(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) **1-0030512**

(51)[7] **C07K 14/435**

(13) **B**

(21) 1-2015-01264 (22) 12/09/2013

(86) PCT/US2013/059458 12/09/2013 (87) WO2014/043344 20/03/2014

(30) 61/700,697 13/09/2012 US; 61/780,005 13/03/2013 US

(45) 25/12/2021 405 (43) 25/09/2015 330A

(73) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (US)
Route 206 & Province Line Rd., Princeton, NJ 08543, United States of America

(72) CLOAD, Sharon (US); ENGLE, Linda (US); LIPOVSEK, Dasa (US); MADIREDDI, Malavi (IN); RAKESTRAW, Ginger, Chao (US); SWAIN, Joanna (US); ZHAO, Wenjun (US); WEI, Hui (US); YAMNIUK, Aaron, P. (CA); RAMAMURTHY, Vidhyashankar (IN); KOZHICH, Alexander, T. (US); CORBETT, Martin, J. (US); KRYSTEK, Stanley, Richard, Jr. (US).

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

(54) POLYPEPTIT CHỨA MIỀN FIBRONECTIN TYP III, DƯỢC PHẨM, AXIT NUCLEIC, TẾ BÀO VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN MYOSTATIN TRONG MẪU

(57) Sáng chế đề đề cập đến polypeptit chứa miền fibronectin typ III thứ mười (^{10}Fn3), trong đó (i) polypeptit này gắn kết với myostatin với hằng số K_D nhỏ hơnn 500nM; và (ii) trình tự axit amin của vòng BC, vòng DE, và vòng FG của miền ^{10}Fn3 này tương ứng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.75, và một vòng trong số các vòng BC, vòng DE, và vòng FG của miền ^{10}Fn3 này tùy ý có một gốc thay thế axit amin so với vòng BC, vòng DE, và vòng FG tương ứng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.39 và SEQ ID N0.75; cũng như dược phẩm chứa polypeptit này; axit nucleic phân lập mã hóa polypeptit này; tế bào chứa axit nucleic này; và phương pháp phát hiện hoặc đo myostatin trong mẫu.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến polypeptit chứa miền fibronectin typ III thứ mười (^{10}Fn3), trong đó (i) polypeptit này gắn kết với myostatin với hằng số K_D nhỏ hơn 500nM; và (ii) trình tự axit amin của vòng BC, vòng DE, và vòng FG của miền ^{10}Fn3 này tương ứng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.75, và một vòng trong số các vòng BC, vòng DE, và vòng FG của miền ^{10}Fn3 này tùy ý có một gốc thay thế axit amin so với vòng BC, vòng DE, và vòng FG tương ứng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.75; cũng như dược phẩm chứa polypeptit này; axit nucleic phân lập mã hóa polypeptit này; tế bào chứa axit nucleic này; và phương pháp phát hiện hoặc đo myostatin trong mẫu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Myostatin, còn được biết là yếu tố sinh trưởng và biệt hóa-8 (growth and differentiation factor-8 - GDF-8), là protein thuộc siêu họ yếu tố sinh trưởng biến đổi-β (transforming growth factor-β - TGF-β) của các yếu tố sinh trưởng được tiết ra trong cơ thể. Myostatin có tất cả các đặc điểm cấu trúc chung với các protein của họ TGF-β: đầu tận amino kỵ nước tác động như tín hiệu tiết, chín gốc xystein bất biến, và vị trí xử lý phân giải protein kiểu furin "RXXR". Quá trình phân cắt phân giải protein này làm xuất hiện miền đầu tận cùng C tạo thành homođime là dạng có hoạt tính sinh học của myostatin (Thies et al., *Growth Factors* 2001;18(4):251-9). Kỹ thuật bắt cặp mảnh đầu tận cùng C của các trình tự axit amin của myostatin từ nhiều loài động vật có xương sống cho thấy rằng protein này được bảo thủ cao (độ tương đồng 100%) giữa người, khỉ, bò, chó, chuột nhắt, chuột cống, gà tây và gà (McPherron, et al. PNAS, 94:12457-61, 1997).

Sự biểu hiện myostatin bị giới hạn chủ yếu ở cơ xương và mô mỡ, trong đó nó được thể hiện là chất điều hòa âm của sự phát triển cơ xương (Lee LS, *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*. 2010;10:183-194). Ở động vật có vú, cơ xương có vẻ là mô đích cơ bản của myostatin, ở đó nó gắn với các thụ thể bề mặt tế bào, dẫn đến mất cơ. Chuột và gia súc bị thiếu hụt myostatin di truyền thể hiện sự tăng mạnh khối lượng cơ xương, tức là kiểu hình "bội cơ" ("double muscling"), do đó chứng minh vai trò của

myostatin trong việc hạn chế sự sinh trưởng cơ (McPherron and Lee, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 23;100(26):15842-6). Chứng phì đại cơ ở giống bò xanh Bỉ (Belgian Blue) và bò Piedmontese là do đột biến sai nghĩa trong exon thứ ba của gen myostatin của bò (Bass et. al., *Domest Anim Endocrinol*. 1999;17(2-3):191-7). Sự biểu hiện chuyển gen quá mức của chất ức chế myostatin cũng dẫn đến tăng nổi cơ bắp. Sự sinh trưởng cơ tăng ở các động vật này là do tăng cả số lượng tế bào, hay sự sinh trưởng tăng sản, và kích thước tế bào, hay sự sinh trưởng phì đại, dẫn đến sợi cơ lớn hơn và nặng hơn. Khối lượng cơ xương tăng do đột biến myostatin cũng được thấy có ở người. Sự ức chế myostatin làm tăng hiệu quả khối lượng và độ bền cơ xương, cả ở giai đoạn sau khi sinh và ở người trưởng thành.

Việc tăng khối lượng và độ bền cơ xương cũng liên quan đến sự thích nghi chuyển hóa ảnh hưởng tích cực đến thành phần cơ thể, mức tiêu tốn năng lượng, nội cân bằng glucoza và nhu cầu insulin. Cả kết quả di truyền và dược lý chỉ ra rằng myostatin điều hòa sự chuyển hóa năng lượng và việc ức chế của nó có thể làm giảm đáng kể tiến triển của các bệnh chuyển hóa, bao gồm bệnh béo phì và bệnh đái tháo đường. Ví dụ, chuột không có myostatin thể hiện sự tích lũy chất béo trong cơ thể giảm (McPherron & Lee, J. JCI 109:595, 2002) so với chuột thể dại cùng độ tuổi. Việc giảm chất béo trong cơ thể này là biểu hiện của giảm số lượng và kích thước tế bào tạo mỡ, ngụ ý vai trò quan trọng của myostatin trong sự tạo mỡ cũng như trong sự tạo cơ.

Do đó, myostatin là đích mong muốn đối với các can thiệp trị liệu hoặc dự phòng để điều trị các rối loạn hoặc tình trạng bệnh có lợi từ việc làm tăng khối lượng cơ, độ bền cơ và/hoặc chuyển hóa (ví dụ, bệnh loạn dưỡng cơ, tình trạng suy nhược, chứng teo do không dùng đến và chứng suy mòn), các rối loạn liên quan đến việc hao mòn cơ (ví dụ, bệnh thận, chứng suy tim hoặc bệnh bệnh, và bệnh gan), và rối loạn chuyển hóa (ví dụ, bệnh đái tháo đường typ II, hội chứng chuyển hóa, bệnh béo phì và bệnh viêm xương khớp).

Do đó, sẽ có lợi khi tạo ra được các protein có miền khung fibronectin cải thiện gắn kết với myostatin để điều trị trị liệu, ví dụ, rối loạn chuyển hóa, các rối loạn hao mòn cơ, và mất cơ do tình trạng kém hoạt động.

Bản chất kĩ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến polypeptit chứa miền fibronectin typ III thứ mười (^{10}Fn3); dược phẩm chứa polypeptit này; axit nucleic phân lập mã hóa polypeptit này; tế bào chứa axit nucleic này; và phương pháp phát hiện hoặc đo myostatin trong mẫu.

Cụ thể là, sáng chế đề cập đến phương án sau:

1. Polypeptit chứa miền fibronectin typ III thứ mười (^{10}Fn3-fibronectin type III tenth domain), trong đó (i) polypeptit này gắn kết với myostatin với hằng số K_D nhỏ hơn 500nM; và (ii) trình tự axit amin của vòng BC, vòng DE, và vòng FG của miền ^{10}Fn3 này tương ứng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.75, và một vòng trong số các vòng BC, vòng DE, và vòng FG của miền ^{10}Fn3 này tùy ý có một gốc thay thế axit amin so với vòng BC, vòng DE, và vòng FG tương ứng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.75.

2. Polypeptit theo phương án 1, trong đó

(i) serin ở vị trí số 3 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, T, V, W, và Y;

(ii) leucin ở vị trí số 4 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm M và V;

(iii) prolin ở vị trí số 5 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, và Y;

(iv) histidin ở vị trí số 6 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y;

(v) glutamin ở vị trí số 7 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, và Y;

(vi) glycin ở vị trí số 8 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin S;

(vii) lysin ở vị trí số 9 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y;

(viii) alanin ở vị trí số 10 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm C, G, L, M, S, và T; hoặc

(ix) asparagin ở vị trí số 11 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit

amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, H, P, Q, R, S, và Y.

3. Polypeptit theo phương án 1, trong đó valin ở vị trí số 5 của vòng DE (SEQ ID NO.39) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, và T.

4. Polypeptit theo phương án 1, trong đó:

(i) valin ở vị trí số 2 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, I, L, M, Q, T, W, và Y;

(ii) threonin ở vị trí số 3 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, và Y;

(iii) axit aspartic ở vị trí số 4 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y;

(iv) threonin ở vị trí số 5 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, và Y;

(v) glycin ở vị trí số 6 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y;

(vi) tyrosin ở vị trí số 7 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, và W;

(vii) leucin ở vị trí số 8 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, E, F, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y;

(viii) lysin ở vị trí số 9 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y;

(ix) tyrosin ở vị trí số 10 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm F hoặc W; hoặc

(x) tyrosin ở vị trí số 11 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, hoặc W.

5. Polypeptit theo phương án 1, trong đó vòng BC, vòng DE, và vòng FG tương

ứng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.75.

6. Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% so với vùng vòng không BC, vùng vòng không DE, và vùng vòng không FG của trình tự SEQ ID NO.331, SEQ ID NO.273, SEQ ID NO.281, hoặc SEQ ID NO.118.

7. Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO.331, SEQ ID NO.273, SEQ ID NO.281, hoặc SEQ ID NO.118.

8. Polypeptit theo phương án 7, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.331

9. Polypeptit theo phương án 7, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.273.

10. Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó polypeptit này gắn kết với vùng nằm trong các axit amin 56-66 của trình tự SEQ ID NO.3.

11. Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó polypeptit này gắn kết với vùng nằm trong các axit amin 85-101 và 56-66 của trình tự SEQ ID NO.3.

12. Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó polypeptit này không cạnh tranh để gắn kết với myostatin với ActRIIB và/hoặc polypeptit này cạnh tranh để gắn kết với myostatin với ALK4 và/hoặc ALK5.

13. Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó polypeptit này còn chứa một hoặc nhiều gốc dược động học được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, axit sialic, vùng Fc, mảnh Fc, transferrin, albumin huyết thanh, protein gắn kết albumin huyết thanh, và protein gắn kết globulin miễn dịch huyết thanh.

14. Dược phẩm chứa polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và chất mang.

15. Axit nucleic phân lập mã hóa polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 13.

16. Tế bào chứa axit nucleic theo phương án 15.

17. Phương pháp phát hiện hoặc đo myostatin trong mẫu, bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc với polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 13, và phát hiện hoặc đo gắn kết của polypeptit này với myostatin.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện cấu trúc sắp thẳng hàng của các trình tự axit amin của adnectin kháng myostatin theo sáng chế. Các trình tự axit amin của vòng BC, vòng DE, và vòng FG được đánh dấu lần lượt bằng cách gạch chân, in nghiêng/gạch chân hoặc in đậm/gạch chân.

Fig.2 là hình vẽ thể hiện kết quả phân tích các gốc biến đổi của vòng BC thuộc họ 1979_B06 của các adnectin kháng myostatin bằng ứng dụng WebLogo. Tần suất của các axit amin ở mỗi vị trí của vòng BC biến đổi trong quá trình dung hợp với protein (PROfusion) được thể hiện. Ảnh này được tạo ra bằng cách sử dụng ứng dụng WebLogo (Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research* 2004;14:1188-1190).

Fig.3 là hình vẽ thể hiện kết quả phân tích các gốc biến đổi của vòng DE thuộc họ 1979_B06 của các adnectin kháng myostatin bằng ứng dụng WebLogo. Tần suất của các axit amin ở mỗi vị trí của vòng DE biến đổi trong quá trình dung hợp với protein được thể hiện.

Fig.4 là hình vẽ thể hiện kết quả phân tích các gốc biến đổi của vòng FG thuộc họ 1979_B06 của các adnectin kháng myostatin bằng ứng dụng WebLogo. Tần suất của các axit amin ở mỗi vị trí của vòng FG biến đổi trong quá trình dung hợp với protein (PROfusion) được thể hiện.

Fig.5 là hình vẽ thể hiện kết quả phân tích các gốc biến đổi của vòng BC thuộc họ 2062_G02 của các adnectin kháng myostatin bằng ứng dụng WebLogo. Tần suất của các axit amin ở mỗi vị trí của vòng BC biến đổi trong quá trình dung hợp với protein (PROfusion) được thể hiện.

Fig.6 là hình vẽ thể hiện kết quả phân tích các gốc biến đổi của vòng DE thuộc họ 2062_G02 của các adnectin kháng myostatin bằng ứng dụng WebLogo. Tần suất của các axit amin ở mỗi vị trí của vòng DE biến đổi trong quá trình dung hợp với protein được thể hiện.

Fig.7 là hình vẽ thể hiện kết quả phân tích các gốc biến đổi của vòng FG thuộc họ 2062_G02 của các adnectin kháng myostatin bằng ứng dụng WebLogo. Tần suất của các axit amin ở mỗi vị trí của vòng FG biến đổi trong quá trình dung hợp với protein (PROfusion) được thể hiện.

Fig.8 là đồ thị thể hiện mối tương quan của dữ liệu sinh hóa và tế bào đối với các protein đột biến alanin riêng biệt của adnectin 3116_A06, cho thấy có sự phù hợp tương đối của chúng trong phương pháp quét đột biến sâu theo vị trí trình tự.

Fig.9 là đồ thị thể hiện mối tương quan của ER^{norm} thu được bằng phương pháp quét đột biến sâu sử dụng NGS (next generation sequencing - giải trình tự thế hệ mới) của các đột biến alanin của adnectin 3116_A06 với IC50 được đo bằng HTRF (Homogenous Time-Resolved Fluorescence - huỳnh quang đồng nhất phân giải theo thời gian). Các khoang tương ứng với các đột biến vị trí đơn được ưu tiên, được ưu tiên hơn, và được ưu tiên nhất để gắn kết với myostatin được thể hiện.

Fig.10Là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm gắn kết cạnh tranh (ELISA cạnh tranh) cho thấy rằng các adnectin PRD-1285, PRD-1286, và PRD-1288 không phong bế myostatin gắn kết với ActRIIb-Fc. Tỷ lệ % cạnh tranh của ActRIIb-Fc gắn kết với myostatin được thể hiện. Như mong đợi, cấu trúc ActRIIb-Fc đối chứng dương cạnh tranh với ActRIIb-Fc gắn kết với myostatin.

Fig.11 là đồ thị thể hiện tác dụng ở các nồng độ khác nhau của adnectin PRD-1285, PRD-1286, và PRD-1288 đối với hoạt tính myostatin trong thử nghiệm ARE-luxiferaza. Các điều kiện thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 3. Mỗi PRD-1285, PRD-1286, và PRD-1288 ức chế 100% hoạt tính ARE-luxiferaza gây ra bởi myostatin.

Fig.12 là sơ đồ thể hiện cơ chế tác dụng của các adnectin theo sáng chế để ức chế hoạt tính của myostatin. Phức hợp tín hiệu tự nhiên được thể hiện trên Fig.12A. Cụ thể, gắn kết của myostatin với ActRIIb được gây ra bởi quá trình phục hồi kinaza tương tự thụ thể activin 4 (activin receptor-like kinase 4 - ALK4) hoặc ALK5, và ActRIIb và ALK4/5

gắn kết với các vùng riêng biệt của myostatin. Các adnectin theo sáng chế ức chế gắn kết của ALK4/5, nhưng không ức chế gắn kết của ActRIIb, với myostatin (Fig.12B).

