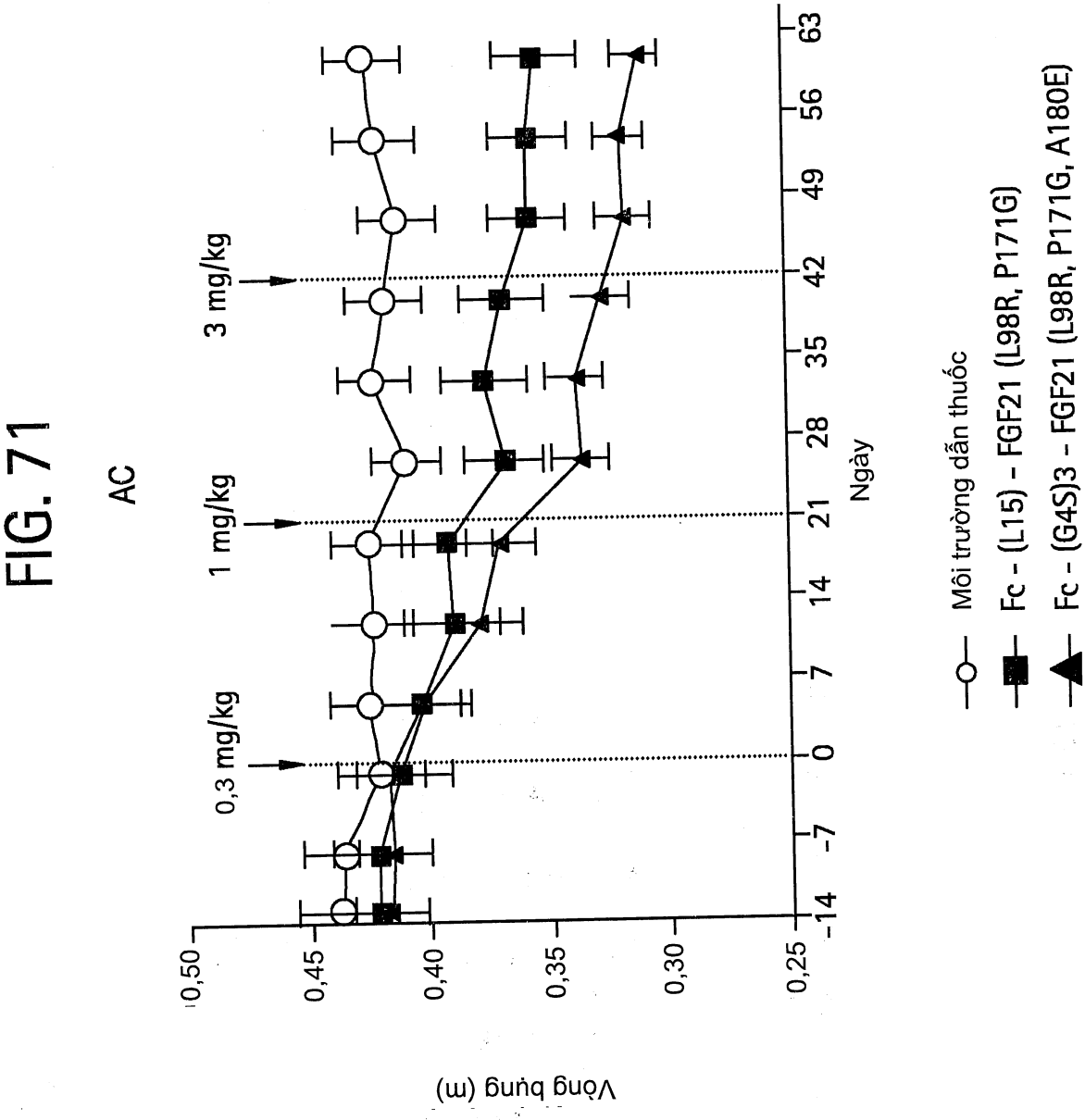

AC
0,3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
Vòng bụng (m)
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
-14
-7
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
Ngày
Môi trường dẫn thuốc
Fc - (L15) - FGF21 (L98R, P171G)
Fc - (G4S)3 - FGF21 (L98R, P171G, A180E)

FIG.72

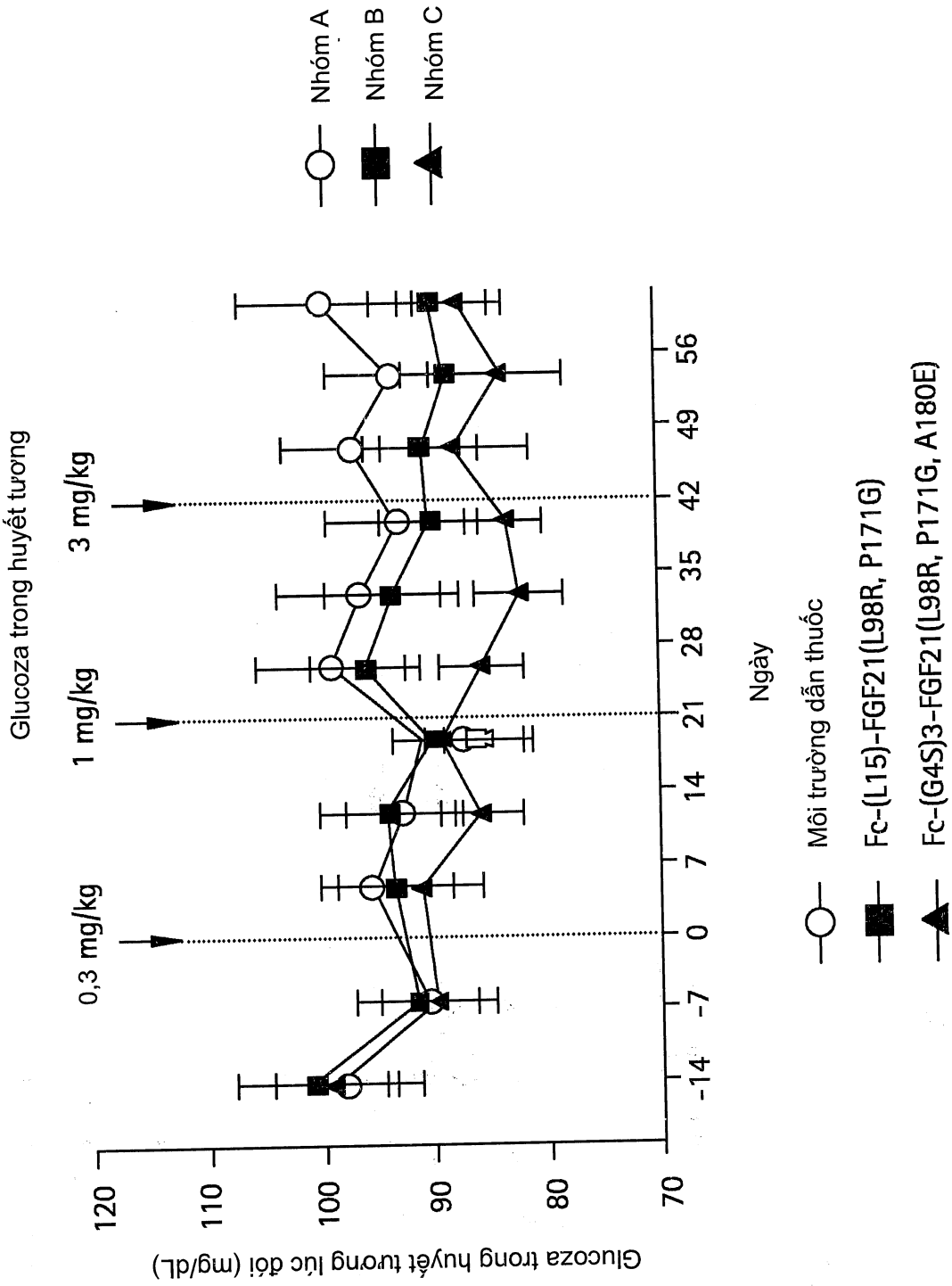

Glucoza trong huyết tương
0,3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
Nhóm A
Nhóm B
Nhóm C
Glucoza trong huyết trong lúc đói (mg/dL)
120
110
100
90
80
70
-14
-7
0
7
14
21
28
35
42
49
56
Ngày
Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G)
Fc-(G4S)3-FGF21(L98R, P171G, A180E)