Fig.13 là mô hình máy tính thể hiện phức hợp của 3116_A06 và myostatin. Fig.13A là mô hình máy tính thể hiện cấu trúc của riêng myostatin (màu xám), với các vị trí gắn kết ALK4 và các vị trí gắn kết ActRIIB được thể hiện. Các vùng trong đó 3116_A06 gắn kết với myostatin (tức là, các vùng 1 và 2) được biểu diễn bằng màu đen, như được xác định từ thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 11. Fig.13B là mô hình máy tính thể hiện phức hợp được ưu tiên của 3116_A06 (màu đen) và myostatin (màu xám) được tạo ra từ quy trình nối như được mô tả trong ví dụ 12. Các vùng myostatin 1 và 2 như được nhận diện bởi HDX-MS (ví dụ 11) được biểu diễn ở dạng mô hình đặc chỉ trên một mặt của phân tử, và vòng BC, vòng DE, và vòng FG của 3116_A06 được biểu diễn ở dạng que. Mặc dù Fig.13 thể hiện một adnectin được gắn kết với một trong số hai vị trí gắn kết adnectin, nhưng cần lưu ý rằng mỗi vị trí gắn kết adnectin riêng, hoặc cả hai vị trí gắn kết adnectin, có thể bị chiếm giữ.

Fig.14 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm tăng thể trọng ở ngày 15 của chuột nhắt được điều trị bằng các adnectin kháng myostatin chỉ định so với chuột nhắt đối chứng. Chuột nhắt SCID B6 được điều trị hai tuần một lần hoặc hằng tuần bằng cách tiêm dưới da các adnectin kháng myostatin trong 14 ngày, như được mô tả trong ví dụ 13. Thể trọng được đo trong toàn bộ thời gian điều trị; các trị số thay đổi tỷ lệ phần trăm tính cho ngày 15 được thể hiện. (*= biểu thị mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng tương ứng; $p \leq 0,01$ phép kiểm định t).

Fig.15Là biểu đồ thể hiện mức tăng thể tích cơ cẳng chân (tính theo cm^3) ở ngày 15 của chuột nhắt được điều trị bằng các adnectin kháng myostatin chỉ định so với chuột nhắt đối chứng. Chuột nhắt SCID B6 được điều trị hai tuần một lần hoặc hằng tuần bằng cách tiêm dưới da các adnectin kháng myostatin trong 14 ngày như được mô tả trong ví dụ 13. (*= biểu thị mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng tương ứng; $p \leq 0,05$ phép kiểm định t).

Fig.16 là biểu đồ thể hiện mức tăng thể tích cơ cẳng chân (tính theo cm^3) ở ngày 28 của chuột nhắt được điều trị bằng PRD-1474 với các liều chỉ định khác nhau. Chuột nhắt SCID B6 được điều trị hai tuần một lần hoặc hằng tuần bằng cách tiêm dưới da

PRD-1474 trong 28 ngày như được mô tả trong ví dụ 14. (*p< 0,0001; # không có ý nghĩa giữa các nhóm).

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Mặc dù, các phương pháp và chế phẩm bất kỳ tương tự hoặc tương đương với phương pháp và chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế, nhưng các phương pháp và chế phẩm được ưu tiên được mô tả.

Thuật ngữ "myostatin có chiều dài đầy đủ" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trình tự polypeptit có chiều dài đầy đủ được mô tả trong McPherron et al. (1997), *nêu trên*, cũng như các polypeptit có chiều dài đầy đủ liên quan chứa các biến thể alen và các gen tương đồng giữa các loài. Thuật ngữ "myostatin" hoặc "myostatin trưởng thành" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các mảnh của myostatin trưởng thành có hoạt tính sinh học, cũng như các polypeptit liên quan chứa các biến thể alen, các biến thể ghép, và các peptit và polypeptit dung hợp. Protein đầu tận cùng C trưởng thành đã được báo cáo là có độ độ tương đồng trình tự là 100% giữa nhiều loài bao gồm người, chuột nhắt, gà, lợn, gà tây, và chuột cống (Lee et al., *PNAS* 2001;98:9306). Trình tự của prepromyostatin của người là:

MQKLQLCVYIYLFMLIVAGPVDLNENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEA
IKIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHAT
TETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQI
LRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDE
NGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFE
AFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINM
LYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS (SEQ ID NO.1)

Trình tự của pro-myostatin của người là:

NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVIR
QLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKC

CFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDM
NPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEV
KVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECE
FVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCG
CS (SEQ ID NO.2)

Trình tự của myostatin trưởng thành (được bảo thủ ở người, chuột, chuột cống, gà, gà tây, chó, ngựa, và lợn) là:

DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKY
PHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS (SEQ ID NO.3).

Thuật ngữ "polypeptit" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trình tự bất kỳ của hai hoặc nhiều axit amin, không phụ thuộc vào chiều dài, sự cải biến sau dịch mã, hoặc chức năng. Thuật ngữ "polypeptit", "peptit", và "protein" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này. Các polypeptit có thể bao gồm các axit amin tự nhiên và các axit amin không tự nhiên như các axit amin được mô tả trong patent Mỹ số 6,559,126, được hợp nhất vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Các polypeptit cũng có thể được cải biến theo cách bất kỳ trong số nhiều cách hóa học chuẩn (ví dụ, axit amin có thể được cải biến bằng nhóm bảo vệ; axit amin đầu tận cùng Carboxy có thể được tạo ra trong nhóm amit đầu tận; gốc đầu tận amino có thể được cải biến bằng các nhóm để, ví dụ, tăng cường tính ưa chất béo; hoặc polypeptit này có thể được glycosyl hóa hóa học hoặc nếu không thì được cải biến để làm tăng độ ổn định hoặc thời gian bán thải *in vivo*). Các cải biến của polypeptit có thể bao gồm gắn với một cấu trúc khác như hợp chất vòng hoặc phân tử khác với polypeptit và cũng có thể bao gồm các polypeptit chứa một hoặc nhiều axit amin trong cấu hình thay đổi (tức là, R hoặc S; hoặc, L hoặc D). Các peptit theo sáng chế là các protein có nguồn gốc từ miền typ III thứ mười của fibronectin đã được cải biến để gắn kết với myostatin và được gọi trong bản mô tả này là, "adnectin kháng myostatin" hoặc "adnectin myostatin".

Thuật ngữ "chuỗi polypeptit" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit trong đó mỗi trong số các miền của nó được gắn vào (các) miền khác bởi (các) liên kết peptit, trái ngược với các tương tác không đồng hóa trị hoặc liên kết đisulfua.

Thuật ngữ "polypeptit phân lập" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit được nhận diện và tách và/hoặc thu lại từ thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Các tạp chất của môi trường tự nhiên của nó là các nguyên liệu thường gây cản trở việc chẩn đoán hoặc trị liệu của polypeptit, và có thể bao gồm các enzym, hormon, và các chất tan có protein hoặc không có protein khác. Theo các phương án được ưu tiên, polypeptit sẽ được tinh chế (1) đến lớn hơn 95% khối lượng polypeptit như được xác định bằng phương pháp Lowry, và tốt hơn nếu lớn hơn 99% khối lượng, (2) đến mức độ đủ để thu được ít nhất các gốc của trình tự axit amin có đầu tận cùng N hoặc trình tự axit amin nội bằng cách sử dụng máy phân tích trình tự cốc quay, hoặc (3) để đồng nhất bằng SDS-PAGE trong điều kiện khử hoặc không khử có sử dụng chất nhuộm xanh Coomassie hoặc, tốt hơn nếu chất nhuộm màu bạc. Polypeptit phân lập bao gồm polypeptit in situ trong tế bào tái tổ hợp do ít nhất một thành phần của môi trường tự nhiên của polypeptit này không có mặt. Tuy nhiên, thông thường polypeptit phân lập sẽ được điều chế ít nhất bằng một bước tinh chế.

Thuật ngữ "tỷ lệ phần trăm (%) độ tương đồng trình tự axit amin" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin trong trình tự dự tuyển là giống với các gốc axit amin trong trình tự được chọn, sau khi bắt cặp trình tự và đưa các khe, nếu cần, để thu được tỷ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự lớn nhất, và không coi gốc thay thế bảo thủ bất kỳ là một phần của độ độ tương đồng trình tự. Sự bắt cặp nhằm mục đích xác định tỷ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự axit amin có thể thu được theo nhiều cách đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính đã biết rộng rãi như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 hoặc Megalign (DNASTAR™). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng quyết định các thông số thích hợp để đo lường sự bắt cặp, bao gồm các thuật toán bất kỳ cần thiết để thu được mức độ bắt cặp lớn nhất trên suốt chiều dài đầy đủ của trình tự cần so sánh. Ví dụ, % độ tương đồng trình tự axit amin của trình tự axit amin A đã cho so với, với, hoặc đối với trình tự axit amin B đã cho (có thể được diễn đạt theo cách khác là trình tự axit amin A đã cho có hoặc bao gồm % độ tương đồng trình tự axit amin nhất định so với, với, hoặc đối với trình tự axit amin B đã cho) được tính như sau: 100 nhân với tỷ lệ X/Y trong đó X là số lượng các gốc axit amin được tính là số cặp khớp giống nhau bởi chương trình bắt cặp trình tự ALIGN-2 trong đó việc bắt cặp A và B được thực hiện, và trong đó Y là tổng số các gốc axit amin trong B. Cần hiểu rằng

khi chiều dài của trình tự axit amin A không bằng chiều dài của trình tự axit amin B, thì % độ tương đồng trình tự axit amin của A so với B sẽ không bằng % độ tương đồng trình tự axit amin của B so với A.

Thuật ngữ "gốc thay thế bảo thủ" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự thay thế gốc axit amin bởi một gốc khác, mà không thay đổi cấu hình và chức năng toàn thể của peptit, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thay thế axit amin bằng một axit amin có đặc tính tương tự (ví dụ, độ phân cực, tiềm năng gắn kết hyđro, tính axit, tính bazơ, hình dạng, tính kỵ nước, tính thơm, và các đặc tính tương tự). Các axit amin có các đặc tính tương tự là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, arginin, histiđin và lysin là các axit amin bazơ thân nước và có thể thay cho nhau được. Tương tự, isoleuxin, một axit amin kỵ nước, có thể được thay thế bằng leuxin, metionin hoặc valin. Các axit amin trung tính thân nước, có thể được thay thế cho nhau, bao gồm asparagin, glutamin, serin và threonin. "Được thay thế"" hoặc "được cải biến" theo sáng chế chỉ các axit amin đã được biến đổi hoặc được cải biến từ các axit amin có trong tự nhiên. Như vậy cần hiểu rằng trong trường hợp của sáng chế, gốc thay thế bảo thủ được thừa nhận trong lĩnh vực này là gốc thay thế một axit amin cho một axit amin khác có đặc tính tương tự.

Thuật ngữ "vị trí gắn kết adnectin" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vị trí hoặc phần của protein (ví dụ, myostatin) tương tác hoặc gắn kết với adnectin cụ thể (ví dụ, dưới dạng epitop được nhận diện bởi kháng thể). Các vị trí gắn kết adnectin có thể được tạo ra từ các axit amin liền kề hoặc các axit amin không liền kề được đặt cạnh nhau bằng cách gấp cuộn protein bậc ba. Các vị trí gắn kết adnectin được tạo ra bởi các axit amin liền kề thường giữ được khi tiếp xúc với các dung môi biến tính, còn các vị trí gắn kết adnectin được tạo ra bằng cách gấp cuộn bậc ba thường bị mất khi xử lý bằng các dung môi biến tính.

Vị trí gắn kết adnectin của adnectin kháng myostatin theo sáng chế có thể được xác định bằng cách ứng dụng các kỹ thuật chuẩn thường được sử dụng để lập bản đồ epitop của các kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, lập bản đồ proteaza và phân tích đột biến. Theo cách khác, vị trí gắn kết adnectin có thể được xác định bằng thử nghiệm cạnh tranh sử dụng adnectin hoặc kháng thể tham chiếu gắn kết với cùng polypeptit, ví dụ, myostatin (như được mô tả chi tiết hơn trong phần "Các adnectin cạnh tranh chéo và/hoặc các adnectin gắn kết với cùng vị trí gắn kết adnectin". Khi adnectin

thử nghiệm và phân tử đối chiếu (ví dụ, một adnectin hoặc kháng thể khác) cạnh tranh, thì chúng gắn kết với cùng vị trí gắn kết adnectin hoặc với các vị trí gắn kết adnectin đủ gần sao cho gắn kết của một phân tử cản trở gắn kết của phân tử kia.

Thuật ngữ "gắn kết một cách đặc hiệu", "gắn kết đặc hiệu", "gắn kết chọn lọc", và "gắn kết một cách chọn lọc" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ adnectin có ái lực đối với myostatin, nhưng không gắn kết đáng kể (ví dụ, gắn kết nhỏ hơn 10%) với polypeptit khác khi được đo bằng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực như, nhưng không giới hạn ở, phân tích Scatchard và/hoặc thử nghiệm gắn kết cạnh tranh (ví dụ, ELISA cạnh tranh, thử nghiệm BIACORE). Thuật ngữ này cũng có thể áp dụng được khi ví dụ, miền gắn kết của adnectin theo sáng chế là đặc hiệu đối với myostatin.

Thuật ngữ "gắn kết ưu tiên" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trường hợp trong đó adnectin theo sáng chế gắn kết với myostatin lớn hơn ít nhất khoảng 20% so với khi nó gắn kết với polypeptit khác khi được đo bằng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực như, nhưng không giới hạn ở, phân tích Scatchard và/hoặc thử nghiệm gắn kết cạnh tranh (ví dụ, ELISA cạnh tranh, thử nghiệm BIACORE).

Thuật ngữ "khả năng phản ứng chéo" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ adnectin gắn kết với nhiều hơn một protein riêng biệt có các vị trí gắn kết adnectin giống hoặc rất giống nhau.

Thuật ngữ "K_D" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hằng số cân bằng phân ly của tương tác adnectin-protein cụ thể (ví dụ, myostatin) hoặc ái lực của adnectin đối với protein (ví dụ, myostatin), khi được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc thử nghiệm gắn kết tế bào. Thuật ngữ "K_D mong muốn" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ K_D của adnectin là đủ để đạt được các mục đích được dự tính. Ví dụ, K_D mong muốn có thể chỉ K_D của adnectin cần thiết để gây ra tác dụng chức năng trong thử nghiệm *in vitro*, ví dụ, thử nghiệm luxiferaza trên cơ sở tế bào.

Thuật ngữ "k_{ass}" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hằng số tốc độ liên kết đối với sự liên kết của adnectin vào phức hợp adnectin/protein.

Thuật ngữ "k_{diss}" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hằng số tốc độ phân ly đối với sự phân ly của adnectin ra khỏi phức hợp adnectin/protein.

Thuật ngữ "IC_{50}" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ nồng độ của adnectin ức chế đáp ứng, trong thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo*, xuống mức còn 50% đáp ứng ức chế lớn nhất, tức là một nửa chừng giữa đáp ứng ức chế lớn nhất và đáp ứng khi không được điều trị.

Thuật ngữ "hoạt tính myostatin" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ một hoặc nhiều hoạt tính điều hòa sinh trưởng hoặc tạo hình liên quan đến việc gắn kết protein myostatin hoạt tính với ActRIIb và tiếp theo phục hồi Alk4 hoặc Alk5. Ví dụ, myostatin hoạt tính là chất điều hòa âm của khối lượng cơ xương. Myostatin hoạt tính cũng có thể điều hòa việc sản xuất các enzym đặc hiệu cơ (ví dụ, creatin kinaza), kích thích sự tăng sinh nguyên bào cơ, và điều hòa sự biệt hóa tiền tế bào tạo mỡ thành tế bào tạo mỡ. Hoạt tính myostatin có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong tình trạng kỹ thuật, như các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "ức chế hoạt tính myostatin" hoặc "đối kháng hoạt tính myostatin" hoặc "đối kháng myostatin" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ khả năng của các adnectin kháng myostatin theo sáng chế để trung hòa hoặc đối kháng hoạt tính của myostatin *in vivo* hoặc *in vitro.* Thuật ngữ "ức chế" hoặc "trung hòa" được sử dụng trong bản mô tả này đối với hoạt tính của adnectin theo sáng chế có nghĩa là khả năng về cơ bản đối kháng, ức chế, phòng ngừa, ngăn chặn, làm chậm, phá vỡ, làm mất, làm ngừng, làm giảm hoặc đảo ngược ví dụ, tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của yếu tố cần được ức chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hoạt tính hoặc đặc tính sinh học, bệnh hoặc tình trạng bệnh. Mức độ ức chế hoặc trung hòa tốt hơn nếu ít nhất khoảng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% hoặc cao hơn.

Ví dụ, adnectin kháng myostatin theo sáng chế có thể làm giảm nồng độ tuần hoàn của myostatin có hoạt tính sinh học thường được thấy ở đối tượng động vật có xương sống, hoặc giảm nồng độ tuần hoàn của myostatin có hoạt tính sinh học ở các đối tượng có rối loạn dẫn đến tăng nồng độ myostatin tuần hoàn. Mức giảm hoạt tính myostatin có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm *in vitro*, ví dụ, thử nghiệm gắn kết, như được mô tả trong bản mô tả này. Theo cách khác, việc giảm hoạt tính myostatin có thể dẫn đến tăng thể trọng, tăng cường khối lượng cơ, tăng độ bền cơ, thay đổi tỷ lệ giữa cơ và chất béo, tăng khối lượng cơ không chứa chất béo, tăng kích thước và/hoặc số lượng tế bào cơ, và/hoặc giảm hàm lượng chất béo trong cơ thể.

Thuật ngữ "PK" hoặc "dược động học" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các đặc tính của hợp chất bao gồm, ví dụ, hấp thu, phân bố, chuyển hóa, và thải trừ bởi đối tượng. Thuật ngữ "protein điều hòa PK" hoặc "gốc PK" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein, peptit, hoặc nhóm bất kỳ ảnh hưởng đến các đặc tính dược động học của phân tử có hoạt tính sinh học khi được dung hợp với hoặc được sử dụng cùng với phân tử có hoạt tính sinh học này. Ví dụ về protein điều hòa PK hoặc gốc PK bao gồm PEG, chất gắn kết albumin huyết thanh của người (như được mô tả trong công bố đơn patent Mỹ các số 2005/0287153 và 2007/0003549, WO2009/083804 và WO2009/133208), albumin huyết thanh của người, vùng Fc hoặc mảnh Fc và các biến thể của chúng, và đường (ví dụ, axit sialic).

Thuật ngữ "thời gian bán thải của trình tự axit amin hoặc hợp chất" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thời gian để nồng độ trong huyết thanh của polypeptit giảm xuống 50%, *in vivo*, ví dụ, do sự thoái hóa của trình tự hoặc hợp chất và/hoặc sự thanh thải hoặc sự càng hóa của trình tự hoặc hợp chất bằng các cơ chế tự nhiên. Thời gian bán thải có thể được xác định theo cách bất kỳ đã biết, như bằng cách phân tích dược động học. Các kỹ thuật thích hợp là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và có thể, ví dụ, thường bao gồm các bước cho đối tượng dùng một cách thích hợp liều trình tự axit amin hoặc hợp chất thích hợp theo sáng chế; lấy mẫu máu hoặc các mẫu khác từ đối tượng này ở các khoảng thời gian đều nhau; xác định hàm lượng hoặc nồng độ trình tự axit amin hoặc hợp chất theo sáng chế trong mẫu máu này; và tính toán, từ (đồ thị) dữ liệu thu được từ đó, thời gian cho đến khi hàm lượng hoặc nồng độ trình tự axit amin hoặc hợp chất theo sáng chế được giảm xuống 50% so với hàm lượng ban đầu khi dùng liều. Tham khảo trong, ví dụ, sổ tay hướng dẫn chuẩn, như Kenneth, A. et al., Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and in Peters et al., Pharmacokinete Analysis: A Practical Approach (1996). Cũng tham khảo trong Gibaldi, M. et al., Pharmacokinetics, 2nd Rev. Edition, Marcel Dekker (1982).

Thời gian bán thải có thể được biểu diễn bằng các thông số như $t_{1/2}$-alpha, $t_{1/2}$-beta, HL_Lambda_z, và diện tích dưới đường cong (area under the curve - AUC). Thuật ngữ "tăng thời gian bán thải" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc tăng thông số bất kỳ trong số các thông số này, hai thông số bất kỳ trong số các thông số này, ba thông số bất kỳ trong số các thông số này hoặc tất cả bốn thông số này. Thuật ngữ "tăng thời gian bán

thải" cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chỉ việc tăng $t_{1/2}$-beta, và/hoặc HL_Lambda_z, có hoặc không tăng $t_{1/2}$-alpha và/hoặc AUC hoặc cả hai.

Thuật ngữ "mpk", "mg/kg", hoặc "mg trên mỗi kg" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ miligam trên mỗi kilogam. Tất cả các thuật ngữ này được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả.

Thuật ngữ "cá thể", "đối tượng", và "đối tượng bị bệnh" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ động vật, tốt hơn nếu động vật có vú (bao gồm động vật không phải linh trưởng và động vật linh trưởng) hoặc các loài chim, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chuột, bộ bán hầu, người, động vật có vú nuôi ở trang trại (ví dụ, loài bò, loài lợn, loài cừu), động vật có vú dùng trong thể thao (ví dụ, loài ngựa), và động vật có vú nuôi trong nhà (ví dụ, loài chó và loài mèo); tốt hơn nếu thuật ngữ này dùng để chỉ người. Thuật ngữ này cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các loài chim, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gà và gà tây. Trong một số phương án, tốt hơn nếu đối tượng này là động vật có vú, tốt hơn nếu người, còn được đặc trưng bởi bệnh hoặc rối loạn hoặc tình trạng bệnh mà sẽ có lợi từ việc giảm hàm lượng hoặc giảm hoạt tính sinh học của myostatin. Theo một phương án khác, tốt hơn nếu đối tượng này là động vật có vú, tốt hơn nếu người, còn được đặc trưng là có nguy cơ phát triển rối loạn, bệnh hoặc tình trạng bệnh mà sẽ có lợi từ việc giảm hàm lượng của myostatin hoặc giảm hoạt tính sinh học của myostatin.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu điều trị bệnh" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ ít nhất là liều tối thiểu, nhưng nhỏ hơn liều gây độc, của chất cần thiết để đem lại lợi ích trị liệu cho đối tượng. Ví dụ, lượng hữu hiệu điều trị bệnh của adnectin kháng myostatin theo sáng chế là lượng mà ở động vật có vú, tốt hơn nếu người, dẫn đến một hoặc nhiều tác động sau: tăng thể tích cơ và/hoặc độ bền cơ, giảm chất béo trong cơ thể, tăng tính mẫn cảm insulin, hoặc điều trị các tình trạng bệnh trong đó sự có mặt của myostatin gây ra hoặc góp phần vào tác dụng bệnh lý không mong muốn hoặc giảm hàm lượng myostatin thu được tác dụng điều trị bệnh có lợi.

Thuật ngữ "suy nhược" hoặc "tình trạng suy nhược" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tình trạng có thể được đặc trưng bởi hai hoặc nhiều triệu chứng bao gồm yếu, giảm cân, vận động chậm, mệt mỏi, mức độ hoạt động thấp, khả năng chịu đựng kém, và giảm

đáp ứng hành vi với tín hiệu cảm giác. Một dấu hiệu xác nhận của tình trạng suy nhược là "giảm khối cơ", hoặc mất khối lượng cơ liên quan đến tuổi.

Thuật ngữ "chứng suy mòn" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tình trạng hao mòn cơ và mất trọng lượng nạc của cơ thể được tăng tốc mà có thể là do các bệnh khác nhau.

Tổng quan

Sáng chế đề cập đến polypeptit gắn kết với và đối kháng myostatin (trong bản mô tả này được gọi là "adnectin kháng myostatin"). Để nhận diện các chất đối kháng myostatin, myostatin được trình diện với một thư viện adnectin tổng hợp lớn. Các adnectin được gắn kết với myostatin được sàng lọc về tính gắn kết myostatin, các đặc tính sinh lý, và hoạt tính ức chế myostatin. Các adnectin kháng myostatin được gây đột biến và đưa vào chọn lọc tiếp bằng cách làm giảm nồng độ đích và chọn lọc các adnectin kháng myostatin có tốc độ gắn kết lùi chậm. Từ quy trình tối ưu hóa này, họ adnectin được nhận diện là các chất ức chế đặc hiệu myostatin có hoạt tính sinh hóa và sinh lýcó lợi. Các adnectin kháng myostatin được mô tả trong bản mô tả này là hữu ích để điều trị các rối loạn, bệnh, và tình trạng bệnh mà việc ức chế hoạt tính myostatin đã biết là có lợi, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, điều trị các bệnh hao mòn cơ, rối loạn chuyển hóa, và chứng teo cơ do tình trạng kém hoạt động.

Như được mô tả trong Rebbapragada et al. (*MCB* 2003;23:7230-42), quá trình truyền tín hiệu myostatin bao gồm gắn kết myostatin với ActRIIb, tiếp theo phục hồi kinaza tương tự thụ thể activin 4 (ALK4) hoặc ALK5. Việc gắn kết với các ALK gây ra sự phosphoryl hóa Smad2/Smad3, tiếp theo hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu giống TGFβ (xem, ví dụ, Rebbapragada et al., *MCB* 2003;23:7230-42).

I. Khung trên cơ sở fibronectin

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến adnectin kháng myostatin chứa miền Fn3 trong đó một hoặc nhiều vòng tiếp cận dung môi đã được ngẫu nhiên hóa hoặc được gây đột biến. Theo một số phương án, miền Fn3 là miền Fn3 có nguồn gốc từ cấu trúc thứ mười thể dại của miền fibronectin typ III (^{10}Fn3) của người:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKS TATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO.4) (vòng BC, vòng DE, và vòng FG được gạch chân).

Theo các phương án khác, các trình tự gắn kết không phải phối tử của ^{10}Fn3, tức là "khung ^{10}Fn3", có thể được biến đổi miễn là ^{10}Fn3 giữ được chức năng gắn kết phối tử và/hoặc độ ổn định về cấu trúc. Nhiều khung ^{10}Fn3 đột biến đã được báo cáo. Theo một khía cạnh, một hoặc nhiều trong số Asp 7, Glu 9, và Asp 23 được thay thế bằng một axit amin khác, ví dụ, gốc axit amin không mang điện tích âm (ví dụ, Asn, Lys, v.v.). Các đột biến này đã được báo cáo là có tác dụng thúc đẩy độ ổn định của ^{10}Fn3 đột biến lớn hơn ở độ pH trung tính so với dạng thể dại (xem, ví dụ, công bố đơn PCT số WO 02/04523). Nhiều biến đổi bổ sung trong khung ^{10}Fn3 có lợi hoặc trung lập đã được mô tả. Xem, ví dụ, Batori et al., Protein Eng., 15(12):1015-1020 (tháng 12 năm 2002); Koide et al., Biochemistry, 40(34):10326-10333 (28 tháng 8 năm 2001).

Cả hai protein ^{10}Fn3 biến thể và thể dại được đặc trưng bởi cùng một cấu trúc, cụ thể là bảy trình tự miền sợi beta được gọi tên từ A đến G và sáu vùng vòng (vòng AB, vòng BC, vòng CD, vòng DE, vòng EF, và vòng FG) nối với bảy trình tự miền sợi beta. Các sợi beta nằm gần nhất với các đầu tận cùng N và C có thể tạo cấu hình giống beta trong dung dịch. Trong SEQ ID NO.4, vòng AB tương ứng với các gốc 15-16, vòng BC tương ứng với các gốc 21-30, vòng CD tương ứng với các gốc 39-45, vòng DE tương ứng với các gốc 51-56, vòng EF tương ứng với các gốc 60-66, và vòng FG tương ứng với các gốc 76-87 (Xu et al., *Chemistry & Biology*, 9:933-942, 2002).

Do đó, theo một số phương án, adnectin kháng myostatin là polypeptit ^{10}Fn3 có độ tương đồng ít nhất bằng 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, hoặc 90% so với miền ^{10}Fn3 của người, được thể hiện trên SEQ ID NO.4. Nhiều khả năng biến đổi thường sẽ xảy ra trong một hoặc nhiều vòng. Mỗi trong số các sợi beta hoặc giống beta của polypeptit ^{10}Fn3 có thể bao gồm chủ yếu trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 100% so với trình tự của sợi beta hoặc giống beta tương ứng của SEQ ID NO.4, miễn là biến đổi này không phá vỡ độ ổn định của polypeptit trong các điều kiện sinh lý học.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến adnectin kháng myostatin chứa miền fibronectin typ III thứ mười (^{10}Fn3), trong đó miền ^{10}Fn3 này chứa vòng AB; vòng BC;

vòng CD; vòng DE; vòng EF; và vòng FG; và có ít nhất một vòng được chọn từ vòng BC, vòng DE, và vòng FG có trình tự axit amin biến đổi so với trình tự của vòng tương ứng của miền ^{10}Fn3 của người. Theo một số phương án, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế bao gồm miền ^{10}Fn3 chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% so với các vùng không phải vòng của SEQ ID NO.4, trong đó ít nhất một vòng được chọn từ BC, DE, và FG được biến đổi. Theo một số phương án, các vòng BC và FG được biến đổi, và theo một số phương án, các vòng BC, vòng DE, và vòng FG được biến đổi, tức là các miền ^{10}Fn3 chứa các vòng không có trong tự nhiên. Theo một số phương án, các vòng AB, CD và/hoặc EF được biến đổi. "Được biến đổi" có nghĩa là một hoặc nhiều biến đổi trình tự axit amin so với trình tự khuôn mẫu (miền fibronectin tương ứng của người) và bao gồm các thêm đoạn, mất đoạn, thay thế axit amin hoặc kết hợp của chúng. Việc biến đổi trình tự axit amin có thể được thực hiện qua biến đổi trình tự định trước, mù, hoặc tự phát, thường là của trình tự mã hóa axit nucleic, và có thể xảy ra bằng kỹ thuật bất kỳ, ví dụ, PCR, PCR dễ bị lỗi (error-prone PCR), hoặc tổng hợp hóa học ADN.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều vòng được chọn từ BC, DE, và FG có thể được kéo dài hoặc rút ngắn chiều dài so với vòng fibronectin tương ứng của người. Theo một số phương án, chiều dài của vòng có thể được kéo dài 2-25 axit amin. Theo một số phương án, chiều dài của vòng có thể được giảm 1-11 axit amin. Do đó, để tối ưu hóa việc gắn kết kháng nguyên thì chiều dài vòng của ^{10}Fn3 có thể được biến đổi về độ dài cũng như trình tự để thu được độ linh động và ái lực gắn kết kháng nguyên lớn nhất có thể.

Theo một số phương án, polypeptit này bao gồm miền Fn3 chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80, 85, 90, 95, 98, 99, hoặc 100% so với các vùng không phải vòng của trình tự SEQ ID NO.4, trong đó ít nhất một vòng được chọn từ BC, DE, và FG được biến đổi. Theo một số phương án, vòng BC biến đổi có đến 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 thay thế axit amin, đến 1, 2, 3, hoặc 4 mất đoạn axit amin, đến 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 cài xen axit amin, hoặc kết hợp của chúng. Theo một số phương án, vòng DE biến đổi có đến 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 thay thế axit amin, đến 1, 2, 3, hoặc 4 mất đoạn axit amin, đến 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, hoặc 13 cài xen axit amin, hoặc kết hợp của chúng. Theo một số phương án, vòng FG có đến 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, hoặc

12 thay thế axit amin, đến 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc 11 mất đoạn axit amin, đến 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ,17 ,18 ,19, 20, 21, 22, 23, 24, hoặc 25 cài xen axit amin, hoặc kết hợp của chúng.