FIG. 73

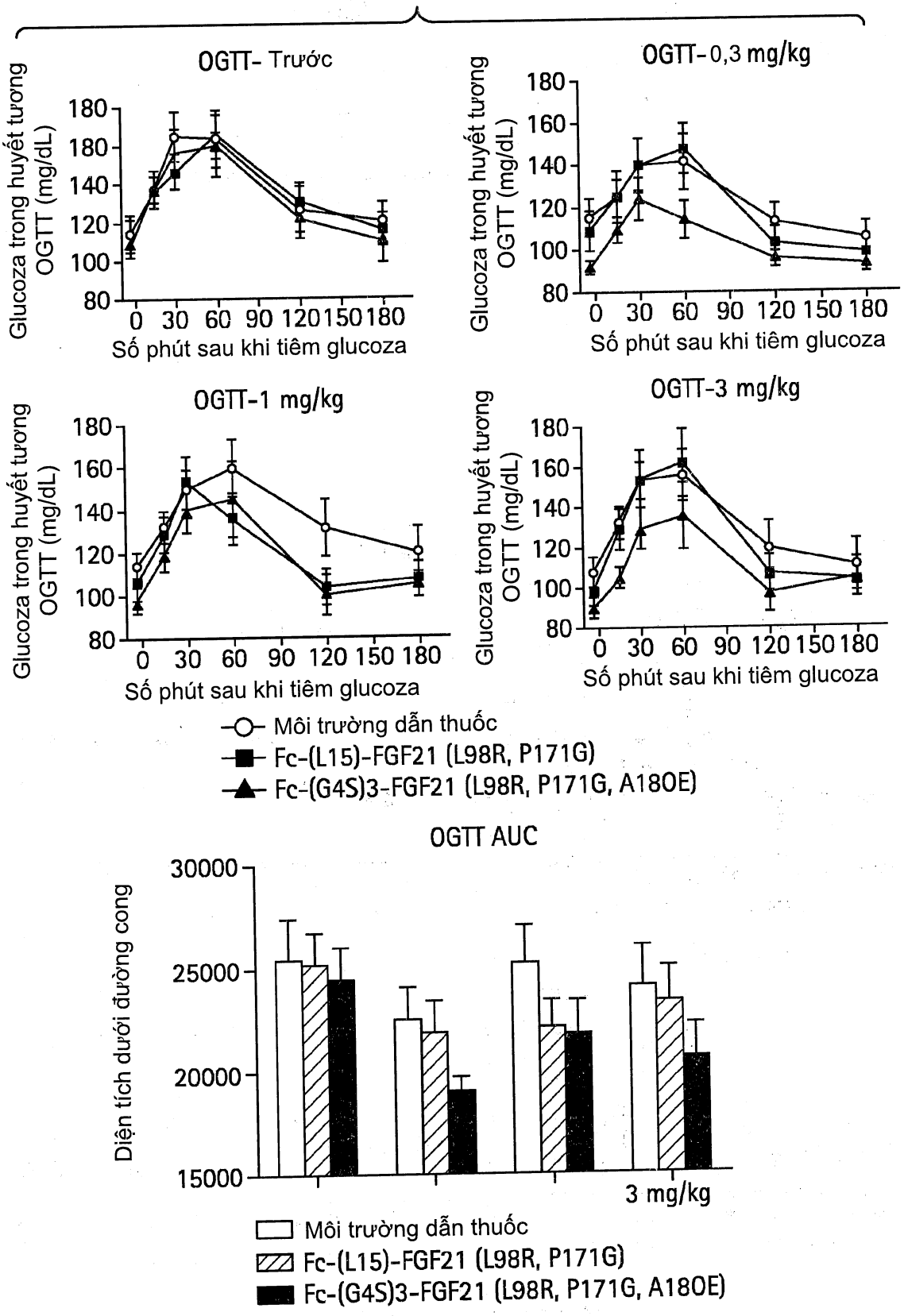

OGTT- Trước
OGTT-0,3 mg/kg
OGTT-1 mg/kg
OGTT-3 mg/kg
Glucoza trong huyết tương OGTT (mg/dL)
Số phút sau khi tiêm glucoza
0 30 60 90 120 150 180
80 100 120 140 160 180
Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E)
OGTT AUC
Diện tích dưới đường cong
15000 20000 25000 30000
3 mg/kg
Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
Fc-(G4S)3-FGF21 (L98R, P171G, A180E)

FIG. 74

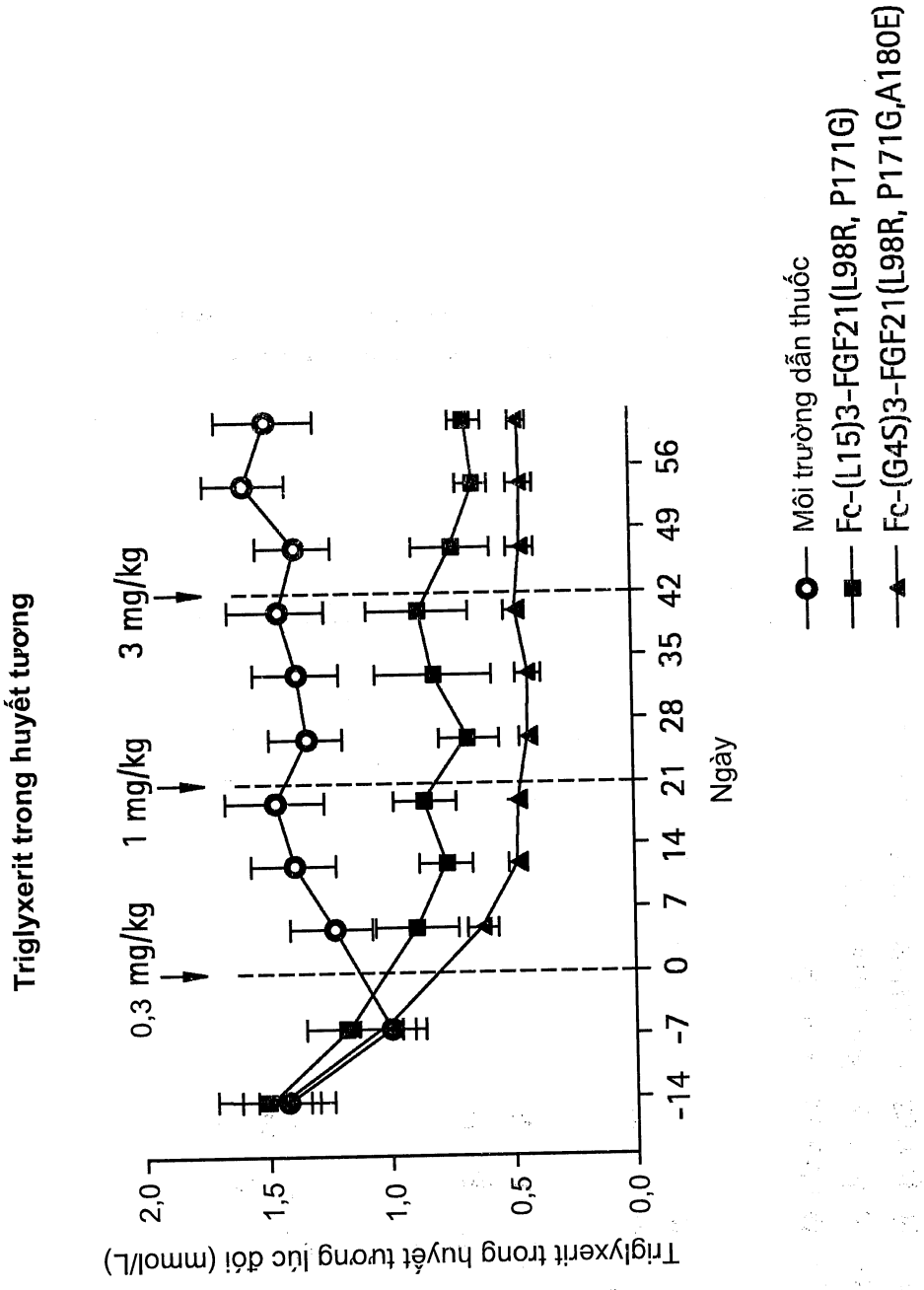

Triglyxerit trong huyết tương
0,3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
Triglyxerit trong huyết tương lúc đói (mmol/L)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-14
-7
0
7
14
21
28
35
42
49
56
Ngày
Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)3-FGF21(L98R, P171G)
Fc-(G4S)3-FGF21(L98R, P171G,A180E)

FIG. 75

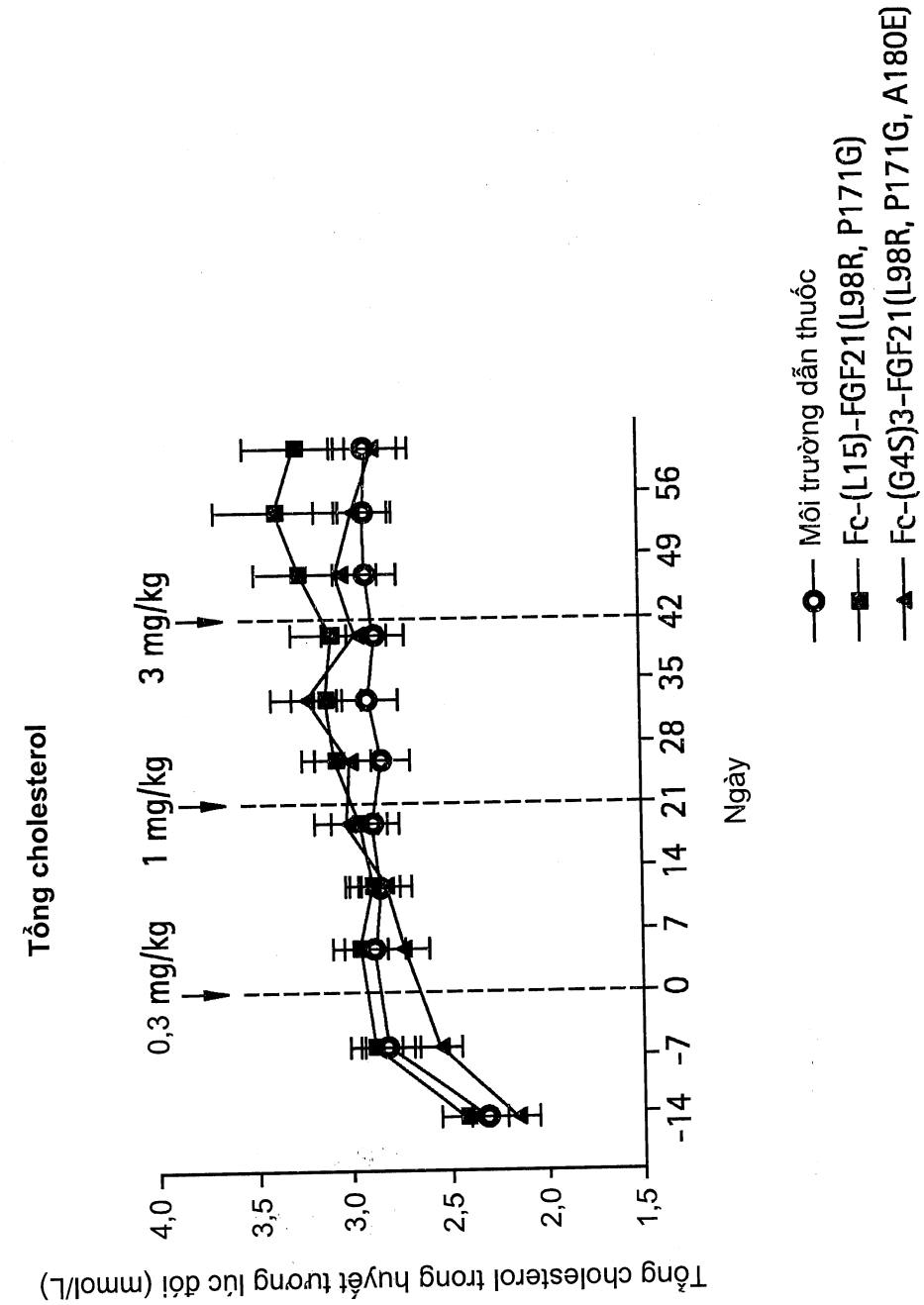

Tổng cholesterol
0,3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
Tổng cholesterol trong huyết tương lúc đói (mmol/L)
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
-14
-7
0
7
14
21
28
35
42
49
56
Ngày
Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G)
Fc-(G4S)3-FGF21(L98R, P171G, A180E)