Các adnectin kháng myostatin theo sáng chế là trên cơ sở khung ^{10}Fn3 và thường được xác định bởi trình tự sau:

EVVAAT(Z)$_a$SLLI(Z)$_x$YYRITYGE(Z)$_b$QEFTV(Z)$_y$ATI(Z)$_c$DYTITVYAV(Z)$_z$ISINYRT (SEQ ID NO.5),

trong đó vòng AB được biểu diễn bởi $(Z)_a$, vòng CD được biểu diễn bởi $(Z)_b$, vòng EF được biểu diễn bởi $(Z)_e$, vòng BC được biểu diễn bởi $(Z)_x$, vòng DE được biểu diễn bởi $(Z)_y$, và vòng FG được biểu diễn bởi $(Z)_z$. Z là axit amin bất kỳ và chỉ số dưới sau Z là số nguyên chỉ số lượng axit amin. Cụ thể, ở bất kỳ chỗ nào, a có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 15, 2-15, 1-10, 2-10, 1-8, 2-8, 1-5, 2-5, 1-4, 2-4, 1-3, 2-3, hoặc 1-2 axit amin; và b, c, x, y và z độc lập, ở bất kỳ chỗ nào, có thể nằm trong khoảng từ 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7, hoặc 6-7 axit amin. Theo các phương án được ưu tiên, a là 2 axit amin, b là 7 axit amin, c là 7 axit amin, x là 11 axit amin, y là 6 axit amin, và z là 12 axit amin. Các trình tự của sợi beta, ở bất kỳ chỗ nào, có thể có từ 0 đến 10, từ 0 đến 8, từ 0 đến 6, từ 0 đến 5, từ 0 đến 4, từ 0 đến 3, từ 0 đến 2, hoặc từ 0 đến 1 thay thế, mất đoạn hoặc thêm đoạn qua tất cả 7 vùng khung so với các axit amin tương ứng được xác định trong SEQ ID NO.4. Theo một số phương án, các trình tự của sợi beta, ở bất kỳ chỗ nào, có thể có từ 0 đến 10, từ 0 đến 8, từ 0 đến 6, từ 0 đến 5, từ 0 đến 4, từ 0 đến 3, từ 0 đến 2, hoặc từ 0 đến 1 thay thế bảo thủ qua tất cả 7 vùng khung so với các axit amin tương ứng được xác định trong SEQ ID NO.4. Theo một số phương án, các gốc axit amin lõi được cố định và các gốc thay thế, gốc thay thế bảo thủ, mất đoạn hoặc thêm đoạn bất kỳ xảy ra ở các gốc không phải gốc axit amin lõi.

Theo cách khác, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế là trên cơ sở khung ^{10}Fn3 và thường được xác định bởi trình tự:

EVVAATPTSLLI(Z)$_x$YYRITYGETGGNSPVQEFTV(Z)$_y$ATISGLKPGVDYTITVYAV(Z)$_z$ISINYRT (SEQ ID NO.6)

trong đó vòng BC được biểu diễn bởi $(Z)_x$, vòng DE được biểu diễn bởi $(Z)_y$, và vòng FG được biểu diễn bởi $(Z)_z$. Z là axit amin bất kỳ và chỉ số dưới sau Z là số nguyên

chỉ số lượng axit amin. Cụ thể, mỗi x, y và z độc lập, ở bất kỳ chỗ nào, có thể nằm trong khoảng 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7, hoặc 6-7 axit amin. Theo các phương án được ưu tiên, x là 11 axit amin, y là 6 axit amin, và z là 12 axit amin. Các trình tự của sợi beta, ở bất kỳ chỗ nào, có thể có từ 0 đến 10, từ 0 đến 8, từ 0 đến 6, từ 0 đến 5, từ 0 đến 4, từ 0 đến 3, từ 0 đến 2, hoặc từ 0 đến 1 thay thế, mất đoạn hoặc thêm đoạn qua tất cả 7 vùng khung so với các axit amin tương ứng được xác định trong SEQ ID NO.1. Theo một số phương án, các trình tự của sợi beta, ở bất kỳ chỗ nào, có thể có từ 0 ðến 10, từ 0 ðến 8, từ 0 ðến 6, từ 0 ðến 5, từ 0 ðến 4, từ 0 ðến 3, từ 0 ðến 2, hoặc từ 0 ðến 1 thay thế bảo thủ qua tất cả 7 vùng khung so với các axit amin týõng ứng ðýợc xác ðịnh trong SEQ ID NO.4. Theo một số phýõng án, các gốc axit amin lõi được cố định và các gốc thay thế, gốc thay thế bảo thủ, mất đoạn hoặc thêm đoạn bất kỳ xảy ra ở các gốc không phải gốc axit amin lõi.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa trình tự như được xác định trong SEQ ID NO.5 hoặc 6, trong đó ít nhất một trong số các vòng BC, vòng DE, và vòng FG như được biểu diễn lần lượt bởi $(Z)_x$, $(Z)_y$, và $(Z)_z$, được biến đổi. Như đã mô tả trên đây, các gốc axit amin tương ứng với các gốc 21-30, 51-56, và 76-87 của trình tự SEQ ID NO.4 lần lượt xác định các vòng BC, vòng DE, và vòng FG. Tuy nhiên, cần hiểu rằng không phải mỗi gốc trong vùng vòng đều cần phải được biến đổi để thu được chất gắn kết ^{10}Fn3 có ái lực mạnh đối với đích mong muốn (ví dụ, myostatin).

Ví dụ, các gốc 21 (S) và 22 (W) của vòng BC như được thể hiện trong SEQ ID NO.1 không cần phải biến đổi để gắn kết với myostatin. Tức là, các miền ^{10}Fn3 có ái lực gắn kết cao với myostatin có thể thu được bằng cách chỉ biến đổi các gốc 23-30 của vòng BC như được thể hiện trong SEQ ID NO.4. Điều này được minh họa trong các vòng BC theo sáng chế trong Bảng 1, chỉ ra rằng chỉ các vị trí được gạch chân được biến đổi.

Tương tự, các vị trí 51 (P) và 56 (T) của vòng DE như được thể hiện trong SEQ ID NO.4 không cần phải biến đổi để gắn kết với myostatin. Tức là, các miền ^{10}Fn3 có ái lực gắn kết cao với myostatin có thể thu được bằng cách chỉ biến đổi các gốc 52-55 của vòng DE như được thể hiện trong SEQ ID NO.4. Điều này được minh họa trong các vòng DE theo sáng chế trong Bảng 1, chỉ ra rằng chỉ các gốc ở các vị trí được gạch chân được biến đổi.

Tương tự, các vị trí 76 (P) và 87 (T) của vòng FG như được thể hiện trong SEQ ID NO.1 không cần phải biến đổi để gắn kết với myostatin. Tức là, các miền ^{10}Fn3 có ái lực gắn kết cao với myostatin có thể thu được bằng cách chỉ biến đổi các gốc 77-86 của vòng FG như được thể hiện trong SEQ ID NO.4. Điều này được minh họa trong các vòng FG theo sáng chế trong Bảng 1, chỉ ra rằng chỉ các gốc ở các vị trí được gạch chân được biến đổi.

Do đó, theo một số phương án, các vùng vòng BC, vòng DE, và vòng FG của các adnectin kháng myostatin theo sáng chế có thể được mô tả theo các trình tự liên ứng. Các trình tự liên ứng này theo sáng chế bởi các vòng BC, vòng DE, và vòng FG được thể hiện trong Bảng 1, và như được xác định bằng phân tích WebLogo (Fig.2-Fig.7) (Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research* 2004;14:1188-1190, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn). Phân tích WebLogo tạo ra ký hiệu axit amin phản ánh tần suất của các axit amin trong mỗi vị trí được biến đổi của vòng BC, DE, hoặc FG.

Ví dụ, theo một số phương án, vòng BC, $(Z)_x$, được xác định bởi trình tự liên ứng X_1-L-P-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7 , trong đó, X_1 là S, T hoặc Y; X_2 là H, Y, N, R, F, G, S hoặc T; X_3 là A, P, Q, S, F, H, N hoặc R; X_4 là G hoặc A; X_5 là H, L, R, V, N, D, F, I hoặc K; X_6 là A, L, G, M, F, I hoặc V; và X_7 là H hoặc N. Theo một số phương án ưu tiên, vòng BC chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.7, 11-21, 23-31, 34, và 36-38. Theo một phương án, vòng BC chứa axit amin được xác định trong SEQ ID NO. 34.

Theo một số phương án, vòng DE, $(Z)_y$, được xác định bởi trình tự liên ứng G-R-G-X_8, trong đó X_8 là V hoặc L. Theo một số phương án ưu tiên, vòng DE chứa axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.39 và 42. Theo một phương án, vòng DE chứa axit amin được xác định trong SEQ ID NO. 39.

Theo một số phương án, vòng FG, $(Z)_z$, được xác định bởi trình tự liên ứng X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}, trong đó X_9 là L, V hoặc I; X_{10L}à T hoặc S; X_{11} là K, R, A, G, S, D, H, N, T hoặc P; X_{12} là S, T, A, E, H, K hoặc N; X_{13} là K, G, Q, D, E, N, T hoặc S; X_{14} là V, I, F, L, M, P, T hoặc Y; X_{15L}à I, L hoặc Y; X_{16} là H, I, V, K, L, R, F, G, S hoặc T; X_{17} là Y hoặc H; và X_{18} là K, M, L, R hoặc V. Theo một số phương án ưu tiên, vòng FG chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.46, 50-62, 64-72, 75-

77, và 79. Theo một phương án, vòng FG chứa axit amin được xác định trong SEQ ID NO. 75.

Theo các phương án khác, vòng BC, $(Z)_x$, được xác định bởi trình tự liên ứng X_{19}-X_{20}-P-X_{21}-G-X_{22}-A, trong đó X_{19} là D, E, V hoặc W; X_{20} là A, S hoặc V; X_{21} là R, A, G, K hoặc L; và X_{22} là L hoặc R. Theo một số phương án ưu tiên, vòng BC chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.8-10, 22, 32, 33, và 35.

Theo các phương án khác, vòng DE, $(Z)_y$, được xác định bởi trình tự liên ứng X_{23}-G-R-G-X_{24}, trong đó X_{23} là V, P, F, I hoặc L; và X_{24} là S, N hoặc T. Theo một số phương án ưu tiên, vòng DE chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.40, 41, và 43-45.

Theo các phương án khác, vòng FG, $(Z)_z$, được xác định bởi trình tự liên ứng X_{25}-X_{26}-R-X_{27}-G-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{31}-X_{32}, trong đó X_{25} là I hoặc V; X_{26} là F, D hoặc Y; X_{27} là D hoặc T; X_{28} là P, M, V hoặc T; X_{29} là V, L, N, R hoặc S; X_{30} là H, T, L, N, Q hoặc S; X_{31} là F, W, Y, H hoặc L; và X_{32} là D, A hoặc G. Theo một số phương án ưu tiên, vòng FG chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.47-49, 63, 73, 74, và 78.

Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề cập đến adnectin kháng myostatin chứa vòng BC, $(Z)_x$, có trình tự X_1-L-P-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7 và vòng DE, $(Z)_y$, có trình tự G-R-G-X_8, như được xác định trên đây. Theo một số phương án, vòng BC chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.7, 11-21, 23-31, 34, và 36-38, và vòng DE chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.39 và 42. Theo một phương án, các vòng BC và DE chứa các trình tự axit amin được xác định lần lượt trong các SEQ ID NO.34 và 39.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin chứa vòng BC, $(Z)_x$, có trình tự X_1-L-P-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7 và vòng FG, $(Z)_z$, có trình tự X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}, như được xác định trên đây. Theo một số phương án, vòng BC chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.7, 11-21, 23-31, 34, và 36-38, và vòng FG chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.46, 50-62, 64-72, 75-77, và 79. Theo một phương án, các vòng BC và FG chứa các trình tự axit amin được xác định lần lượt trong các SEQ ID NO.34 và 75.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin chứa vòng DE, $(Z)_y$, có trình tự G-R-G-X_8 và vòng FG, $(Z)_z$, có trình tự X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}, như được xác định trên đây. Theo một số phương án, vòng DE chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.39 và 42, và vòng FG chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.46, 50-62, 64-72, 75-77, và 79. Theo một phương án, các vòng DE và FG chứa các trình tự axit amin được xác định lần lượt trong các SEQ ID NO.39 và 75.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin chứa vòng BC, $(Z)_x$, có trình tự X_1-L-P-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7, vòng DE, $(Z)_y$, có trình tự G-R-G-X_8 và vòng FG, $(Z)_z$, có trình tự X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}, như được xác định trên đây. Theo một số phương án, vòng BC chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.7, 11-21, 23-31, 34, và 36-38, vòng DE chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.39 và 42, và vòng FG chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.46, 50-62, 64-72, 75-77, và 79. Theo một phương án, các vòng BC, DE và FG chứa các trình tự axit amin được xác định lần lượt trong các SEQ ID NO.34, 39 và 75.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến adnectin kháng myostatin chứa vòng BC, $(Z)_x$, có trình tự X_{19}-X_{20}-P-X_{21}-G-X_{22}-A và vòng DE, $(Z)_y$, có trình tự X_{23}-G-R-G-X_{24}, như được xác định trên đây. Theo một số phương án, vòng BC chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.8-10, 22, 32, 33, và 35 và vòng DE chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.40, 41, và 43-45.

Theo các phương án khác, adnectin kháng myostatin chứa vòng BC, $(Z)_x$, có trình tự X_{19}-X_{20}-P-X_{21}-G-X_{22}-A và vòng FG, $(Z)_z$, có trình tự X_{25}-X_{26}-R-X_{27}-G-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{30}-X_{32}, như được xác định trên đây. Theo một số phương án, vòng BC chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.8-10, 22, 32, 33, và 35 và vòng FG chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.47-49, 63, 73, 74, và 78.

Theo các phương án khác, adnectin kháng myostatin chứa vòng DE, $(Z)_y$, có trình tự X_{23}-G-R-G-X_{24} và vòng FG, $(Z)_z$, có trình tự X_{25}-X_{26}-R-X_{27}-G-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{30}-X_{32}, như được xác định trên đây. Theo một số phương án, vòng DE chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.40, 41, và 43-45 và vòng FG chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.47-49, 63, 73, 74, và 78.

Theo các phương án khác, adnectin kháng myostatin chứa vòng BC, $(Z)_x$, có trình tự X_{19}-X_{20}-P-X_{21}-G-X_{22}-A, chứa vòng DE, $(Z)_y$, có trình tự X_{23}-G-R-G-X_{24} và vòng FG,

$(Z)_z$, có trình tự X_{25}-X_{26}-R-X_{27}-G-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{30}-X_{32}, như được xác định trên đây. Theo một số phương án, vòng BC chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.8-10, 22, 32, 33, và 35, vòng DE chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.40, 41, và 43-45, và vòng FG chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO.47-49, 63, 73, 74, và 78.

Theo một số phương án ưu tiên, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa trình tự được xác định trong SEQ ID NO.5 hoặc 6, trong đó các vòng BC, DE và FG như được biểu diễn lần lượt bởi $(Z)_x$, $(Z)_y$, và $(Z)_z$, được thay thế bằng bộ vòng BC, vòng DE, và vòng FG tương ứng có các trình tự liên ứng lần lượt được xác định trong các SEQ ID NO.7-38, 39-45, và 46-79.

Theo các phương án ưu tiên khác, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa trình tự được xác định trong SEQ ID NO.5 hoặc 6, trong đó các vòng BC, DE và FG như được biểu diễn lần lượt bởi $(Z)_x$, $(Z)_y$, và $(Z)_z$, được thay thế bằng bộ vòng BC, vòng DE, và vòng FG tương ứng có trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, hoặc 99% so với các trình tự vòng BC, DE hoặc FG của các dòng được liệt kê trong Bảng 1.

Theo các phương án theo sáng chế, adnectin kháng myostatin như được mô tả trong bản mô tả này được xác định bởi SEQ ID NO.5 và có bộ trình tự vòng BC, DE và FG tương ứng từ dòng bất kỳ trong số các dòng được liệt kê trong Bảng 1. Ví dụ, dòng 1979_B06 trong Bảng 1 chứa các vòng BC, vòng DE, và vòng FG như được xác định lần lượt trong các SEQ ID NO.7, 39, và 46. Do đó, adnectin kháng myostatin trên cơ sở các vòng này có thể chứa SEQ ID NO.5 hoặc 6, trong đó $(Z)_x$ chứa SEQ ID NO.7, $(Z)_y$ chứa SEQ ID NO.39, và $(Z)_z$ chứa SEQ ID NO.46. Tương tự, các cấu trúc được dự tính sử dụng bộ vòng BC, DE và FG từ các dòng khác trong Bảng 1, hoặc các trình tự liên ứng lần lượt của các SEQ ID NO.7-38, 39-45, và 46-79. Các vùng khung của các adnectin kháng myostatin này có thể chứa, ở bất kỳ chỗ nào, từ 0 đến 20, từ 0 đến 15, từ 0 đến 10, từ 0 đến 8, từ 0 đến 6, từ 0 đến 5, từ 0 đến 4, từ 0 đến 3, từ 0 đến 2, hoặc từ 0 đến 1 thay thế, thay thế bảo thủ, mất đoạn hoặc thêm đoạn so với các gốc axit amin khung của trình tự SEQ ID NO.4. Các biến đổi khung như vậy có thể được thực hiện, miễn là adnectin kháng myostatin có khả năng gắn kết myostatin với K_D mong muốn.