FIG. 76

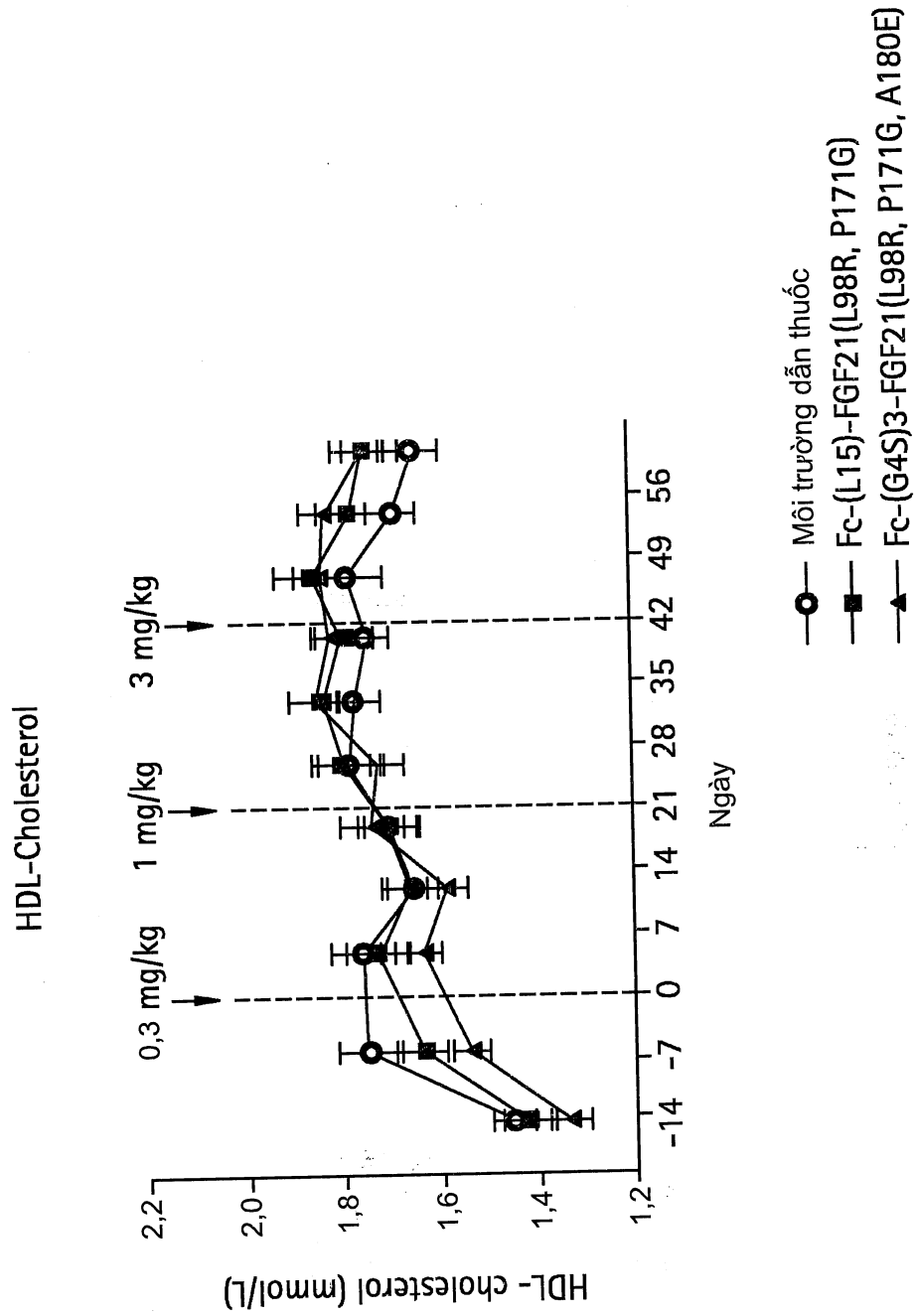

HDL-Cholesterol
0,3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
HDL- cholesterol (mmol/L)
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
-14
-7
0
7
14
21
28
35
42
49
56
Ngày
Môi trường dẫn thuốc
Fc-(L15)-FGF21(L98R, P171G)
Fc-(G4S)3-FGF21(L98R, P171G, A180E)

FIG. 77

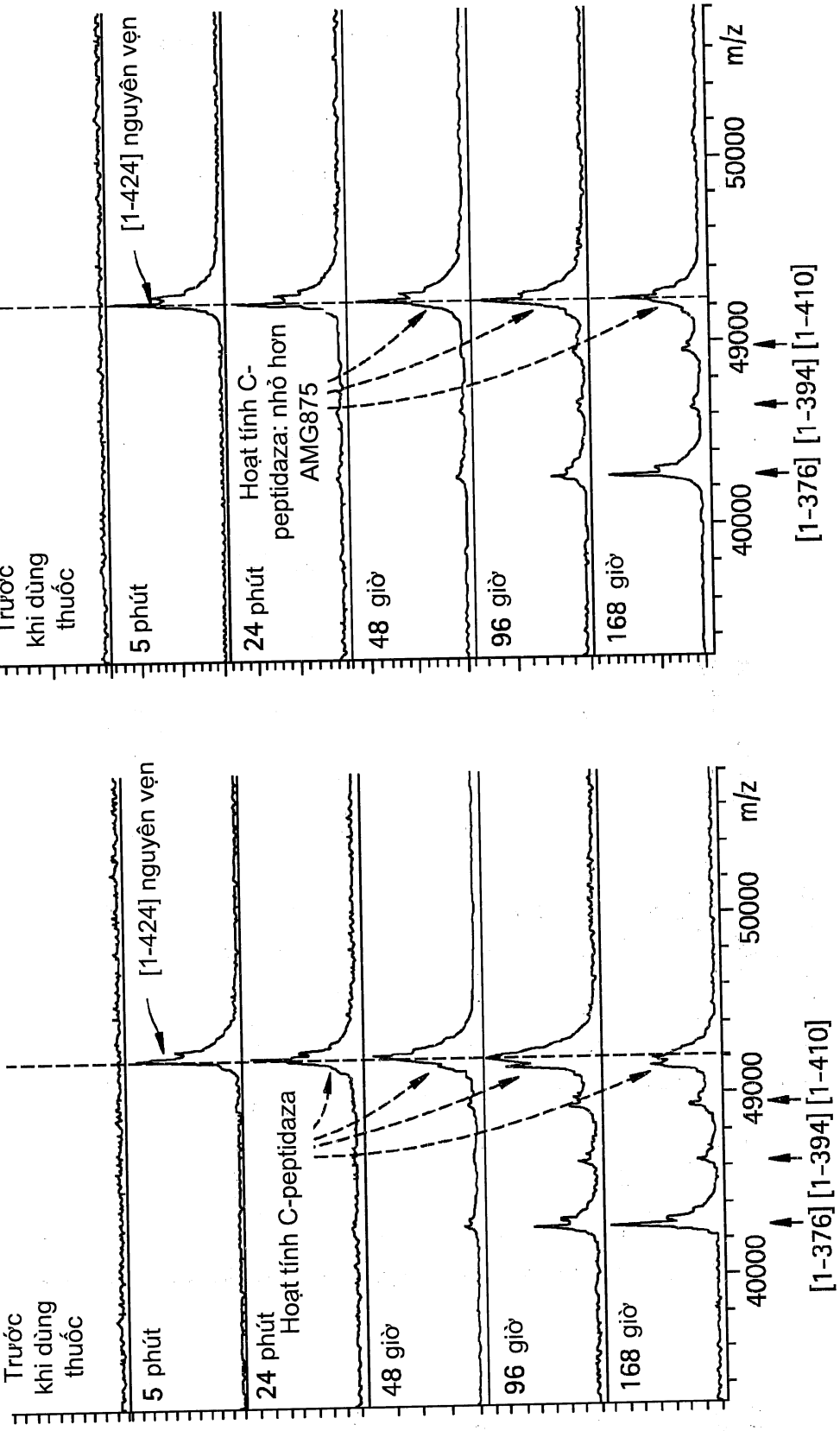

Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G)
Trước khi dùng thuốc
5 phút
24 phút
Hoạt tính C-peptidaza
48 giờ
96 giờ
168 giờ
[1-424] nguyên vẹn
40000
49000
50000
m/z
[1-376] [1-394] [1-410]
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E)
Trước khi dùng thuốc
5 phút
24 phút
Hoạt tính C-peptidaza: nhỏ hơn AMG875
48 giờ
96 giờ
168 giờ
[1-424] nguyên vẹn
40000
49000
50000
m/z
[1-376] [1-394] [1-410]

FIG. 78

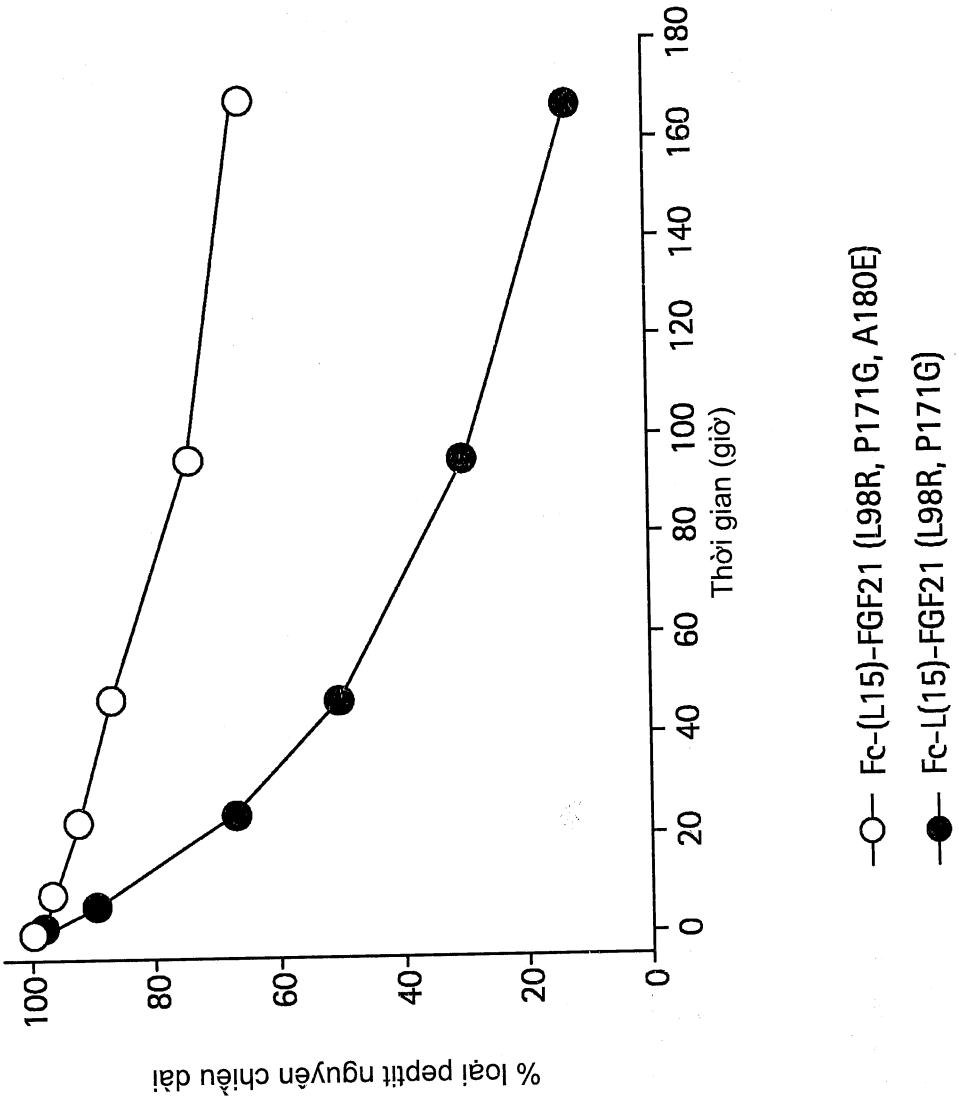

% loại peptit nguyên chiều dài
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Thời gian (giờ)
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E)
Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G)