Theo các phương án ưu tiên, vòng BC của adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: SWSLPHAGHVN (SEQ ID NO.7), SWVSPRGRAR (SEQ ID NO.8), SWEVPRGLAR (SEQ ID NO.9), SWWAPLGLAR (SEQ ID NO.10), SWTLPHAGLAH (SEQ ID NO.11), SWYLPYPAHMN (SEQ ID NO.12), SWSLPFAGHLN (SEQ ID NO.13), SWSLPYSGLAN (SEQ ID NO.14), SWSLPHAGHAH (SEQ ID NO.15), SWTLPNFGLIN (SEQ ID NO.16), SWTLPHAGRAH (SEQ ID NO.17), SWSLPYAGHLN (SEQ ID NO.18), SWSLPYAAHMN (SEQ ID NO.19), SWSLPYPGHLN (SEQ ID NO.20), SWSLPYAGHAH (SEQ ID NO.21), SWDAPGGLAR (SEQ ID NO.22), SWSLPTPGLAH (SEQ ID NO.23), SWSLPHRGVAN (SEQ ID NO.24), SWSLPSSGVAH (SEQ ID NO.25), SWSLPHHGFGH (SEQ ID NO.26), SWSLPHAGDAH (SEQ ID NO.27), SWSLPHNGVAH (SEQ ID NO.28), SWSLPRQGLAN (SEQ ID NO.29), SWSLPGPGHFH (SEQ ID NO.30), SWSLPHPGLGH (SEQ ID NO.31), SWDAPRGLAR (SEQ ID NO.32), SWDAPAGLAR (SEQ ID NO.33), SWSLPHQGKAN (SEQ ID NO.34), SWDAPKGLAR (SEQ ID NO.35), SWSLPNPGIAH (SEQ ID NO.36), SWSLPRPGNAH (SEQ ID NO.37), và SWSLPNPGNAH (SEQ ID NO.38).

Theo một số phương án, vòng BC của adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa phần được gạch chân của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.7-38, như được thể hiện trong bảng 1. Theo một phương án, vòng BC chứa phần được gạch chân của trình tự SEQ ID NO.34.

Theo một số phương án, vòng DE của adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: PGRGVT (SEQ ID NO.39), PGRGST (SEQ ID NO.40), LGRGST (SEQ ID NO.41), PGRGLT (SEQ ID NO.42), IGRGST (SEQ ID NO.43), FGRGTT (SEQ ID NO.44), và VGRGNT (SEQ ID NO.45). Theo một số phương án, vòng DE của adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa phần được gạch chân của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.39-45, như được thể hiện trong bảng 1. Theo một phương án, vòng DE chứa phần được gạch chân của trình tự SEQ ID NO.39.

Theo một số phương án, vòng FG của adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: TLTKSQMIHYMP (SEQ ID

NO.46), TIYRDGMSHHDP (SEQ ID NO.47), TVYRDGPLLLAP (SEQ ID NO.48), TIFRTGMVQYDP (SEQ ID NO.49), TLTNSEIILYKP (SEQ ID NO.50), TLTKSQILHHRP (SEQ ID NO.51), TLTRSKIIHYMP (SEQ ID NO.52), TLTHSNIIRYVP (SEQ ID NO.53), TVSSTKVIVYLP (SEQ ID NO.54), TITKSTIIIYKP (SEQ ID NO.55), TVTTTSVILYKP (SEQ ID NO.56), TLTKSQLIHYMP (SEQ ID NO.57), TLTRSQVIHYMP (SEQ ID NO.58), TLTKSKIIHYMP (SEQ ID NO.59), TVSSTKVIHYKP (SEQ ID NO.60), TLTKSKVIHYMP (SEQ ID NO.61), TVTTTKVIHYKP (SEQ ID NO.62), TIDRDGVNHFAP (SEQ ID NO.63), TVTHHGVIGYKP (SEQ ID NO.64), TLTGANVIIYKP (SEQ ID NO.35), TVTNTGVIIYKP (SEQ ID NO.66), TVTATGIIIYKP (SEQ ID NO.67), TVTRAGFYRYKP (SEQ ID NO.68), TVTREEVISYKP (SEQ ID NO.69), TVTAAGVIIYKP (SEQ ID NO.70), TVTANQPIIYKP (SEQ ID NO.71), TITPETIIVYKP (SEQ ID NO.72), TIDRDGTRSFDP (SEQ ID NO.73), TIFRDGPVTWDP (SEQ ID NO.74), TVTDTGYLKYKP (SEQ ID NO.75), TLTGSDTIFYKP (SEQ ID NO.76), TVTGKDVIKYKP (SEQ ID NO.77), TIFRDGVVNYGP (SEQ ID NO.78), và TVTDTGFITYKP (SEQ ID NO.79).

Theo một số phương án, vòng FG của adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa phần được gạch chân của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.46-79, như được thể hiện trong bảng 1. Theo một phương án, vòng FG chứa phần được gạch chân của trình tự SEQ ID NO.75.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa một trình tự vòng BC được chọn từ các trình tự vòng BC có các SEQ ID NO.7-38, hoặc phần được gạch chân của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.7-38, như được thể hiện trong bảng 1; một trình tự vòng DE được chọn từ các trình tự vòng DE có các SEQ ID NO.39-45, hoặc phần được gạch chân của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.39-45 như được thể hiện trong bảng 1; và một trình tự vòng FG được chọn từ các trình tự vòng FG có các SEQ ID NO.46-79, hoặc phần được gạch chân của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.46-79 như được thể hiện trong bảng 1. Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa trình tự axit amin của vòng BC, DE và FG có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% lần

lượt so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.7-38, 39-45, và 46-79. Theo các phương án khác, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa trình tự axit amin của vòng BC, DE và FG có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% lần lượt so với phần được gạch chân của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.7-38, 39-45, và 46-79, như được thể hiện trong bảng 1.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin chứa trình tự axit amin được xác định bởi trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.80-123, 228-239, và 252-273 (các trình tự có chiều dài đầy đủ từ các bảng 2, 5, và 6). Theo một phương án, adnectin kháng myostatin chứa trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO.273.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.80-123, 228-239, và 252-273. Theo các phương án khác, adnectin kháng myostatin chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% so với các vùng vòng không phải BC, DE, và FG của các SEQ ID NO.80-123, 228-239, và 252-273.

Theo một phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa các vòng BC, vòng DE, và vòng FG như được xác định lần lượt trong các SEQ ID NO.34, 39, và 75. Theo một phương án khác, adnectin kháng myostatin chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% so với trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO.273 [PRD-1474], SEQ ID NO.118 [3116_A06], SEQ ID NO.281 [trình tự adnectin lõi được sử dụng chung bởi PRD-1474 và 3116_A06, được đứng trước bởi trình tự kéo dài đầu tận cùng N (GVSDVPRDL) và theo sau bởi đầu tận cùng C (EI)] hoặc SEQ ID NO.331 [trình tự adnectin lõi của PRD-1474 và 3116_A06 không có trình tự chỉ huy tận cùng N hoặc đầu tận cùng C]. Trình tự adnectin lõi của PRD-1474 và 3116_A06 được xác định dưới đây:

EVVAATPTSLLISWSLPHQGKANYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGL KPGVDYTITVYAVTVTDTGYLKYKPISINYRT (SEQ ID NO.331)

Theo một phương án khác nữa, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% so với các vùng vòng không phải BC, DE, và FG của trình tự SEQ ID NO.118, 273, 281, hoặc 331.

Theo một phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế và được mô tả trong bản mô tả này có thể được mô tả liên quan đến adnectin kháng myostatin chứa các vòng BC, vòng DE, và vòng FG như được xác định trong các SEQ ID NO.34, 39, và 75.

Do đó, theo một số phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa các vòng BC, vòng DE, và vòng FG như được xác định lần lượt trong các SEQ ID NO.34, 39, và 75, trong đó vòng BC chứa 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 thay thế axit amin, như các thay thế axit amin bảo thủ. Do đó, theo một số phương án, vòng BC được xác định bởi trình tự liên ứng X_{33}-L-P-X_{34}-X_{35}-X_{36}-X_{37}-X_{38}-X_{39}, trong đó X_{33} là T hoặc Y; X_{34} là Y, N, R, F, G, S, hoặc T; X_{35} là A, P, S, F, H, N, hoặc R; X_{36} là A; X_{37} là H, L, R, V, N, D, F, hoặc I; X_{38} là L, G, M, F, I, hoặc V; và X_{39} là H.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa các vòng BC, vòng DE, và vòng FG như được xác định lần lượt trong các SEQ ID NO.34, 39, và 75, trong đó vòng DE chứa 1 thay thế axit amin, như thay thế axit amin bảo thủ. Do đó, theo một số phương án, vòng DE được xác định bởi trình tự liên ứng G-R-G-X_{40}, trong đó X_{40} là L.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa các vòng BC, vòng DE, và vòng FG như được xác định lần lượt trong các SEQ ID NO.34, 39, và 75, trong đó vòng FG chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 thay thế axit amin, như các thay thế axit amin bảo thủ. Do đó, theo một số phương án, vòng FG được xác định bởi trình tự liên ứng X_{41}-X_{42}-X_{43}-X_{44}-X_{45}-X_{46}-X_{47}-X_{48}-X_{49}-X_{50}, trong đó X_{41} là L hoặc I; X_{42} là S; X_{43} là K, R, A, G, S, H, N, T, hoặc P; X_{44} là S, A, E, H, K, hoặc N; X_{45} là K, Q, D, E, N, T, hoặc S; X_{46} là V, I, F, L, M, P, hoặc T; X_{47} là I hoặc Y; X_{48} là H, I, V, L, R, F, G, S, hoặc T; X_{49} là H; và X_{50} là M, L, R, hoặc V.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa các vòng BC, vòng DE, và vòng FG như được xác định lần lượt trong các SEQ ID NO.34, 39, và 75, trong đó vòng BC có 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 thay thế axit amin, như các thay thế axit amin bảo thủ, và vòng DE có 1 thay thế axit amin, như thay thế axit amin bảo thủ. Theo một số phương án, vòng BC có trình tự axit amin có công thức X_{33}-L-P-X_{34}-X_{35}-X_{36}-X_{37}-X_{38}-X_{39}, trong đó X_{33} là T hoặc Y; X_{34} là Y, N, R, F, G, S, hoặc T; X_{35} là A, P, S, F, H, N, hoặc R; X_{36} là A; X_{37} là H, L, R, V, N, D, F, hoặc I; X_{38} là L, G, M, F, I, hoặc V; và X_{39} là H, và vòng DE có trình tự axit amin có công thức G-R-G-X_{40}, trong đó X_{40} là L.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa các vòng BC, vòng DE, và vòng FG như được xác định lần lượt trong các SEQ ID NO.34, 39, và 75, trong đó vòng BC có 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 thay thế axit amin, như các thay thế axit amin bảo thủ, và vòng FG có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 thay thế axit amin, như các thay thế axit amin bảo thủ. Theo một số phương án, vòng BC chứa trình tự axit amin có công thức X_{33}-L-P-X_{34}-X_{35}-X_{36}-X_{37}-X_{38}-X_{39}, trong đó X_{33} là T hoặc Y; X_{34} là Y, N, R, F, G, S, hoặc T; X_{35} là A, P, S, F, H, N, hoặc R; X_{36} là A; X_{37} là H, L, R, V, N, D, F, hoặc I; X_{38} là L, G, M, F, I, hoặc V; và X_{39} là H, và vòng FG chứa trình tự axit amin có công thức X_{41}-X_{42}-X_{43}-X_{44}-X_{45}-X_{46}-X_{47}-X_{48}-X_{49}-X_{50}, trong đó X_{41} là L hoặc I; X_{42} là S; X_{43} là K, R, A, G, S, H, N, T, hoặc P; X_{44} là S, A, E, H, K, hoặc N; X_{45} là K, Q, D, E, N, T, hoặc S; X_{46} là V, I, F, L, M, P, hoặc T; X_{47} là I hoặc Y; X_{48} là H, I, V, L, R, F, G, S, hoặc T; X_{49} là H; và X_{50} là M, L, R, hoặc V.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa các vòng BC, vòng DE, và vòng FG như được xác định lần lượt trong các SEQ ID NO. 34, 39, và 75, trong đó vòng DE có 1 thay thế axit amin, như thay thế axit amin bảo thủ, và vòng FG có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 thay thế axit amin, như các thay thế axit amin bảo thủ. Theo một số phương án, vòng DE chứa trình tự axit amin có công thức G-R-G-X_{40}, trong đó X_{40} là L, và vòng FG có trình tự axit amin có công thức X_{41}-X_{42}-X_{43}-X_{44}-X_{45}-X_{46}-X_{47}-X_{48}-X_{49}-X_{50}, trong đó X_{41} là L hoặc I; X_{42} là S; X_{43} là K, R, A, G, S, H, N, T, hoặc P; X_{44} là S, A, E, H, K, hoặc N; X_{45} là K, Q, D, E, N, T, hoặc S; X_{46} là V, I, F, L, M, P, hoặc T; X_{47} là I hoặc Y; X_{48} là H, I, V, L, R, F, G, S, hoặc T; X_{49} là H; và X_{50} là M, L, R, hoặc V.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa các vòng BC, vòng DE, và vòng FG như được xác định lần lượt trong các SEQ ID NO. 34, 39, và 75, trong đó vòng BC có 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 thay thế axit amin, như các thay thế axit amin bảo thủ, và vòng DE có 1 thay thế axit amin, như thay thế axit amin bảo thủ, và vòng FG có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 thay thế axit amin, như các thay thế axit amin bảo thủ. Theo một số phương án, vòng BC chứa trình tự axit amin có công thức X_{33}-L-P-X_{34}-X_{35}-X_{36}-X_{37}-X_{38}-X_{39}, trong đó X_{33} là T hoặc Y; X_{34} là Y, N, R, F, G, S, hoặc T; X_{35} là A, P, S, F, H, N, hoặc R; X_{36} là A; X_{37} là H, L, R, V, N, D, F, hoặc I; X_{38} là L, G, M, F, I, hoặc V; và X_{39} là H; vòng DE chứa trình tự axit amin có công thức G-R-G-X_{40}, trong đó X_{40} là L; và vòng FG có trình tự axit amin có công thức X_{41}-X_{42}-X_{43}-X_{44}-X_{45}-X_{46}-X_{47}-

X_{48}-X_{49}-X_{50}, trong đó X_{41} là L hoặc I; X_{42} là S; X_{43} là K, R, A, G, S, H, N, T, hoặc P; X_{44} là S, A, E, H, K, hoặc N; X_{45} là K, Q, D, E, N, T, hoặc S; X_{46} là V, I, F, L, M, P, hoặc T; X_{47} là I hoặc Y; X_{48} là H, I, V, L, R, F, G, S, hoặc T; X_{49} là H; và X_{50} là M, L, R, hoặc V.

Theo một phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa các vòng BC, vòng DE, và vòng FG như được xác định lần lượt trong các SEQ ID NO.34, 39, và 75, và có các thay thế axit amin trong các vòng BC, vòng DE, và vòng FG cho phép adnectin kháng myostatin này duy trì gắn kết với myostatin. Các thay thế axit amin như vậy có thể được xác định bằng cách, ví dụ, quét đột biến sâu, như được mô tả trong ví dụ 8.