FIG. 79

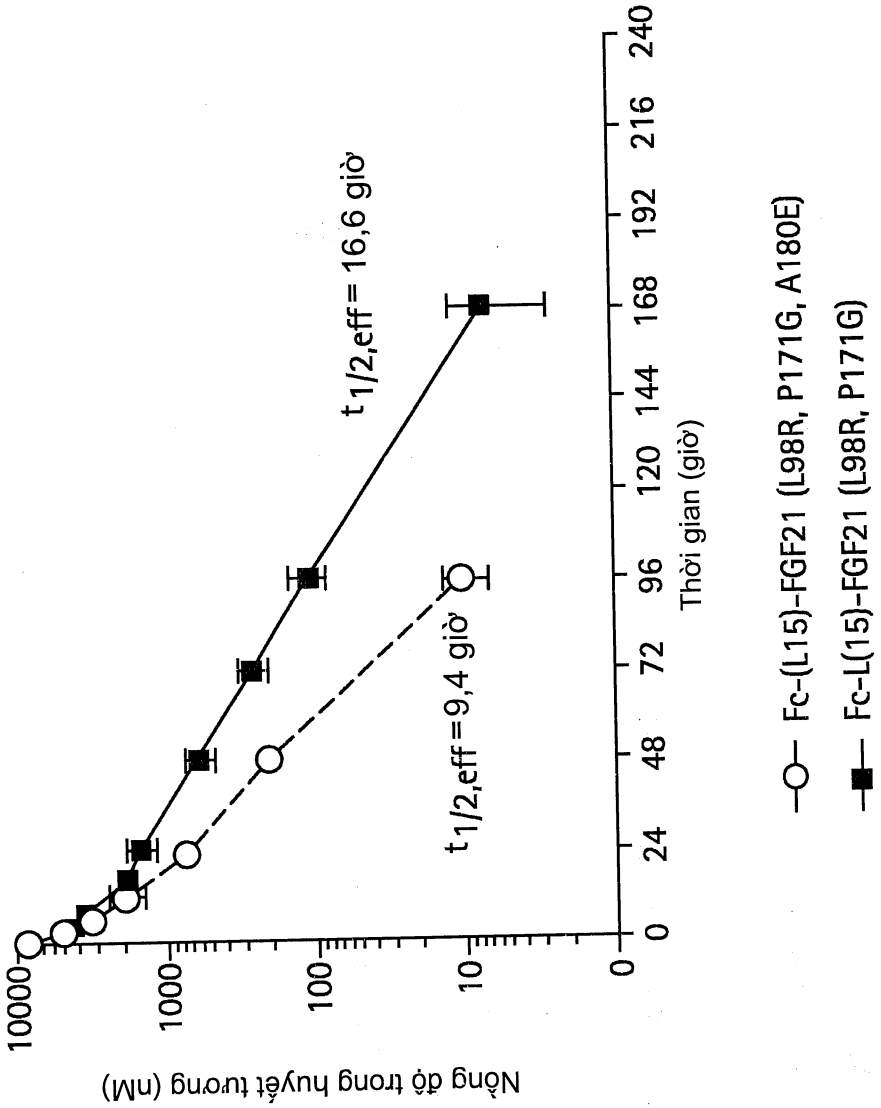
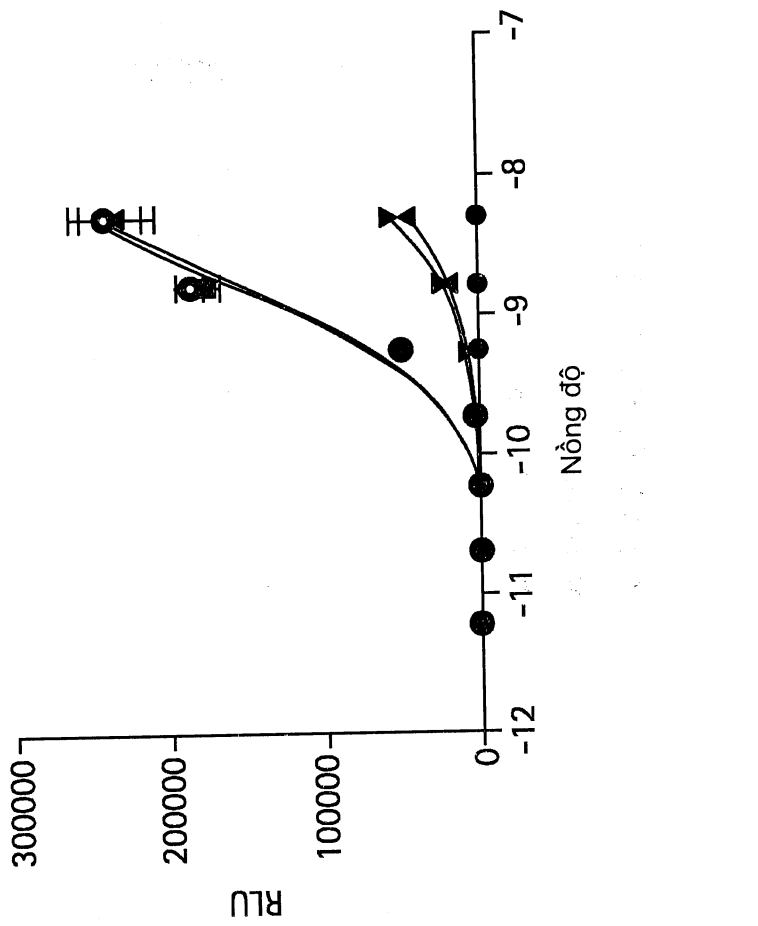

Nồng độ trong huyết tương (nM)
10000
1000
100
10
0
24
48
72
96
120
144
168
192
216
240
Thời gian (giờ)
t 1/2,eff = 16,6 giờ
t 1/2,eff = 9,4 giờ
Fc-(L15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E)
Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G)

FIG. 80


RLU
300000
200000
100000
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
Nồng độ
Đối chứng âm
FGF21
FGF21 (Y179N, S181T)
FGF21 Y179N
FGF21 P124S

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Belouski, Edward J.
Ellison, Murielle M.
Hamburger, Agnes E.
Hecht, Randy I.
Li, Yue-Sheng
Michaels, Mark L.
Sun, Jeonghoon
Xu, Jing

<120> POLYPEPTIT FGF21 ĐỘT BIẾN, AXIT NUCLEIC MÃ HÓA POLYPEPTIT NÀY VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA POLYPEPTIT NÀY DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ RỐI LOẠN CHUYỂN HÓA

<130> A-1429-WO-PCT2

<160> 165

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 630
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(630)

<400> 1

```
atg gac tcg gac gag acc ggg ttc gag cac tca gga ctg tgg gtt tct        48
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1               5                  10                  15

gtg ctg gct ggt ctt ctg ctg gga gcc tgc cag gca cac ccc atc cct        96
Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
            20                  25                  30

gac tcc agt cct ctc ctg caa ttc ggg ggc caa gtc cgg cag cgg tac       144
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
        35                  40                  45

ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc cac ctg gag atc agg       192
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
    50                  55                  60

gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag agc ccc gaa agt ctc       240
Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65                  70                  75                  80
```

```
ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att caa atc ttg gga gtc        288
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
                85                  90                  95

aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat ggg gcc ctg tat gga        336
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
            100                 105                 110

tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc cgg gag ctg ctt ctt        384
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
        115                 120                 125

gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg        432
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
    130                 135                 140

cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac cct gca ccc cga gga        480
His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145                 150                 155                 160

cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc ccc gca ccc ccg gag        528
Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
                165                 170                 175

cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat gtg ggc tcc tcg gac        576
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
            180                 185                 190

cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga agc ccc agc tac gct        624
Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
        195                 200                 205

tcc tga                                                               630
Ser
```

<210> 2
<211> 209
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1               5                   10                  15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
            20                  25                  30
```

Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
35 40 45

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
50 55 60

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65 70 75 80

Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
85 90 95

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
100 105 110

Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
115 120 125

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
130 135 140

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145 150 155 160

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
165 170 175

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
180 185 190

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
195 200 205

Ser

<210> 3
<211> 546

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(546)

<400> 3

```
cac ccc atc cct gac tcc agt cct ctc ctg caa ttc ggg ggc caa gtc          48
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1               5                  10                  15

cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc cac          96
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
            20                  25                  30

ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag agc         144
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
        35                  40                  45

ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att caa         192
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
    50                  55                  60

atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat ggg         240
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65                  70                  75                  80

gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc cgg         288
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
                85                  90                  95

gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc cac         336
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
            100                 105                 110

ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac cct         384
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
        115                 120                 125

gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc ccc         432
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
    130                 135                 140

gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat gtg         480
Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145                 150                 155                 160

ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga agc         528
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
```

165 170 175

ccc agc tac gct tcc tga 546
Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 4
<211> 181
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

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

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 5
<211> 630
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(630)

<400> 5
atg gac tcg gac gag acc ggg ttc gag cac tca gga ctg tgg gtt tct 48
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

gtg ctg gct ggt ctt ctg ctg gga gcc tgc cag gca cac ccc atc cct 96
Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
20 25 30

gac tcc agt cct ctc ctg caa ttc ggg ggc caa gtc cgg cag cgg tac 144
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
35 40 45

ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc cac ctg gag atc agg 192
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
50 55 60

gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag agc ccc gaa agt ctc 240
Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65 70 75 80

ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att caa atc ttg gga gtc 288
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
85 90 95

aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat ggg gcc ctg tat gga 336
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
100 105 110

tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc cgg gag ctg ctt ctt 384

```
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
        115                 120                 125

gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg          432
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
    130                 135                 140

cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac cct gca ccc cga gga          480
His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145                 150                 155                 160

cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc ccc gca ctc ccg gag          528
Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu
                165                 170                 175

cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat gtg ggc tcc tcg gac          576
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
            180                 185                 190

cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga agc ccc agc tac gct          624
Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
        195                 200                 205

tcc tga                                                                  630
Ser
```

<210> 6
<211> 209
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

```
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1               5                   10                  15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
            20                  25                  30

Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
        35                  40                  45

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
    50                  55                  60
```

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65 70 75 80

Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
85 90 95

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
100 105 110

Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
115 120 125

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
130 135 140

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145 150 155 160

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu
165 170 175

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
180 185 190

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
195 200 205

Ser

<210> 7
<211> 546
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(546)

<400> 7

```
cac ccc atc cct gac tcc agt cct ctc ctg caa ttc ggg ggc caa gtc          48
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1               5                  10                  15

cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc cac          96
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
            20                  25                  30

ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag agc         144
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
        35                  40                  45

ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att caa         192
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
    50                  55                  60

atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat ggg         240
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65                  70                  75                  80

gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc cgg         288
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
                85                  90                  95

gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc cac         336
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
            100                 105                 110

ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac cct         384
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
        115                 120                 125

gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc ccc         432
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
    130                 135                 140

gca ctc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat gtg         480
Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145                 150                 155                 160

ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga agc         528
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
                165                 170                 175

ccc agc tac gct tcc tga                                                546
Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 8
<211> 181

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

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

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Một phần của polypeptit FGF21 của người trưởng thành

<400> 9

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu
1 5 10

<210> 10
<211> 681
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(681)

<400> 10
gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg ggg 48
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg 96
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac 144
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg 192
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg tac 240
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc 288
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

```
aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc          336
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg          384
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc          432
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag          480
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc          528
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg          576
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg          624
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct          672
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

ccg ggt aaa                                                              681
Pro Gly Lys
225
```

<210> 11
<211> 227
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                  10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30
```

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 12
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 12
aggaggaata acatatgcat ccaattccag attcttctcc 40

<210> 13
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 13
tagtgagctc gaattcttag gaagcgtagc tgg 33

<210> 14
<211> 41
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 14
ggagatatac atatgccaat tccagattct tctccattat t 41

<210> 15
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 15
catatgtata tctccttctt aaagttaaac aaaa 34

<210> 16

<211> 34
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 16
aaaacaaatt gaaattcttc ctctatatgt atac 34

<210> 17
<211> 63
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi có nghĩa từ một phần của cấu trúc biểu hiện FGF21

<400> 17
ttttgtttaa ctttaagaag gagatataca tatgcatcca attccagatt cttctccatt 60
att 63

<210> 18
<211> 63
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi đối nghĩa từ một phần của cấu trúc biểu hiện FGF21

<400> 18
aaaacaaatt gaaattcttc ctctatatgt atacgtaggt taaggtctaa gaagaggtaa 60
taa 63

<210> 19
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 19
aggaggaata acatatggac aaaactcaca catg 34

<210> 20
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 20
ggatccacca ccaccgctac cac 23

<210> 21
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 21
ggtggtggtg gatcccatcc aattccagat tcttctcca 39

<210> 22
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 22
tagtgagctc gaattcttag gaagcgtagc tgg 33

<210> 23
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 23
atggtggaac cttcccaggg ccgaagc 27

<210> 24
<211> 30
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 24
ggaaggttcc accatgctca gagggtccga 30

<210> 25
<211> 50
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi có nghĩa từ một phần của cấu trúc biểu hiện FGF21

<400> 25
ctcctcggac cctctgagca tggtgggacc ttcccagggc cgaagcccca 50

<210> 26
<211> 30
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 26
agcctgggag actcgtacca ccttggaagg 30

<210> 27
<211> 50
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi đối nghĩa từ một phần của cấu trúc biểu hiện FGF21

<400> 27
gaggagcctg ggagactcgt accaccctgg aagggtcccg gcttcggggt 50

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

<220>

<223> Liên kết G5SG3SG4S (L15)

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Liên kết G4

<400> 29

Gly Gly Gly Gly
1

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Liên kết G5

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 31
<211> 15
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Liên kết (G4S)3

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 32

<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Liên kết G3KG4

<400> 32

Gly Gly Gly Lys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Liên kết G3NGSG2

<400> 33

Gly Gly Gly Asn Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Liên kết G3CG4

<400> 34

Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Liên kết GPNG2

<400> 35

Gly Pro Asn Gly Gly
1 5

<210> 36
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 RG

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 36
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa 48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

gtc cgg cag cgt tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc 96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

cac ctg gag atc agg gag gac ggg acg gtg ggg ggt gct gct gac cag 144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg ggt gtt att 192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

caa atc ttg ggt gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat 240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc 288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

cgt gag cgt ctt ctt gag gac ggt tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc 336
Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgt gac 384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc 432

```
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat      480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg ggt ggt tcc cag ggc cga      528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                         549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 37
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 37

```
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
```

100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 38
<211> 546
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 RGE

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(546)

<400> 38
cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa gtc 48
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

cgg cag cgt tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc cac 96
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

ctg gag atc agg gag gac ggg acg gtg ggg ggt gct gct gac cag agc 144
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg ggt gtt att caa 192
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

```
    50                  55                  60

atc ttg ggt gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat ggg      240
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65                  70                  75                  80

gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc cgt      288
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
                85                  90                  95

gag cgt ctt ctt gag gac ggt tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc cac      336
Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
            100                 105                 110

ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgt gac cct      384
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
        115                 120                 125

gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc ccc      432
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
    130                 135                 140

gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat gtg      480
Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145                 150                 155                 160

ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg ggt ggt tcc cag ggc cga agc      528
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln Gly Arg Ser
                165                 170                 175

ccc agc tac gaa tcc taa                                             546
Pro Ser Tyr Glu Ser
            180
```

<210> 39
<211> 181
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 39

```
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1               5                   10                  15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
            20                  25                  30
```

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

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

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln Gly Arg Ser
165 170 175

Pro Ser Tyr Glu Ser
180

<210> 40
<211> 1272
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> WT21-L15-Fc

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1272)

<400> 40

```
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa        48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                  10                  15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc        96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag       144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att       192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat       240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc       288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc       336
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac       384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg cca       432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat       480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga       528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc       576
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
```

```
          180                 185                 190

ggt ggt ggt gga tcc gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca      624
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
        195                 200                 205

cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc      672
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
    210                 215                 220

aag gac acc ctc atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg      720
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
225                 230                 235                 240

gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg      768
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
                245                 250                 255

gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag      816
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
            260                 265                 270

tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag      864
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
        275                 280                 285

gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc      912
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
    290                 295                 300

ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc      960
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
305                 310                 315                 320

cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc     1008
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
                325                 330                 335

aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc     1056
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
            340                 345                 350

gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac     1104
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
        355                 360                 365

aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat     1152
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
    370                 375                 380

agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc     1200
```

```
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
385                 390                 395                 400

tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag      1248
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
                405                 410                 415

agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa                                      1272
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            420
```

<210> 41
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 41

```
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
```

115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
180 185 190

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
195 200 205

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
210 215 220

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
225 230 235 240

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
245 250 255

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
260 265 270

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
275 280 285

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
290 295 300

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
305 310 315 320

```
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
                325                 330                 335

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
            340                 345                 350

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
        355                 360                 365

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
    370                 375                 380

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
385                 390                 395                 400

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
                405                 410                 415

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            420
```

<210> 42
<211> 1275
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Fc L15 RG

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 42

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
```

```
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag      192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg      240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat      288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc      336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag      384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc      432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240
```

```
ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag cgt ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac     1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc     1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc     1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga ggt tcc cag     1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 43
<211> 424

<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 43

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

```
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 44
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-(G4S)3-RG

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 44

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95
```

```
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc      336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
          100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag      384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc      432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt ggt ggt ggt tcc ggt ggc ggc ggc tct ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt ggc agc cat ccg atc ccg gac tct tct ccg ctg ctg cag ttc ggt      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggt cag gtt cgt cag cgt tac ctg tac acc gac gac gcg cag cag acc      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gag gcg cac ctg gag atc cgt gaa gac ggt acc gtt ggt ggt gcg gcc      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag tct ccg gaa tct ctg ctg cag ctg aaa gcc ctg aaa ccg ggt      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
```

```
    290                 295                 300

gtt atc cag atc ctg ggc gtt aaa acc tct cgt ttc ctg tgc cag cgt        960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

ccg gac ggc gcc ctg tac ggt tct ctg cac ttc gac ccg gag gcg tgc       1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

tct ttt cgt gaa cgt ctg ctc gaa gac ggt tac aac gtt tac cag tct       1056
Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gag gcg cac ggt ctg ccg ctg cac ctg ccg ggt aac aaa tct ccg cac       1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgt gac ccg gcg cca cgt ggt cct gcg cgt ttc ctg cca ctg ccg ggc       1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccg cct gcg cct cct gaa ccg cct ggt atc ctg gct ccg cag ccg       1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

cca gac gtt ggt tct tct gac ccg ctg tct atg gtt ggt ggc tct cag       1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

ggt cgt tct ccg tct tac gcc tct taa                                  1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 45
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 45

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30
```

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 46
<211> 1275
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Fc-(G4S)3-RGE

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 46

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc         432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg         480
```

```
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt ggt tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgt tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gac ggg acg gtg ggg ggt gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg ggt      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg ggt gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgt gag cgt ctt ctt gag gac ggt tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350
```

```
gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac      1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgt gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc      1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc      1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg ggt ggt tcc cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gaa tcc taa                                 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Glu Ser
            420
```

<210> 47
<211> 424
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 47

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80
```

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Glu Ser
420

<210> 48
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-WT21

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 48

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc         432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg         480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct         528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc         576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg         624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205
```

```
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg          672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt          720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg          768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca          816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct          864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga          912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg          960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc         1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc         1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac         1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc         1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc         1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag         1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln
```

405 410 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 49
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 49

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser

340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 50
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-G170E

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 50
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg 48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc 96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc 144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag 192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

```
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg          240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat          288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc          336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag          384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc          432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg          480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct          528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc          576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg          624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg          672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt          720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg          768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca          816
```

```
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct        864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga        912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg        960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc       1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc       1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac       1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc       1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc       1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gaa cct tcc cag       1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                  1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 51
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 51