Do đó, theo một số phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa vòng BC chứa trình tự axit amin có công thức X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}, trong đó: X_{51} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{52} được chọn từ nhóm bao gồm L, M, và V; X_{53} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, và Y; X_{54} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{55} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{56} được chọn từ nhóm bao gồm G và S; X_{57} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{58} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, G, L, M, S, và T; và X_{59} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, H, N, P, Q, R, S, và Y. Theo một phương án ưu tiên, X_{51} được chọn từ nhóm bao gồm C, F, I, S, V, W, và Y; X_{52} được chọn từ nhóm bao gồm L; X_{53} được chọn từ nhóm bao gồm P; X_{54} được chọn từ nhóm bao gồm C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{55} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{56} được chọn từ nhóm bao gồm G; X_{57} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, và Y; X_{58} được chọn từ nhóm bao gồm A, G, L, M, và S; và X_{59} được chọn từ nhóm bao gồm C, H, N, Q, S, và Y. Theo một phương án được ưu tiên hơn, X_{51} được chọn từ nhóm bao gồm F, S, và W; X_{52} được chọn từ nhóm bao gồm L; X_{53} được chọn từ nhóm bao gồm P; X_{54} được chọn từ nhóm bao gồm C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W, và Y; X_{55} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, và Y; X_{56} được chọn từ nhóm bao gồm G; X_{57} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, H, K, L, M, N, R, V, W, và Y; X_{58} được chọn từ nhóm bao gồm A, G, và L; và X_{59} được chọn từ nhóm bao gồm H, N, và Q.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế bao gồm vòng DE chứa trình tự axit amin có công thức G-R-G-X_{60}, trong đó X_{60} là A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T, và V. Theo một phương án ưu tiên, X_{60} là C, E, I, L, M, Q, T, và V. Theo một phương án được ưu tiên hơn, X_{60} là C, E, I, L, M, và V.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế bao gồm vòng FG chứa trình tự axit amin có công thức X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}, trong đó X_{61} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W, và Y; X_{62} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{63} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{64} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{65} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{66} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W, và Y; X_{67} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{68} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{69} được chọn từ nhóm bao gồm F, W, và Y; và X_{70} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y. Theo một phương án ưu tiên, X_{61} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, I, L, M, và V; X_{62} được chọn từ nhóm bao gồm C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{63} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, và Y; X_{64} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{65} được chọn từ nhóm bao gồm A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, và Y; X_{66} được chọn từ nhóm bao gồm C, F, I, L, M, P, T, V, W, và Y; X_{67} được chọn từ nhóm bao gồm C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, và Y; X_{68} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{69} được chọn từ nhóm bao gồm W và Y; và X_{70} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, và V. Theo một phương án được ưu tiên hơn, X_{61} được chọn từ nhóm bao gồm I và V; X_{62} được chọn từ nhóm bao gồm C, F, I, L, M, T, V, W, và Y; X_{63} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, và V; X_{64} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, và Y; X_{65} được chọn từ nhóm bao gồm A, G, S, T, và W; X_{66} được chọn từ nhóm bao gồm F, I, V, W, và Y; X_{67} được chọn từ nhóm bao gồm F, H, I, L, M, V, W, và Y; X_{68} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, G, I, K, L, M, T, V, và W; X_{69} được chọn từ nhóm bao gồm W và Y; và X_{70} được chọn từ nhóm bao gồm A, G, K, L, M, P, Q, và R.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin theo sáng chế bao gồm các vòng BC, vòng DE, và vòng FG, trong đó vòng BC chứa trình tự axit amin có công thức X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}, trong đó, X_{51} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{52} được chọn từ nhóm bao gồm L, M, và V; X_{53} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, và Y; X_{54} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{55} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{56} được chọn từ nhóm bao gồm G và S; X_{57} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{58} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, G, L, M, S, và T; và X_{59} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, H, N, P, Q, R, S, và Y; vòng DE chứa trình tự axit amin có công thức G-R-G-X_{60}, trong đó X_{60} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T, và V; và vòng FG chứa trình tự axit amin có công thức X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}, trong đó X_{61} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W, và Y; X_{62} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{63} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{64} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{65} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{66} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W, và Y; X_{67} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{68} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{69} được chọn từ nhóm bao gồm F, W, và Y; và X_{70} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y.

Theo một phương án ưu tiên, adnectin kháng myostatin theo sáng chế bao gồm các vòng BC, vòng DE, và vòng FG, trong đó vòng BC chứa trình tự axit amin có công thức X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}, trong đó, X_{51} được chọn từ nhóm bao gồm C, F, I, S, V, W, và Y; X_{52} là L; X_{53} là P; X_{54} được chọn từ nhóm bao gồm C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{55} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{56} là G; X_{57} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, và Y; X_{58} được chọn từ nhóm bao gồm A, G, L, M, và S; và X_{59} được chọn từ nhóm bao gồm C, H, N, Q, S, và Y; vòng DE chứa trình tự axit amin có công thức G-R-G-X_{60}, trong đó X_{60} được chọn từ nhóm bao gồm C, E, I, L, M,

Q, T, và V; và vòng FG chứa trình tự axit amin có công thức X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}, trong đó X_{61} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, I, L, M, và V; X_{62} được chọn từ nhóm bao gồm C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{63} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, và Y; X_{64} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{65} được chọn từ nhóm bao gồm A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, và Y; X_{66} được chọn từ nhóm bao gồm C, F, I, L, M, P, T, V, W, và Y; X_{67} được chọn từ nhóm bao gồm C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, và Y; X_{68} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y; X_{69} được chọn từ nhóm bao gồm W và Y; và X_{70} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y.

Theo một phương án được ưu tiên hơn, adnectin kháng myostatin theo sáng chế bao gồm các vòng BC, vòng DE, và vòng FG, trong đó vòng BC chứa trình tự axit amin có công thức X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}, trong đó, X_{51} được chọn từ nhóm bao gồm F, S, và W; X_{52} là L; X_{53} là P; X_{54} được chọn từ nhóm bao gồm C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W, và Y; X_{55} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, và Y; X_{56} là G; X_{57} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, H, K, L, M, N, R, V, W, và Y; X_{58} được chọn từ nhóm bao gồm A, G, và L; và X_{59} được chọn từ nhóm bao gồm H, N, và Q; vòng DE chứa trình tự axit amin có công thức G-R-G-X_{60}, trong đó X_{60} được chọn từ nhóm bao gồm C, E, I, L, M, và V; và vòng FG chứa trình tự axit amin có công thức X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}, trong đó X_{61} được chọn từ nhóm bao gồm I và V; X_{62} được chọn từ nhóm bao gồm C, F, I, L, M, T, V, W, và Y; X_{63} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, và V; X_{64} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, và Y; X_{65} được chọn từ nhóm bao gồm A, G, S, T, và W; X_{66} được chọn từ nhóm bao gồm F, I, V, W, và Y; X_{67} được chọn từ nhóm bao gồm F, H, I, L, M, V, W, và Y; X_{68} được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, G, I, K, L, M, T, V, và W; X_{69} được chọn từ nhóm bao gồm W và Y; và X_{70} được chọn từ nhóm bao gồm A, G, K, L, M, P, Q, và R.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic như được xác định bởi trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.124-167, 240-251, và 284-305 (các trình tự có chiều dài đầy đủ từ các bảng 2, 5, và 6). Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít

nhất bằng 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.124-167, 240-251, và 284-305.

Fibronectin gắn kết tự nhiên với một số loại integrin thông qua cấu trúc gắn kết integrin của nó, "arginin-glyxin-axit aspartic" (RGD). Theo một số phương án, polypeptit này chứa miền ^{10}Fn3 không có cấu trúc gắn kết integrin (RGD). Miền gắn kết integrin có thể được loại bỏ bằng cách thay đổi trình tự RGD bằng cách thay thế, mất đoạn hoặc xen đoạn axit amin.

Theo một số phương án, các trình tự axit amin của vòng BC, DE và/hoặc FG lần lượt giống với phần được gạch chân của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.7-38, 39-45, và 46-79, như được thể hiện trong bảng 1, được ghép vào trong khung protein không có miền ^{10}Fn3. Ví dụ, một hoặc nhiều trình tự axit amin vòng được trao đổi hoặc được cài xen vào trong một hoặc nhiều vòng CDR của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh của chúng. Theo các phương án khác, miền protein mà một hoặc nhiều trình tự axit amin vòng được trao đổi hoặc được cài xen vào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, miền Fn3 liên ứng (Centocor ,US), protein lặp ankyrin (Molecular Partners AG, Zurich Switzerland), các kháng thể miền (Domantis, Ltd, Cambridge, MA), kháng thể nano đơn miền của lạc đà (Ablynx, Belgium), Lipocalin (ví dụ, anticalin; Pieris Proteolab AG, Freising, Germany), Avimer (Amgen, CA), affibody (Affibody AG, Sweden), ubiquitin (ví dụ, affilin; Scil Proteins GmbH, Halle, Germany), chất giả epitop protein (Polyphor Ltd, Allschwil, Switzerland), khung bó xoắn (ví dụ, alphabody, Complix, Belgium), miền SH3 của Fyn (Covagen AG, Switzerland), hoặc atrimer (Anaphor, Inc., CA).

Các SEQ ID NO của các vòng BC, DE và FG của các adnectin kháng myostatin theo sáng chế được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

Vòng BC, vòng DE, và vòng FG của adnectin kháng myostatin						
	Trình tự vòng					
Dòng	Vòng BC	SEQ ID NO.	Vòng DE	SEQ ID NO.	Vòng FG	SEQ ID NO.
1979_B06	SWSLPHAGHVN	7	PGRGVT	39	TLTKSQMIHYMP	46
2062_G02	SWVSPRGRAR	8	PGRGST	40	TIYRDGMSHHDP	47
2522_C09	SWEVPRGLAR	9	LGRGST	41	TVYRDGPLLLAP	48
2523_G06	SWWAPLGLAR	10	PGRGST	40	TIFRTGMVQYDP	49
2524_C11	SWTLPHAGLAH	11	PGRGVT	39	TLTNSEIILYKP	50
2524_D09	SWYLPYPAHMN	12	PGRGLT	42	TLTKSQILHHRP	51
2524_E10	SWSLPFAGHLN	13	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2524_H05	SWSLPYSGLAN	14	PGRGVT	39	TLTHSNIIRYVP	53
2524_H11	SWSLPHAGHAH	15	PGRGVT	39	TVSSTKVIVYLP	54
2525_B01	SWTLPNFGLIN	16	PGRGVT	39	TITKSTIIIYKP	55
2525_D02	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TVTTTSVILYKP	56
2525_D05	SWSLPYAGHLN	18	PGRGVT	39	TLTKSQLIHYMP	57
2525_F07	SWSLPYAAHMN	19	PGRGVT	39	TLTRSQVIHYMP	58
2987_A06	SWSLPHAGHAH	15	PGRGVT	39	TLTKSKIIHYMP	59
2987_B04	SWSLPYPGHLN	20	PGRGVT	39	TLTKSKIIHYMP	59
2987_B09	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2987_C02	SWSLPYAGHAH	21	PGRGVT	39	TLTKSKIIHYMP	59
2987_D05	SWSLPHAGHAH	15	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2987_E03	SWSLPYPGHLN	20	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2987_E08	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TVSSTKVIHYKP	60
2987_F01	SWSLPYAGHAH	21	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2987_F06	SWSLPHAGHAH	15	PGRGVT	39	TLTKSKVIHYMP	61
2987_G04	SWSLPYPGHLN	20	PGRGVT	39	TLTKSKVIHYMP	61
2987_G09	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TVSSTKVIVYLP	54
2987_H02	SWSLPYAGHAH	21	PGRGVT	39	TLTKSKVIHYMP	61
2987_H07	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TVTTTKVIHYKP	62
3006_A10	SWDAPGGLAR	22	IGRGST	43	TIDRDGVNHFAP	63
3007_B08	SWSLPTPGLAH	23	PGRGVT	39	TVTHHGVIGYKP	64
3007_C09	SWSLPHRGVAN	24	PGRGVT	39	TLTGANVIIYKP	65
3007_C10	SWSLPSSGVAH	25	PGRGVT	39	TVTNTGVIIYKP	66
3008_A03	SWSLPHHGFGH	26	PGRGVT	39	TVTATGIIIYKP	67
3008_B08	SWSLPHAGDAH	27	PGRGVT	39	TVTRAGFYRYKP	68
3008_D04	SWSLPHNGVAH	28	PGRGVT	39	TVTREEVISYKP	69
3008_F01	SWSLPRQGLAN	29	PGRGVT	39	TVTAAGVIIYKP	70
3008_G01	SWSLPGPGHFH	30	PGRGVT	39	TVTANQPIIYKP	71
3008_G03	SWSLPHPGLGH	31	PGRGVT	39	TITPETIIVYKP	72
3115_D04	SWDAPRGLAR	32	FGRGTT	44	TIDRDGTRSFDP	73
3115_E06	SWDAPAGLAR	33	VGRGNT	45	TIFRDGPVTWDP	74
3116_A06	SWSLPHQGKAN	34	PGRGVT	39	TVTDTGYLKYKP	75
3116_A07	SWDAPKGLAR	35	VGRGNT	45	TIFRDGPVTWDP	74
3116_C01	SWSLPNPGIAH	36	PGRGVT	39	TLTGSDTIFYKP	76
3116_C06	SWSLPRPGNAH	37	PGRGVT	39	TVTGKDVIKYKP	77
3116_H06	SWDAPAGLAR	33	VGRGNT	45	TIFRDGVVNYGP	78
3146_A08	SWSLPNPGNAH	38	PGRGVT	39	TVTDTGFITYKP	79

Các SEQ ID NO. của các monoadnectin kháng myostatin theo sáng chế được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

Monoadnectin kháng myostatin		
	Trình tự	
	Trình tự axit amin	Trình tự axit nucleic
1979_B06 trong bản mô tả này còn được gọi là ATI-1133 (Trình tự 1 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPHAGHVNYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTKSQMIHY MPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.80)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCATGCTGGT CATGTGAACTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTCTG ACTAAATCTCAGATGATCCATTACATGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.124)
2062_G02 trong bản mô tả này còn được gọi là ATI-1134 (Trình tự 2 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWVSPRGRARYYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGSTATISGLKP GVDYTITVYAVTIYRDGMSHHD PISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.81)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGGTTTCTCCGCGTGGTCGT GCTCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAA ACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGCCTGGTCGTGGTTCTACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCTAC CGTGACGGTATGTCTCATCATGACCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAA CCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.125)
2522_C09 (Trình tự 3 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWEVPRGLARYYRITYGETGGN SPVQEFTVLGRGSTATISGLKP GVDYTITVYAVTVYRDGPLLLA PISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.82)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGGAAGTGCCGCGTGGCCTA GCTCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAA ACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGCTTGGTCGTGGTTCTACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTGTAC CGTGACGGGCCGTTGCTTCTTGCCCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAA CCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.126)

2523_G06 (Trình tự 4 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWWAPLGLARYYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGSTATISGLKP GVDYTITVYAVTIFRTGMVQYD PISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.83)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTGGGCCCCGCTGGGTCTT GCTCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAA ACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGCCTGGTCGGGGCTCTACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCTTC CGTACGGGCATGGTTCAATATGACCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAA CCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.127)
2524_C11 (Trình tự 5 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWTLPHAGLAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTNSEIILY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.84)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGACTCTGCCGCATGCTGGT CTTGCGCACTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTCTG ACTAATTCTGAGATTATCCTTTACAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.128)
2524_D09 (Trình tự 6 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWYLPYPAHMNYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGLTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTKSQILHH RPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.85)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTACCTCCCGTATCCTGCG CATATGAACTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGGCGGGGTCTGACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTCTG ACAAAATCTCAGATTCTCCATCATAGGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.129)
2524_E10 (Trình tự 7 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPFAGHLNYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTRSKIIHY MPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.86)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCATTGCCGTTTGCTGGT CATTTGAACTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTCTG ACTCGCTCTAAGATTATTCATTATATGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.130)

2524_H05 (Trình tự 8 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPYSGLANYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTHSNIIRY VPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.87)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCTTATTCTGGC CTTGCGAACTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGGGTTACAGCT ACTATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTCTG ACTCACTCTAATATAATTCGATACGTGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.131)
2524_H11 (Trình tự 9 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPHAGHAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVSSTKVIVY LPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.88)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCCCTACCGCATGCGGGT CATGCGCACTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGAGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTG TCTAGTACAAAGGTGATAGTTTACCTGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.132)
2525_B01 (Trình tự 10 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWTLPNFGLINYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTITKSTIIIY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.89)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGACTTTGCCGAATTTCGGT CTTATTAATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATC ACCAAATCTACTATCATCATTTACAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.133)
2525_D02 (Trình tự 11 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWTLPHAGRAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTTTSVILY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.90)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGACTTTGCCGCATGCTGGT CGTGCGCACTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGGCGGGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTG ACGACAACTTCGGTGATCCTTTACAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.134)

2525_D05 (Trình tự 12 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPYAGHLNYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTKSQLIHY MPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.91)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTTCCTTATGCTGGT CATCTAAACTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTGACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTCTG ACTAAGTCTCAGCTGATACATTACATGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.135)
2525_F07 (Trình tự 13 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPYAAHMNYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTRSQVIHY MPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.92)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGTATGCTGCT CACATGAACTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTTTG ACTAGATCACAGGTGATTCATTACATGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.136)
2987_A06 (Trình tự 14 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPHAGHAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTKSKIIHY MPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.93)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGTCACTGCCGCATGCAGGT CATGCACATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCCTG ACCAAAAGCAAAATTATTCATTATATGCCG ATTAGCATTAATTATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO.137)
2987_B04 (Trình tự 15 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPYPGHLNYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTKSKIIHY MPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.94)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATCCGGGT CATCTGAATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCCTG ACCAAAAGCAAAATTATTCATTATATGCCG ATTAGCATTAATTATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO.138)

2987_B09 (Trình tự 16 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWTLPHAGRAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTRSKIIHY MPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.95)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCAGGT CGTGCACATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCCTG ACCCGCAGCAAAATTATTCATTATATGCCG ATTAGCATTAATTATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO.139)
2987_C02 (Trình tự 17 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPYAGHAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTKSKIIHY MPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.96)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATGCAGGT CATGCACATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCCTG ACCAAAAGCAAAATTATTCATTATATGCCG ATTAGCATTAATTATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO.140)
2987_D05 (Trình tự 18 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPHAGHAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTRSKIIHY MPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.97)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGTCACTGCCGCATGCAGGT CATGCACATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCCTG ACCCGCAGCAAAATTATTCATTATATGCCG ATTAGCATTAATTATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO.141)
2987_E03 (Trình tự 19 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPYPGHLNYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTRSKIIHY MPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.98)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATCCGGGT CATCTGAATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCCTG ACCCGCAGCAAAATTATTCATTATATGCCG ATTAGCATTAATTATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO.142)

2987_E08 (Trình tự 20 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWTLPHAGRAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVSSTKVIHY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.99)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCAGGT CGTGCACATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCGTT AGCAGCACCAAAGTGATTCATTATAAACCG ATTAGCATTAATTATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO.143)
2987_F01 (Trình tự 21 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPYAGHAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTRSKIIHY MPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.100)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATGCAGGT CATGCACATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCCTG ACCCGCAGCAAAATTATTCATTATATGCCG ATTAGCATTAATTATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO.144)
2987_F06 (Trình tự 22 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPHAGHAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTKSKVIHY MPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.101)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGTCACTGCCGCATGCAGGT CATGCACATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCCTG ACCAAAAGCAAAGTGATTCATTATATGCCG ATTAGCATTAATTATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO.145)
2987_G04 (Trình tự 23 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPYPGHLNYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTKSKVIHY MPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.102)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATCCGGGT CATCTGAATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCCTG ACCAAAAGCAAAGTGATTCATTATATGCCG ATTAGCATTAATTATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO.146)

2987_G09 (Trình tự 24 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWTLPHAGRAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVSSTKVIVY LPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.103)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCAGGT CGTGCACATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCGTT AGCAGCACCAAAGTTATTGTTTATCTGCCG ATTAGCATTAATTATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO.147)
2987_H02 (Trình tự 25 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPYAGHAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTKSKVIHY MPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.104)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATGCAGGT CATGCACATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCCTG ACCAAAAGCAAAGTGATTCATTATATGCCG ATTAGCATTAATTATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO.148)
2987_H07 (Trình tự 26 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWTLPHAGRAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTTTKVIHY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.105)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCAGGT CGTGCACATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCGTT ACCACCACCAAAGTGATTCATTATAAACCG ATTAGCATTAATTATCGCACCGAAATTGAT AAACCGAGCCAGCATCATCATCACCATCAT (SEQ ID NO.149)
3006_A10 (Trình tự 27 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPGGLARYYRITYGETGGN SPVQEFTVIGRGSTATISGLKP GVDYTITVYAVTIDRDGVNHFA PISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.106	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGGACGCTCCGGGTGGTCTG GCTCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAA ACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGATCGGTCGTGGTAGCACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCGAC CGTGACGGTGTCAACCACTTCGCCCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAA CCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.150)

3007_B08 (Trình tự 28 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPTPGLAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTHHGVIGY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.107)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGACTCCAGGT CTCGCCCATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTC ACTCATCACGGCGTCATCGGCTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.151)
3007_C09 (Trình tự 29 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPHRGVANYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTGANVIIY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.108)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCACCGTGGT GTCGCCAATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTCTC ACTGGAGCGAACGTCATCATCTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.152)
3007_C10 (Trình tự 30 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPSSGVAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTNTGVIIY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.109)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGAGCAGCGGT GTCGCCCATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTC ACTAACACTGGTGTCATCATCTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.153)
3008_A03 (Trình tự 31 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPHHGFGHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTATGIIIY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.110)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCATCACGGT TTCGGCCATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTC ACTGCTACGGGGATCATCATCTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.154)

3008_B08 (Trình tự 32 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPHAGDAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTRAGFYRY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.111)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCACGCCGGT GACGCCCATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTT ACTAGAGCGGGTTTCTACCGCTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.155)
3008_D04 (Trình tự 33 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPHNGVAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTREEVISY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.112)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCATAATGGT GTCGCCCATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTC ACTCGGGAGGAAGTCATCAGCTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.156)
3008_F01 (Trình tự 34 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPRQGLANYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTAAGVIIY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.113)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCGTCAGGGT CTCGCCAATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTC ACTGCTGCTGGGGTCATCATCTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.157)
3008_G01 (Trình tự 35 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPGPGHFHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTANQPIIY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.114)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGGGACCGGGT CACTTCCATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTC ACTGCTAACCAGCCCATCATCTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.158)

3008_G03 (Trình tự 36 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPHPGLGHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTITPETIIVY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.115)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCACCCCGGT CTCGGCCATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATC ACTCCGGAAACGATCATCGTCTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.159)
3115_D04 (Trình tự 37 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPRGLARYYRITYGETGGN SPVQEFTVFGRGTTATISGLKP GVDYTITVYAVTIDRDGTRSFD PISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.116)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGGACGCTCCGAGAGGTCTG GCTCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAA ACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGTTCGGTCGTGGTACCACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCGAC CGTGACGGTACCCGCAGCTTCGACCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAA CCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.160)
3115_E06 (Trình tự 38 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPAGLARYYRITYGETGGN SPVQEFTVVGRGNTATISGLKP GVDYTITVYAVTIFRDGPVTWD PISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.117)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGTCTG GCTCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAA ACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGGTCGGTCGTGGTAACACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCTTC CGTGACGGTCCCGTCACCTGGGACCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAA CCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.161)
3116_A06 (Trình tự 39 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPHQGKANYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTDTGYLKY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.118)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCACCAAGGT AAAGCCAATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTT ACTGATACAGGGTACCTCAAGTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.162)

3116_A07 (Trình tự 40 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPKGLARYYRITYGETGGN SPVQEFTVVGRGNTATISGLKP GVDYTITVYAVTIFRDGPVTWD PISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.119)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGGACGCTCCGAAGGGTCTG GCTCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAA ACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGGTCGGTCGTGGTAACACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCTTC CGTGACGGTCCCGTCACCTGGGACCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAA CCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.163)
3116_C01 (Trình tự 41 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPNPGIAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTGSDTIFY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.120)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGAATCCCGGT ATCGCCCATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTCTC ACTGGCAGTGACACCATCTTCTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.164)
3116_C06 (Trình tự 42 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPRPGNAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTGKDVIKY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.121)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCGGCCGGGT AACGCCCATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTT ACTGGCAAAGATGTCATCAAGTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.165)
3116_H06 (Trình tự 43 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPAGLARYYRITYGETGGN SPVQEFTVVGRGNTATISGLKP GVDYTITVYAVTIFRDGVVNYG PISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.122)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGTCTG GCTCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAA ACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGGTCGGTCGTGGTAACACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCTTC CGTGACGGTGTCGTCAACTACGGCCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAA CCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.166)

3146_A08 (Trình tự 44 của lõi adnectin có trình tự đầu tận AdNT1 (được gạch chân) và AdCT1 (in nghiêng) với trình tự đánh dấu His6)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPNPGNAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTDTGFITY KPISINYRT*EIDKPSQ*HHHHHH (SEQ ID NO.123)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGAATCCGGGT AACGCCCATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTT ACTGACACAGGTTTCATCACGTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGAC AAACCATCCCAGCACCATCACCACCACCAC (SEQ ID NO.167)

Các adnectin cạnh tranh chéo và/hoặc adnectin gắn kết với cùng vị trí gắn kết adnectin

Theo một phương án, các adnectin theo sáng chế cạnh tranh (ví dụ, cạnh tranh chéo) để gắn kết với myostatin với các adnectin kháng myostatin cụ thể được mô tả trong bản mô tả này. Các adnectin cạnh tranh như vậy có thể được nhận diện dựa trên khả năng ức chế cạnh tranh gắn kết với myostatin của các adnectin được mô tả trong bản mô tả này trong thử nghiệm gắn kết myostatin chuẩn. Ví dụ, thử nghiệm ELISA chuẩn có thể được sử dụng trong đó protein myostatin tái tổ hợp được giữ cố định trên đĩa, một trong các adnectin được đánh dấu huỳnh quang và khả năng của các adnectin không được đánh dấu để cạnh tranh gắn kết của adnectin được đánh dấu được đánh giá.

Theo một phương án, dạng ELISA cạnh tranh có thể được thực hiện để xác định xem hai adnectin kháng myostatin có gắn kết với các vị trí gắn kết adnectin chồng chéo trên myostatin hay không. Ở một dạng, adnectin #1 được phủ lên trên đĩa, đĩa này sau đó được phong bế và rửa. Bổ sung vào đĩa này myostatin đơn lẻ, hoặc myostatin được ủ trước bằng adnectin #2 nồng độ bão hòa. Sau một khoảng thời gian ủ thích hợp, đĩa này được rửa và được dò bằng kháng thể kháng myostatin đa dòng, như kháng thể đa dòng kháng myostatin của dê được biotin hóa (R&D Systems), tiếp theo phát hiện bằng thể tiếp hợp streptavidin-HRP và quá trình hiện hình bằng tetrametylbenzidin chuẩn. khi tín hiệu OD là giống khi có hoặc không có ủ trước bằng adnectin #2, thì hai adnectin này gắn kết độc lập với nhau, và các vị trí gắn kết adnectin của chúng không chồng chéo. Tuy nhiên, nếu tín hiệu OD của các giếng được nhận hỗn hợp myostatin/adnectin#2 là thấp hơn so với tín hiệu OD của các giếng chỉ nhận myostatin, thì gắn kết của adnectin #2 được khẳng định là phong bế gắn kết của adnectin #1 với myostatin.

Theo cách khác, thử nghiệm tương tự được thực hiện bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR, ví dụ, BIAcore). Adnectin #1 được giữ cố định trên bề mặt chip SPR, tiếp theo tiêm myostatin đơn lẻ hoặc myostatin được ủ trước bằng adnectin #2 nồng độ bão hòa. khi tín hiệu gắn kết của hỗn hợp myostatin/adnectin#2 là giống hoặc cao hơn so với tín hiệu gắn kết của myostatin đơn lẻ, thì hai adnectin này gắn kết độc lập với nhau, và các vị trí gắn kết adnectin của chúng không chồng chéo. Tuy nhiên, nếu tín hiệu gắn kết của hỗn hợp myostatin/adnectin#2 là thấp hơn so với tín hiệu gắn kết của myostatin đơn lẻ, thì việc gắn kết của adnectin #2 được khẳng định là phong bế gắn kết của adnectin #1 với myostatin. Đặc điểm của các thử nghiệm này là việc sử dụng adnectin #2 nồng độ bão hòa. khi myostatin không được bão hòa bằng adnectin #2, thì kết luận nêu trên không có giá trị. Các thử nghiệm tương tự có thể được sử dụng để xác định xem hai protein gắn kết myostatin bất kỳ có gắn kết với các vị trí gắn kết adnectin chồng chéo hay không.

Cả hai thử nghiệm được minh họa trên đây cũng có thể được thực hiện theo thứ tự đảo ngược trong đó adnectin#2 được giữ cố định và myostatin -adnectin#1 được bổ sung vào đĩa. Theo cách khác, adnectin #1 và/hoặc #2 có thể được thay thế bằng kháng thể đơn dòng và/hoặc protein dung hợp Fc-thụ thể hòa tan.

Theo một phương án khác, việc cạnh tranh có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm kẹp HTRF, như được mô tả trong ví dụ 4.

Theo các phương án khác, adnectin cạnh tranh là adnectin gắn kết với cùng vị trí gắn kết adnectin trên myostatin như adnectin kháng myostatin cụ thể được mô tả trong bản mô tả này. Các kỹ thuật lập bản đồ chuẩn, như lập bản đồ proteaza, phân tích đột biến, tinh thể học tia x và cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều, có thể được sử dụng để xác định xem adnectin có gắn kết với cùng vị trí gắn kết adnectin như adnectin đối chiếu hay không (xem, ví dụ, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Các adnectin kháng myostatin cạnh tranh dự tuyển có thể ức chế gắn kết của các adnectin kháng myostatin theo sáng chế với myostatin xuống ít nhất 50%, ít nhất 55%, ít nhất 60%, ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99%. Tỷ lệ % cạnh tranh có thể được xác định bằng các phương pháp được mô tả trên đây.

Theo một số phương án, các phân tử cạnh tranh với các adnectin kháng myostatin theo sáng chế không cần phải là adnectin, mà có thể là loại phân tử bất kỳ gắn kết với myostatin, như, nhưng không giới hạn ở, kháng thể, phân tử nhỏ, peptit, và các chất tương tự.

Theo một số phương án, các adnectin theo sáng chế gắn kết với vị trí gắn kết adnectin không liên tục trên myostatin. Theo một số phương án, polypeptit này gắn kết với vùng trong phạm vi các axit amin 55-66 của myostatin (SEQ ID NO.3). Theo một số phương án, polypeptit này gắn kết với vùng trong phạm vi các axit amin 85-101 của myostatin (SEQ ID NO.3). Theo các phương án khác nữa, polypeptit này gắn kết với hai vùng trong phạm vi các axit amin 85-101 và 55-66 của myostatin (SEQ ID NO.3).

Theo một số phương án, polypeptit theo sáng chế không cạnh tranh với ActRIIB để gắn kết với myostatin. Theo một số phương án, polypeptit theo sáng chế cạnh tranh với ALK4 và/hoặc ALK5 để gắn kết với myostatin.

II. Các trình tự kéo dài

Theo một số phương án, các phân tử adnectin kháng myostatin theo sáng chế có thể được biến đổi để chứa trình tự kéo dài đầu tận cùng N và/hoặc kéo dài đầu tận cùng C. Ví dụ, trình tựmg có thể được đặt ở đầu tận cùng N của ^{10}Fn3 được xác định bởi SEQ ID NO.4. M thường sẽ bị tách ra, để lại G ở đầu tận cùng N. Theo cách khác, 10 axit amin đầu tiên của các adnectin kháng myostatin được thể hiện trong Bảng 2 có thể được thay thế bằng trình tự đầu tận cùng N thay thế, trong bản mô tả này được gọi là phần kéo dài đầu tận cùng N, như được thể hiện trong bảng 7. Ngoài ra, M, G hoặcmg cũng có thể được đặt ở đầu tận cùng N với phần kéo dài đầu tận cùng N bất kỳ được thể hiện trong Bảng 7. Các adnectin kháng myostatin được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể chứa các trình tự đầu tận cùng C thay thế, trong bản mô tả này được gọi là các trình tự kéo dài đầu tận cùng C. Ví dụ, các trình tự adnectin kháng myostatin được thể hiện trong Bảng 2 có thể được cắt ở threonin tương ứng với T94 của trình tự SEQ ID NO.4 (tức là, được cắt sau phần INYRT (SEQ ID NO.168) của trình tự). Phiên bản được cắt ngắn như vậy có thể được sử dụng làm các phân tử trị liệu ở dạng cắt ngắn, hoặc phần kéo dài đầu tận cùng C thay thế có thể được bổ sung sau gốc threonin. Các trình tự kéo dài đầu tận cùng C theo sáng chế được thể hiện trong Bảng 7. Các adnectin kháng myostatin theo sáng chế chứa các trình tự kéo dài đầu tận cùng C được thể hiện trong Bảng 2 dưới dạng các SEQ

ID NO.80-123. Ví dụ, SEQ ID NO.80 (dòng 1979_B06) chứa phần kéo dài đầu tận cùng C có trong tự nhiên EIDKPSQ (SEQ ID NO.211) tiếp theo là trình tự đánh dấu His6 (SEQ ID NO.328). Tuy nhiên, cần hiểu rằng trình tự đánh dấu His6 là hoàn toàn tùy chọn.