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

```
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln
                405                 410                 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 52
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-P171A

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 52

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110
```

```
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag        384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc        432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg        480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct        528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc        576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg        624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg        672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt        720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg        768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca        816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct        864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga        912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg        960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320
```

```
cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc      1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc      1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac      1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc      1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc      1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga gct tcc cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Ala Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 53
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 53

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45
```

```
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255
```

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Ala Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 54
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-S172L

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 54

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc         432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg         480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct         528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
```

```
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac     1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc     1152
```

```
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc      1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct ctg cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Leu Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                  1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 55
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 55

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
```

100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Leu Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 56
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-RGE

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 56
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg 48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc 96

```
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc        144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag        192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg        240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat        288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc        336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag        384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc        432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg        480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct        528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc        576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg        624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg        672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220
```

```
tct ccg ggt aaa ggt ggt ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt ggt tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgt tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gac ggg acg gtg ggg ggt gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg ggt      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg ggt gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgt gag cgt ctt ctt gag gac ggt tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac     1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgt gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc     1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc     1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg ggt ggt tcc cag     1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gaa tcc taa                                1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Glu Ser
            420
```

<210> 57
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 57

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

```
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365
```

```
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Glu Ser
            420
```

<210> 58
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-G170E P171A S172L

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 58

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80
```

```
tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat      288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc      336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag      384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc      432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
```

```
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga        912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg        960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc       1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc       1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac       1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc       1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc       1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gaa gct ctg cag       1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Ala Leu Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                  1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 59
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 59

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15
```

```
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
          20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

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

210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Ala Leu Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 60
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-G151A

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 60
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg 48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc 96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc 144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag 192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg 240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat 288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc 336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag 384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc 432

```
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335
```

```
agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc      1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac      1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc      1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gca atc ctg gcc ccc cag ccc      1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Ala Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 61
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 61

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60
```

```
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270
```

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Ala Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 62
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-G170E P171A

<220>

<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 62

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc         432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg         480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct         528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc         576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190
```

```
gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg          624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg          672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt          720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg          768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca          816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct          864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga          912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg          960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc         1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc         1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac         1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc         1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc         1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
```

385 390 395 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gaa gct tcc cag 1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Ala Ser Gln
405 410 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 63
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 63

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

```
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
```

325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Ala Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 64
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-P150A G151A I152V

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 64
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg 48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc 96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc 144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

```
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag        192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg        240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat        288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc        336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag        384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc        432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg        480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct        528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc        576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg        624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg        672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt        720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg        768
```

```
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac     1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc     1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca gcc gca gtt ctg gcc ccc cag ccc     1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Ala Ala Val Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag     1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 65
<211> 424
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 65

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

```
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Ala Ala Val Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln
                405                 410                 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 66
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-G170E S172L

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 66

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95
```

```
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc          336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag          384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc          432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg          480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct          528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc          576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg          624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg          672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt          720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg          768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca          816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct          864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga          912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300
```

```
gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg        960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc       1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc       1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac       1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc       1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc       1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gaa cct ctg cag       1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                  1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 67
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 67

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30
```

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 68

<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-G170A

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 68

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc         432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg         480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
```

```
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac     1104
```

```
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc      1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc      1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gct cct tcc cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Ala Pro Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 69
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 69

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
```

85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Ala Pro Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 70
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-G170C

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 70
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg 48

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc      96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc     144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag     192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg     240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat     288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc     336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag     384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc     432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg     480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct     528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc     576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg     624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205
```

```
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg          672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt          720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg          768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca          816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct          864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga          912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg          960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc         1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc         1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac         1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc         1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc         1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg tgc cct tcc cag         1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Cys Pro Ser Gln
                405                 410                 415
```

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 71
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 71

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

```
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Cys Pro Ser Gln
                405                 410                 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 72
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-G170D

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 72

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60
```

```
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg        240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat        288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc        336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag        384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc        432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg        480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct        528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc        576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg        624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg        672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt        720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg        768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca        816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
```

```
          260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct        864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga        912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg        960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc       1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc       1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac       1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc       1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc       1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gac cct tcc cag       1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asp Pro Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                  1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 73
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 73

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

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

195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

```
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asp Pro Ser Gln
                405                 410                 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 74
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-G170N

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 74

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
```

```
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc          432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg          480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct          528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc          576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg          624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg          672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt          720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg          768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca          816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct          864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga          912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg          960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320
```

```
cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc      1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc      1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac      1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc      1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc      1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg aac cct tcc cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 75
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 75

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45
```

```
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255
```

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 76
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Fc-L15-G170S

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 76

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc         432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg         480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct         528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175
```

```
ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc        576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg        624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg        672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt        720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg        768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca        816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct        864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga        912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg        960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc       1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc       1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac       1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc       1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
```

```
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc      1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg tcc cct tcc cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Ser Pro Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 77
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 77

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110
```

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg

305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Ser Pro Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 78
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-P171E

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 78
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg 48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc 96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

```
          20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc        144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag        192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg        240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat        288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc        336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag        384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc        432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg        480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct        528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc        576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg        624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg        672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt        720
```

```
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac     1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc     1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc     1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga gaa tcc cag     1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Glu Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 79
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 79

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

```
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Glu Ser Gln
                405                 410                 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 80
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-P171H

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 80

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80
```

```
tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat      288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc      336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag      384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc      432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285
```

```
gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga          912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg          960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc         1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc         1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac         1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc         1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc         1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cac tcc cag         1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly His Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                    1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 81
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 81

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15
```

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

```
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly His Ser Gln
                405                 410                 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
```

420

<210> 82
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-P171Q

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 82

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc         432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
```

```
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg        480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct        528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc        576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg        624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg        672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt        720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg        768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca        816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct        864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga        912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg        960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc       1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc       1056
```

```
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac      1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc      1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc      1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cag tcc cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gln Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420


<210>  83
<211>  424
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  Cấu trúc tổng hợp

<400>  83

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15


Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30


Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45


His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60


Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
```

65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gln Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 84
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-P171T

<220>
<221> CDS

<222> (1)..(1275)

<400> 84

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc         432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg         480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct         528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc         576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190
```

```
gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac     1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc     1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc     1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400
```

```
ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga act tcc cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Thr Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                  1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 85
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 85

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125
```

```
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335
```

```
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Thr Ser Gln
                405                 410                 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 86
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-P171Y

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 86

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45
```

```
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag        192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg        240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat        288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc        336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag        384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc        432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg        480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct        528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc        576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg        624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg        672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt        720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg        768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
```

```
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac     1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc     1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc     1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga tac tcc cag     1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Tyr Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 87
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 87

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

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

180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Tyr Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 88
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-P171G

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 88
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg 48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc 96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc 144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag 192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg 240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat 288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc 336

```
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag      384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc      432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300
```

```
gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg          960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc         1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc         1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac         1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc         1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc         1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga ggt tcc cag         1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                    1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 89
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 89

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30
```

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 90
<211> 1275

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-P171S

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 90

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc         432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg         480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160
```

```
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct          528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc          576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg          624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg          672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt          720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg          768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca          816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct          864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga          912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg          960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc         1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc         1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac         1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
```

```
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc      1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc      1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga tct tcc cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Ser Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 91
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 91

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95
```

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly

290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Ser Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 92
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-P171W

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 92
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg 48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

```
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc      96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc     144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag     192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg     240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat     288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc     336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag     384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc     432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg     480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct     528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc     576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg     624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg     672
```

```
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac     1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc     1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc     1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga tgg tcc cag     1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Trp Ser Gln
                405                 410                 415
```

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 93
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 93

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

```
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Trp Ser Gln
                405                 410                 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 94
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-P171C

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 94

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60
```

```
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg      240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat      288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc      336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag      384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc      432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270
```

```
gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct          864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga          912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg          960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc         1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc         1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac         1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc         1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc         1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga tgc tcc cag         1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Cys Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                    1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 95
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 95

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205
```

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Cys Ser Gln

405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 96
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-A45K G170E

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 96
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg 48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc 96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc 144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag 192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg 240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat 288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc 336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag 384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

```
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc          432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg          480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct          528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc          576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg          624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg          672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt          720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg          768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca          816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct aaa          864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Lys
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga          912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg          960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc         1008
```

```
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc      1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac      1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc      1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc      1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gaa cct tcc cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 97
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 97

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
```

50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Lys
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 98
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 A45K

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 98

```
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa      48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                  10                  15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc      96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct aaa gac cag     144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Lys Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att     192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat     240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc     288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc     336
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac     384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc     432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat     480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga     528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175
```

agc ccc agc tac gct tcc taa 549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 99
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 99

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Lys Asp Gln
35 40 45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

```
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 100
<211> 1260
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-FGF21 6-181 G170E

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1260)

<400> 100

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
```

```
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag      384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc      432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc tct tct cca tta tta caa ttc ggt ggt caa gtc cgg cag      768
Gly Gly Ser Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln
                245                 250                 255

cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc cac ctg gag      816
Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu
            260                 265                 270

atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag agc ccc gaa      864
Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu
        275                 280                 285

agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att caa atc ttg      912
Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu
    290                 295                 300
```

```
gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat ggg gcc ctg        960
Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu
305                 310                 315                 320

tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc cgg gag ctg       1008
Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu
                325                 330                 335

ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc cac ggc ctc       1056
Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu
            340                 345                 350

ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac cct gca ccc       1104
Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro
        355                 360                 365

cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc ccc gca ccc       1152
Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro
    370                 375                 380

ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat gtg ggc tcc       1200
Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
385                 390                 395                 400

tcg gac cct ctg agc atg gtg gaa cct tcc cag ggc cga agc ccc agc       1248
Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser
                405                 410                 415

tac gct tcc taa                                                      1260
Tyr Ala Ser
```

<210> 101
<211> 419
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 101

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30
```

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln
245 250 255

Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu
260 265 270

Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu
275 280 285

Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu
290 295 300

Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu
305 310 315 320

Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu
325 330 335

Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu
340 345 350

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro
355 360 365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro
370 375 380

Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
385 390 395 400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser
405 410 415

Tyr Ala Ser

<210> 102
<211> 1275

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-A45K P171G

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 102

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc         432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg         480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160
```

```
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct aaa      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Lys
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac     1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
```

```
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc      1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc      1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga ggt tcc cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa                                 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            420
```

<210> 103
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 103

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95
```

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Lys
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly

290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 104
<211> 1320
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21-(G3)-Fc; trình tự tín hiệu 28 AA được loại bỏ trong quy trình

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1320)

<400> 104
atg gac tcg gac gag acc ggg ttc gag cac tca gga ctg tgg gtt tct 48
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser

```
1               5                  10                  15

gtg ctg gct ggt ctt ctg ctg gga gcc tgc cag gca cac ccc atc cct      96
Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
            20                  25                  30

gac tcc agt cct ctc ctg caa ttc ggg ggc caa gtc cgg cag cgg tac     144
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
        35                  40                  45

ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc cac ctg gag atc agg     192
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
    50                  55                  60

gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag agc ccc gaa agt ctc     240
Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65                  70                  75                  80

ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att caa atc ttg gga gtc     288
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
                85                  90                  95

aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat ggg gcc ctg tat gga     336
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
            100                 105                 110

tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc cgg gag ctg ctt ctt     384
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
        115                 120                 125

gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg     432
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
    130                 135                 140

cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac cct gca ccc cga gga     480
His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145                 150                 155                 160

cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg cca ccc gca ccc ccg gag     528
Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
                165                 170                 175

cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat gtg ggc tcc tcg gac     576
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
            180                 185                 190

cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga agc ccc agc tac gct     624
Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
        195                 200                 205

tcc ggt gga ggt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct     672
```

```
Ser Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
    210                 215                 220

gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag      720
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225                 230                 235                 240

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg      768
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
                245                 250                 255

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac      816
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
            260                 265                 270

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac      864
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
        275                 280                 285

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac      912
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
    290                 295                 300

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc      960
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305                 310                 315                 320

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga     1008
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
                325                 330                 335

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag     1056
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
            340                 345                 350

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac     1104
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
        355                 360                 365

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag     1152
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
    370                 375                 380

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc     1200
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385                 390                 395                 400

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca     1248
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
                405                 410                 415
```

```
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc      1296
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
            420                 425                 430

ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga                                     1320
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435
```

<210> 105
<211> 439
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 105

```
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1               5                   10                  15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
            20                  25                  30

Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
        35                  40                  45

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
    50                  55                  60

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65                  70                  75                  80

Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
                85                  90                  95

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
            100                 105                 110

Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
        115                 120                 125
```

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
130 135 140

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145 150 155 160

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
165 170 175

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
180 185 190

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
195 200 205

Ser Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
210 215 220

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 106
<211> 1245
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-G5-FGF21

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1245)

<400> 106
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg 48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc 96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

```
atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc      144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
       35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag      192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg      240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat      288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc      336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag      384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc      432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt ggc gga ggg ggt cat cca att cca gat tct tct      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly His Pro Ile Pro Asp Ser Ser
225                 230                 235                 240
```

```
cca tta tta caa ttc ggg ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca      768
Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr
                245                 250                 255

gat gat gcc cag cag aca gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg      816
Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly
            260                 265                 270

acg gtg ggg ggc gct gct gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg      864
Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu
        275                 280                 285

aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc      912
Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser
    290                 295                 300

agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac      960
Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His
305                 310                 315                 320

ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga     1008
Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly
                325                 330                 335

tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca     1056
Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro
            340                 345                 350

ggg aac aag tcc cca cac cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc     1104
Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg
        355                 360                 365

ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga     1152
Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly
    370                 375                 380

atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc     1200
Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser
385                 390                 395                 400

atg gtg gga cct tcc cag ggc cga agc ccc agc tac gct tcc taa         1245
Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
                405                 410
```

<210> 107
<211> 414
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 107

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly His Pro Ile Pro Asp Ser Ser
225 230 235 240

Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr
245 250 255

Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly
260 265 270

Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu
275 280 285

Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser
290 295 300

Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His
305 310 315 320

Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly
325 330 335

Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro
340 345 350

Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg
355 360 365

Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly
370 375 380

Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser

385 390 395 400

Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
405 410

<210> 108
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 L99R

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 108
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa 48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc 96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag 144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att 192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat 240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc 288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

cgg gag ctg cgt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc 336
Arg Glu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac 384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp

```
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc        432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat        480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga        528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                           549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 109
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 109

```
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95
```

```
Arg Glu Leu Arg Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 110
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 L99D

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 110

```
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa      48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc      96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag     144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45
```

```
agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att      192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat      240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc      288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag ctg gac ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc      336
Arg Glu Leu Asp Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac      384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc      432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat      480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga      528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                         549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 111
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 111

```
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15
```

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Asp Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 112
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FGF21 A111T

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 112

```
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa          48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                  10                  15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc          96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag         144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att         192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat         240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc         288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa acc         336
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Thr
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac         384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc         432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat         480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga         528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175
```

agc ccc agc tac gct tcc taa 549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 113
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 113

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Thr
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

```
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 114
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 A129D

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 114

```
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa          48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc          96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag         144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att         192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat         240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc         288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95
```

```
cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc      336
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
          100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac      384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gac ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc      432
Pro Asp Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat      480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga      528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                         549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 115
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 115

```
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60
```

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Asp Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 116
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 A129Q

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 116
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa 48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc 96

```
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag      144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att      192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat      240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc      288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc      336
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac      384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct cag ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc      432
Pro Gln Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat      480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga      528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                         549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 117
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 117

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Gln Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 118
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 A134K

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 118

```
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa        48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                  10                  15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc        96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag       144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att       192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat       240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc       288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc       336
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac       384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca aaa cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc       432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Lys Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat       480
```

```
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga      528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                          549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180


<210>  119
<211>  182
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  Cấu trúc tổng hợp

<400>  119

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
```

```
        115                 120                 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Lys Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 120
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 A134Y

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 120

```
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa          48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc          96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag         144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att         192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat         240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
```

```
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc        288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc        336
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac        384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca tat cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc        432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Tyr Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat        480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga        528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                           549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 121
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 121

```
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45
```

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Tyr Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 122
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 A134E

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 122

```
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa      48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                  10                  15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc      96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag     144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att     192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat     240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc     288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc     336
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac     384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca gaa cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc     432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Glu Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat     480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga     528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                        549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 123

<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 123

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Glu Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 124
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 A129K

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 124

```
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa          48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                  10                  15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc          96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag         144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att         192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat         240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc         288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc         336
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac         384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125
```

```
cct aaa ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc      432
Pro Lys Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat      480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga      528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                         549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 125
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 125

```
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95
```

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Lys Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 126
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 P78C

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 126
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa 48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc 96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag 144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

```
agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att        192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg tgc gat        240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Cys Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc        288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc        336
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac        384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc        432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat        480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga        528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                           549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 127
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 127

```
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15
```

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Cys Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 128
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 P78R

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 128

```
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa          48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                  10                  15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc          96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag         144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att         192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cgt gat         240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Arg Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc         288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc         336
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac         384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc         432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat         480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga         528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175
```

agc ccc agc tac gct tcc taa 549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 129
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 129

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Arg Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

```
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 130
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 L86T

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 130

```
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa          48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc          96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag         144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att         192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat         240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg acc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc         288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Thr His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc         336
```

```
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac      384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc      432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat      480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga      528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                         549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 131
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 131

```
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
```

65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Thr His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 132
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 L86C

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 132
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa 48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc 96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala

```
                20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag        144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att        192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat        240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg tgc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc        288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Cys His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc        336
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac        384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc        432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat        480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga        528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                           549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 133
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 133

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Cys His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 134

<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 L98C

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 134

```
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa        48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                  10                  15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc        96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag       144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att       192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat       240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc       288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag tgc ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc       336
Arg Glu Cys Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac       384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc       432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat       480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
```

145 150 155 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga 528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

agc ccc agc tac gct tcc taa 549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 135
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 135

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Cys Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

```
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 136
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 L98R

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 136

```
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa      48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc      96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag     144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att     192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat     240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80
```

```
ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc        288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag cgt ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc        336
Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac        384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc        432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat        480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga        528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                           549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 137
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 137

```
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45
```

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 138
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 L52T

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 138

```
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa          48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                  10                  15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc          96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag         144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

agc ccc gaa agt acc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att         192
Ser Pro Glu Ser Thr Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
    50                  55                  60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat         240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc         288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95

cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc         336
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac         384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc         432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat         480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga         528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                            549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 139
<211> 182

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 139

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Thr Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 140
<211> 549
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 L58E

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(549)

<400> 140
atg cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg ggc caa 48
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc 96
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag 144
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc gaa aag ccg gga gtt att 192
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Glu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat 240
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc 288
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc 336
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac 384
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

```
cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg ccc      432
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat      480
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga      528
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

agc ccc agc tac gct tcc taa                                         549
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 141
<211> 182
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 141

```
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1               5                   10                  15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
            20                  25                  30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
        35                  40                  45

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

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65                  70                  75                  80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
                85                  90                  95
```

```
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
            100                 105                 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
        115                 120                 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
    130                 135                 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145                 150                 155                 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
                165                 170                 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
            180
```

<210> 142
<211> 1278
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-L98R P171G 182P

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1278)

<400> 142

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
```

```
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg      240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat      288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc      336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag      384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc      432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255
```

```
ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca        816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct        864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga        912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg        960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc       1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag cgt ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc       1056
Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac       1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc       1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc       1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga ggt tcc cag       1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc ccg taa                              1278
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Pro
            420                 425
```

<210> 143
<211> 425
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 143

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

```
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400
```

```
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Pro
            420                 425
```

<210> 144
<211> 1278
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-L98R P171G 182G

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1278)

<400> 144

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110
```

```
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag      384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc      432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
```

```
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc      1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag cgt ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc      1056
Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac      1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc      1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc      1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga ggt tcc cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc ggc taa                             1278
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Gly
            420                 425
```

<210> 145
<211> 425
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 145

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45
```

```
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
```

245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Gly
420 425

<210> 146
<211> 1281
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-L98R P171G 182G 183G

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1281)

<400> 146

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc         432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg         480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct         528
```

```
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag cgt ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac     1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365
```

```
cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc      1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc      1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga ggt tcc cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac gct tcc ggt ggc taa                         1281
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Gly
            420                 425
```

<210> 147
<211> 426
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 147

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95
```

```
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300
```

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Gly
420 425

<210> 148
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-L98R P171G Y179S

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 148
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg 48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

```
ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc         432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg         480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct         528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc         576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg         624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg         672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220
```

```
tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt        720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg        768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca        816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct        864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga        912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg        960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc       1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag cgt ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc       1056
Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac       1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc       1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc       1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga ggt tcc cag       1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tcc gct tcc taa                                  1275
Gly Arg Ser Pro Ser Ser Ala Ser
```

420

<210> 149
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 149

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

```
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
```

```
        355                 360                 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

Gly Arg Ser Pro Ser Ser Ala Ser
            420
```

<210> 150
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-L98R P171G Y179F

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 150

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
```

```
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat      288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc      336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag      384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc      432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
```

```
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag cgt ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac     1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc     1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc     1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga ggt tcc cag     1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc ttc gct tcc taa                                1275
Gly Arg Ser Pro Ser Phe Ala Ser
            420
```

<210> 151
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 151

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
```

```
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205
```

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
405 410 415

```
Gly Arg Ser Pro Ser Phe Ala Ser
            420
```

<210> 152
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-L98R P171G Y179A

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 152

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125
```

```
gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc      432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335
```

```
agc ttc cgg gag cgt ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc      1056
Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac      1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc      1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc      1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga ggt tcc cag      1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc gct gct tcc taa                                 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Ala Ala Ser
            420
```

<210> 153
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 153

```
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                   10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60
```

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Ala Ala Ser
420

<210> 154
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-L98R P171G A180S

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 154

```
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg          48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc          96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc         144
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag         192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg         240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat         288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc         336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag         384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc         432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg         480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct         528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc         576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
```

```
                180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt      720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

agc ttc cgg gag cgt ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac     1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc     1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc     1200
```

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga ggt tcc cag 1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
405 410 415

ggc cga agc ccc agc tac tcc tcc taa 1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ser Ser
420

<210> 155
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 155

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

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

115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ser Ser
420

<210> 156
<211> 1275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-L15-L98R P171G A180G

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1275)

<400> 156
atg gac aaa act cac aca tgt cca cct tgt cca gct ccg gaa ctc ctg 48
Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc 96
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

atg atc tcc cgt acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc 144

```
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag        192
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgt gag gag cag tac aac agc acg        240
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat        288
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc        336
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag        384
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgt gat gag ctg acc aag aac cag gtc        432
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg        480
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct        528
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc        576
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

gtg gac aag agc cgt tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg        624
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg        672
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

tct ccg ggt aaa ggt gga ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt agc ggt ggt        720
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240
```

```
ggt gga tcc cat cca att cca gat tct tct cca tta tta caa ttc ggg      768
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
               245                 250                 255

ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca      816
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
           260                 265                 270

gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct      864
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
       275                 280                 285

gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga      912
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
   290                 295                 300

gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg      960
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc     1008
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
               325                 330                 335

agc ttc cgg gag cgt ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc     1056
Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
           340                 345                 350

gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac     1104
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
       355                 360                 365

cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc     1152
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
   370                 375                 380

ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc     1200
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga ggt tcc cag     1248
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
               405                 410                 415

ggc cga agc ccc agc tac ggt tcc taa                                1275
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Gly Ser
           420
```

<210> 157
<211> 424

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 157

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

```
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
                245                 250                 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
            260                 265                 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
        275                 280                 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
    290                 295                 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305                 310                 315                 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
                325                 330                 335

Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
            340                 345                 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
        355                 360                 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
    370                 375                 380
```

```
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385                 390                 395                 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
                405                 410                 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Gly Ser
            420
```

<210> 158
<211> 1287
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MKEDD-FGF21-(L15)-Fc

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1287)

<400> 158

```
atg aaa gaa gat gat cac cca att cca gat tct tct cca tta tta caa          48
Met Lys Glu Asp Asp His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln
1               5                   10                  15

ttc ggg ggc caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag          96
Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln
            20                  25                  30

cag aca gaa gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc         144
Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly
        35                  40                  45

gct gct gac cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag         192
Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys
    50                  55                  60

ccg gga gtt att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc         240
Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys
65                  70                  75                  80

cag cgg cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag         288
Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu
                85                  90                  95
```

```
gcc tgc agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac        336
Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr
            100                 105                 110

cag tcc gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc        384
Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser
        115                 120                 125

cca cac cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta        432
Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu
    130                 135                 140

cca ggc ctg cca ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc        480
Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro
145                 150                 155                 160

cag ccc ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc atg gtg gga cct        528
Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro
                165                 170                 175

tcc cag ggc cga agc ccc agc tac gct tcc ggt gga ggt ggt ggt tct        576
Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser
            180                 185                 190

ggt ggt ggt agc ggt ggt ggt gga tcc gac aaa act cac aca tgc cca        624
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
        195                 200                 205

ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc        672
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
    210                 215                 220

ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgt acc cct gag gtc        720
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
225                 230                 235                 240

aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc        768
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
                245                 250                 255

aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg        816
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
            260                 265                 270

cgt gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc        864
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
        275                 280                 285

gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc        912
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
```

```
    290                 295                 300

tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc        960
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
305                 310                 315                 320

aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg       1008
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
                325                 330                 335

gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc       1056
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
            340                 345                 350

ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg       1104
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
        355                 360                 365

gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc       1152
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
    370                 375                 380

ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag       1200
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
385                 390                 395                 400

ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac       1248
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
                405                 410                 415

tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa                  1287
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            420                 425


<210>  159
<211>  428
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  Cấu trúc tổng hợp

<400>  159

Met Lys Glu Asp Asp His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln
1               5                   10                  15


Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln
            20                  25                  30
```

Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly
35 40 45

Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys
50 55 60

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

Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu
85 90 95

Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr
100 105 110

Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser
115 120 125

Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu
130 135 140

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro
145 150 155 160

Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro
165 170 175

Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser
180 185 190

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
195 200 205

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
245 250 255

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
260 265 270

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
275 280 285

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
290 295 300

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
305 310 315 320

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
325 330 335

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
340 345 350

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
355 360 365

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
370 375 380

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
385 390 395 400

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
405 410 415

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
420 425

<210> 160
<211> 630
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 Y179N S181T, trình tự tín hiệu 28AA được loại bỏ trong quá trình

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(630)

<400> 160

```
atg gac tcg gac gag acc ggg ttc gag cac tca gga ctg tgg gtt tct        48
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1               5                  10                  15

gtg ctg gct ggt ctt ctg ctg gga gcc tgc cag gca cac ccc atc cct        96
Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
            20                  25                  30

gac tcc agt cct ctc ctg caa ttc ggg ggc caa gtc cgg cag cgg tac       144
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
        35                  40                  45

ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc cac ctg gag atc agg       192
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
    50                  55                  60

gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag agc ccc gaa agt ctc       240
Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65                  70                  75                  80

ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att caa atc ttg gga gtc       288
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
                85                  90                  95

aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat ggg gcc ctg tat gga       336
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
            100                 105                 110

tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc cgg gag ctg ctt ctt       384
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
        115                 120                 125

gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg       432
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
    130                 135                 140

cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac cct gca ccc cga gga       480
```

```
His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145                 150                 155                 160

cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg cca ccc gca ccc ccg gag      528
Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
                165                 170                 175

cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat gtg ggc tcc tcg gac      576
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
            180                 185                 190

cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga agc ccc agc aac gct      624
Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Asn Ala
        195                 200                 205

acc tga                                                              630
Thr
```

<210> 161
<211> 209
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 161

```
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1               5                   10                  15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
            20                  25                  30

Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
        35                  40                  45

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
    50                  55                  60

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65                  70                  75                  80

Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
```

85 90 95

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
100 105 110

Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
115 120 125

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
130 135 140

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145 150 155 160

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
165 170 175

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
180 185 190

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Asn Ala
195 200 205

Thr

<210> 162
<211> 630
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 Y179N, trình tự tín hiệu 28 AA được loại bỏ trong quá trình

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(630)

<400> 162
atg gac tcg gac gag acc ggg ttc gag cac tca gga ctg tgg gtt tct 48
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser

```
1               5                  10                  15

gtg ctg gct ggt ctt ctg ctg gga gcc tgc cag gca cac ccc atc cct      96
Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
            20                  25                  30

gac tcc agt cct ctc ctg caa ttc ggg ggc caa gtc cgg cag cgg tac     144
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
        35                  40                  45

ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc cac ctg gag atc agg     192
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
    50                  55                  60

gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag agc ccc gaa agt ctc     240
Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65                  70                  75                  80

ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att caa atc ttg gga gtc     288
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
                85                  90                  95

aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat ggg gcc ctg tat gga     336
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
            100                 105                 110

tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc cgg gag ctg ctt ctt     384
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
        115                 120                 125

gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg     432
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
    130                 135                 140

cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg gac cct gca ccc cga gga     480
His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145                 150                 155                 160

cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg cca ccc gca ccc ccg gag     528
Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
                165                 170                 175

cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat gtg ggc tcc tcg gac     576
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
            180                 185                 190

cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga agc ccc agc aac gct     624
Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Asn Ala
        195                 200                 205

tcc tga                                                             630
```

Ser

<210> 163
<211> 209
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 163

Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
20 25 30

Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
35 40 45

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
50 55 60

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65 70 75 80

Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
85 90 95

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
100 105 110

Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
115 120 125

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
130 135 140

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly

```
145                 150                 155                 160

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
                165                 170                 175

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
            180                 185                 190

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Asn Ala
        195                 200                 205

Ser
```

<210> 164
<211> 630
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FGF21 P124S, trình tự tín hiệu 28 AA được loại bỏ trong quá trình

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(630)

<400> 164

```
atg gac tcg gac gag acc ggg ttc gag cac tca gga ctg tgg gtt tct        48
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1               5                   10                  15

gtg ctg gct ggt ctt ctg ctg gga gcc tgc cag gca cac ccc atc cct        96
Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
            20                  25                  30

gac tcc agt cct ctc ctg caa ttc ggg ggc caa gtc cgg cag cgg tac       144
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
        35                  40                  45

ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc cac ctg gag atc agg       192
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
    50                  55                  60

gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag agc ccc gaa agt ctc       240
Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
```

```
65                  70                  75                  80

ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt att caa atc ttg gga gtc        288
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
                85                  90                  95

aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca gat ggg gcc ctg tat gga        336
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
            100                 105                 110

tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc ttc cgg gag ctg ctt ctt        384
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
        115                 120                 125

gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg        432
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
    130                 135                 140

cac ctg cca ggg aac aag tcc tca cac cgg gac cct gca ccc cga gga        480
His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Ser His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145                 150                 155                 160

cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg cca ccc gca ccc ccg gag        528
Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
                165                 170                 175

cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc gat gtg ggc tcc tcg gac        576
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
            180                 185                 190

cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc cga agc ccc agc tac gct        624
Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
        195                 200                 205

tcc tga                                                               630
Ser
```

<210> 165
<211> 209
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 165

```
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1               5                   10                  15
```

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
20 25 30

Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
35 40 45

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
50 55 60

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65 70 75 80

Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
85 90 95

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
100 105 110

Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
115 120 125

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
130 135 140

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Ser His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145 150 155 160

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
165 170 175

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
180 185 190

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
195 200 205

Ser