Theo một số phương án, các trình tự kéo dài đầu tận cùng C (còn được gọi là "đuôi"), chứa các gốc E và D, và có thể có chiều dài nằm trong khoảng từ 8 đến 50, từ 10 đến 30, từ 10 đến 20, từ 5 đến 10, và từ 2 đến 4 axit amin. Theo một số phương án, các trình tự đuôi chứa gốc liên kết trên cơ sở ED trong đó trình tự này chứa các đoạn lặp ED bộ đôi. Theo các phương án theo sáng chế, trình tự đuôi này chứa 2-10, 2-7, 2-5, 3-10, 3-7, 3-5, 3, 4 hoặc 5 đoạn lặp ED. Theo một số phương án, các trình tự đuôi trên cơ sở ED cũng có thể chứa các gốc axit amin bổ sung, ví dụ: EI, EID, ES, EC, EGS, và EGC. Các trình tự này, một phần, dựa trên trình tự đuôi adnectin đã biết, như EIDKPSQ (SEQ ID NO.211), trong đó các gốc D và K đã được loại bỏ. Theo các phương án theo sáng chế, đuôi trên cơ sở ED chứa các gốc E, I hoặc EI trước các đoạn lặp ED.

Theo các phương án khác, các trình tự đầu tận cùng N hoặc C có thể được kết hợp với các trình tự gốc liên kết đã biết (ví dụ, SEQ ID NO.181-227 trong Bảng 4) nếu cần khi thiết kế phân tử dung hợp adnectin kháng myostatin. Theo một số phương án, các trình tự có thể được đặt ở đầu tận cùng C của miền ^{10}Fn3 để tạo thuận lợi cho việc gắn gốc dược động học. Ví dụ, gốc liên kết chứa xystein như GSGC (SEQ ID NO.189) có thể được bổ sung vào đầu tận cùng C để tạo thuận lợi cho việc PEG hóa định hướng vị trí trên gốc xystein. Các adnectin kháng myostatin theo sáng chế bao gồm gốc liên kết chứa xystein được thể hiện trong Bảng 5 dưới dạng các SEQ ID NO.228-239.

III. Các gốc dược động học

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến adnectin kháng myostatin còn chứa gốc dược động học (PK). Dược động học cải thiện có thể được đánh giá theo nhu cầu điều trị bệnh được nhận thấy. Thông thường, mong muốn làm tăng sinh khả dụng và/hoặc tăng thời gian giữa các liều, có thể bằng cách tăng thời gian protein còn khả dụng trong huyết thanh sau khi dùng liều. Trong một số trường hợp, mong muốn cải thiện sự liên tục của nồng độ protein trong huyết thanh theo thời gian (ví dụ, giảm sự chênh lệch nồng độ protein huyết thanh ngay sau khi dùng và ngay trước khi dùng lần kế tiếp). Adnectin kháng myostatin có thể được gắn với nhóm làm giảm mức độ thanh thải của polypeptit ở

động vật có vú (ví dụ, chuột nhắt, chuột cống, hoặc người) xuống lớn hơn hai lần, lớn hơn ba lần, lớn hơn bốn lần hoặc lớn hơn năm lần so với adnectin kháng myostatin chưa được biến đổi. Các thước đo dược động học cải thiện khác có thể bao gồm thời gian bán thải trong huyết thanh, thường được chia thành pha alpha và pha beta. Mỗi hoặc cả hai pha có thể được cải thiện đáng kể bằng cách bổ sung nhóm thích hợp. Ví dụ, gốc PK có thể làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh của polypeptit lên nhiều hơn 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 400, 600, 800, 1000% hoặc hơn nữa so với miền Fn3 đơn lẻ.

Các gốc làm chậm thanh thải protein ra khỏi máu, trong bản mô tả này được gọi là "các gốc PK", bao gồm các nhóm polyoxyalkylen (ví dụ, polyetylen glycol), đường (ví dụ, axit sialic), và các nhóm protein được dung nạp tốt (ví dụ, Fc và các mảnh và các biến thể của nó, transferin, hoặc albumin huyết thanh). Adnectin kháng myostatin cũng có thể được dung hợp với albumin hoặc mảnh (một phần) hoặc biến thể của albumin như được mô tả trong công bố đơn patent của Mỹ số 2007/0048282, hoặc có thể được dung hợp với một hoặc nhiều adnectin gắn kết albumin huyết thanh, như được mô tả trong bản mô tả này.

Các gốc PK khác có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm các nhóm được mô tả trong Kontermann và các đồng tác giả, (*Current Opinion in Biotechnology* 2011;22:868-76), được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Các gốc PK như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thể dung hợp albumin huyết thanh của người, thể tiếp hợp albumin huyết thanh của người, chất gắn kết albumin huyết thanh của người (ví dụ, adnectin PKE, AlbudAb, ABD), thể dung hợp XTEN, thể dung hợp PAS (tức là chất giả PEG tái tổ hợp trên cơ sở ba axit amin prolin, alanin, và serin), thể tiếp hợp hyđrat cacbon (ví dụ, hyđroxyetyl tinh bột (hydroxyethyl starch - HES)), glycosyl hóa, thể tiếp hợp axit polysialic, và thể tiếp hợp axit béo.

Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề cập đến adnectin kháng myostatin được dung hợp với gốc PK là đường polyme. Theo một số phương án, gốc PK là nhóm polyetylen glycol hoặc vùng Fc. Theo một số phương án, gốc PK là protein gắn kết albumin huyết thanh như các protein được mô tả trong công bố đơn patent Mỹ các số 2007/0178082 và 2007/0269422. Theo một số phương án, gốc PK là albumin huyết thanh của người. Theo một số phương án, gốc PK là transferin.

Polyetylen glycol

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin bao gồm polyetylen glycol (PEG). PEG là polyme tan trong nước đã biết, có sẵn trên thị trường hoặc có thể được điều chế bằng cách polyme hóa mở vòng etylen glycol theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161). Thuật ngữ "PEG" được sử dụng rộng rãi bao gồm phân tử polyetylen glycol bất kỳ, mà không quan tâm đến kích thước hoặc sự biến đổi ở đầu của PEG, và có thể được biểu diễn bằng công thức: $X—O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH$, trong đó n bằng từ 20 đến 2300 và X là H hoặc biến đổi đầu tận, ví dụ, C_{1-4} alkyl. PEG có thể còn chứa các nhóm hóa học cần thiết cho các phản ứng gắn kết, thu được từ quá trình tổng hợp hóa học của phân tử; hoặc tác động như phần đệm đối với khoảng cách tối ưu của các phần của phân tử. Ngoài ra, PEG có thể bao gồm một hoặc nhiều chuỗi bên PEG được liên kết với nhau. Các PEG có nhiều hơn một chuỗi PEG được gọi là các PEG nhánh hoặc nhiều nhánh. Các PEG nhánh được mô tả trong, ví dụ, đơn châu Âu số công bố473084A và patent Mỹ số 5,932,462.

Một hoặc nhiều phân tử PEG có thể được gắn ở các vị trí khác nhau trên protein, và việc gắn như vậy có thể đạt được bằng phản ứng với các amin, thiol hoặc các nhóm phản ứng thích hợp khác. Nhóm amin có thể là, ví dụ, amin bậc nhất được tìm thấy ở đầu tận cùng N của polypeptit hoặc nhóm amin có mặt trong axit amin, như lysin hoặc arginin. Theo một số phương án, nhóm PEG được gắn ở vị trí trên polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm: a) đầu tận cùng N; b) giữa đầu tận cùng N và hầu hết sợi beta hoặc sợi giống beta đầu tận cùng N; c) vòng nằm trên bề mặt của polypeptit đối diện với vị trí gắn kết đích; d) giữa đầu tận cùng C và hầu hết sợi beta hoặc sợi giống beta đầu tận cùng C; và e) ở đầu tận cùng C.

Sự PEG hóa có thể đạt được bằng cách PEG hóa định hướng vị trí, trong đó nhóm phản ứng thích hợp được đưa vào protein để tạo ra vị trí mà ở đó sự PEG hóa ưu tiên xảy ra. Theo một số phương án, protein này được biến đổi để đưa gốc xystein vào vị trí mong muốn, cho phép sự PEG hóa định hướng vị trí trên xystein. Các đột biến có thể được đưa vào trình tự mã hóa protein để tạo ra các gốc xystein. Điều này có thể đạt được, ví dụ, bằng cách gây đột biến một hoặc nhiều gốc axit amin thành xystein. Các axit amin được ưu tiên để gây đột biến thành gốc xystein bao gồm serin, threonin, alanin và các gốc thân

nước khác. Tốt hơn nếu, gốc cần gây đột biến thành xystein là gốc được lộ trên bề mặt. Các thuật toán là đã biết trong lĩnh vực để dự đoán khả năng tiếp cận bề mặt của các gốc dựa trên trình tự bậc một hoặc protein. Theo cách khác, các gốc bề mặt có thể được dự đoán bằng cách so sánh các trình tự axit amin của polypeptit gắn kết, do cấu trúc tinh thể của khung mà polypeptit gắn vào được thiết kế và cải tiến, đã được giải quyết (xem Himanen et al., *Nature* 2001;414:933-8) và do đó, các gốc được lộ trên bề mặt được nhận diện. Sự PEG hóa các gốc xystein có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, ví dụ, PEG-maleimit, PEG-vinylsulfon, PEG-iodoaxetamit, hoặc PEG-orthopyridyl đisulfua.

PEG thường được hoạt hóa bằng nhóm hoạt hóa thích hợp phù hợp để tạo cặp vào vị trí mong muốn trên polypeptit. Các phương pháp PEG hóa là đã biết trong lĩnh vực và được mô tả thêm trong Zalipsky, S., et al., "Use of Functionalized Poly(Etylen Glycols) for Modification of Polypeptides" trong Polyetylen Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Plenus Press, New York (1992), và trong Zalipsky (1995) *Advanced Drug Reviews* 16: 157-182.

PEG có thể có khối lượng phân tử thay đổi rộng và có thể ở dạng nhánh hoặc thẳng. Thông thường, khối lượng phân tử trung bình khối của PEG nằm trong khoảng từ 100 dalton đến 150000 dalton. Các khối lượng phân tử trung bình khối theo sáng chế của PEG bao gồm khoảng 20000 dalton, khoảng 40000 dalton, khoảng 60000 dalton và khoảng 80000 dalton. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của PEG bằng 40000 dalton. Các dạng nhánh của PEG có tổng khối lượng phân tử bằng bất kỳ trong số các giá trị nêu trên cũng có thể được sử dụng. Theo một số phương án, PEG có hai nhánh. Theo các phương án khác, PEG có bốn nhánh. Theo một phương án khác, PEG này là bis-PEG (NOF Corporation, DE-200MA), trong đó hai adnectin được tiếp hợp (xem, ví dụ, ví dụ 1 và ATI-1341 của Bảng 5).

Các kỹ thuật tách và tinh chế thông thường đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng để tinh chế các adnectin kháng myostatin được gắn PEG, như sắc ký loại cỡ (ví dụ, lọc gel) và sắc ký trao đổi ion. Các sản phẩm cũng có thể được tách bằng SDS-PAGE. Các sản phẩm mà có thể tách được bao gồm các adnectin được gắn PEG một, hai, ba, nhiều lần và không được gắn PEG, cũng như PEG tự do. Tỷ lệ phần trăm của thể tiếp hợp mono-PEG có thể được kiểm soát bằng cách gộp các phần rộng hơn quanh pic rửa giải để

làm tăng tỷ lệ phần trăm của mono-PEG trong chế phẩm. Khoảng 90% thể tiếp hợp mono-PEG thể hiện sự cân bằng tốt về hiệu suất và hoạt tính.

Theo một số phương án, các adnectin kháng myostatin được gắn PEG tốt hơn nếu sẽ giữ được ít nhất khoảng 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 100% hoạt tính sinh học so với adnectin kháng myostatin chưa được biến đổi. Theo một số phương án, hoạt tính sinh học chỉ khả năng của nó gắn kết với myostatin, như được đánh giá bằng K_D, k_{on}, hoặc k_{off}. Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin được gắn PEG thể hiện sự tăng gắn kết với myostatin so với adnectin kháng myostatin không được gắn PEG.

Các adnectin kháng myostatin được biến đổi bằng PEG theo sáng chế được thể hiện trong Bảng 5.

Miền Fc globulin miễn dịch (và các mảnh)

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin được dung hợp với miền Fc globulin miễn dịch, hoặc mảnh hoặc biến thể của nó. Thuật ngữ "vùng Fc chức năng" là miền Fc hoặc mảnh của nó giữ được khả năng gắn kết với FcRn. Theo một số phương án, vùng Fc chức năng gắn kết với FcRn, nhưng không có chức năng tác động. Khả năng của vùng Fc hoặc mảnh của nó gắn kết với FcRn có thể được xác định bằng các thử nghiệm gắn kết chuẩn đã biết trong lĩnh vực. Theo các phương án khác, vùng Fc hoặc mảnh của nó gắn kết với FcRn và có ít nhất một "chức năng tác động" của vùng Fc nguyên thể. "Chức năng tác động" theo sáng chế bao gồm gắn kết C1q; hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC); gắn kết thụ thể Fc; tính độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC); thực bào; điều chỉnh giảm các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B; BCR (B cell receptor)), v.v. Các chức năng tác động này thường yêu cầu vùng Fc kết hợp với miền gắn kết (ví dụ, adnectin kháng myostatin) và có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực để đánh giá các chức năng tác động của kháng thể.

"Vùng Fc trình tự nguyên thể" bao gồm trình tự axit amin giống với trình tự axit amin của vùng Fc được tìm thấy trong tự nhiên. "Vùng Fc biến thể" bao gồm trình tự axit amin khác với trình tự của vùng Fc trình tự nguyên thể bởi ít nhất một biến đổi axit amin. Tốt hơn nếu, vùng Fc biến thể có ít nhất một thay thế axit amin so với vùng Fc trình tự

nguyên thể hoặc với vùng Fc của polypeptit gốc, ví dụ, từ một đến mười thay thế axit amin, và tốt hơn nếu từ một đến năm thay thế axit amin trong vùng Fc trình tự nguyên thể hoặc trong vùng Fc của polypeptit gốc. Vùng Fc biến thể trong bản mô tả này tốt hơn nếu sẽ có độ độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với vùng Fc trình tự nguyên thể và/hoặc so với vùng Fc của polypeptit gốc, và tốt nhất là có độ độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu có độ độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%.

Theo một phương án theo sáng chế, miền Fc có nguồn gốc từ phân lớp IgG1, tuy nhiên, các phân lớp khác (ví dụ, IgG2, IgG3, và IgG4) cũng có thể được sử dụng. Dưới đây là trình tự của miền Fc globulin miễn dịch IgG1 của người:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO.169)

Trình tự bản lề lõi được gạch chân, và các vùng CH2 và CH3 là ở dạng chữ thường. Cần hiểu rằng lysin đầu tận cùng C là tùy chọn.

Thể dung hợp có thể được tạo ra bằng cách gắn adnectin kháng myostatin với đầu của phân tử Fc, tức là kiểu sắp xếp Fc-adnectin kháng myostatin hoặc adnectin kháng myostatin-Fc. Theo một số phương án, Fc và adnectin kháng myostatin được dung hợp thông qua gốc liên kết. Các trình tự gốc liên kết theo sáng chế bao gồm GAGGGGSG (SEQ ID NO.181), EPKSSD (SEQ ID NO.182), D, ESPKAQASSVPTAQPQAEGLA (SEQ ID NO.183), ELQLEESAAEAQDGELD (SEQ ID NO.184), GQPDEPGGS (SEQ ID NO.185), GGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO.186), ELQLEESAAEAQEGELE (SEQ ID NO.187), GSGSG (SEQ ID NO.188), GSGC (SEQ ID NO.189), AGGGGSG (SEQ ID NO.190), GSGS (SEQ ID NO.191), QPDEPGGS (SEQ ID NO.192), GSGSGS (SEQ ID NO.193), TVAAPS (SEQ ID NO.194), KAGGGGSG (SEQ ID NO.195), KGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO.196), KQPDEPGGS (SEQ ID NO.197), KELQLEESAAEAQDGELD (SEQ ID NO.198), KTVAAPS (SEQ ID NO.199), KAGGGGSGG (SEQ ID NO.200), KGSGSGSGSGSGSG (SEQ ID NO.201), KQPDEPGGSG (SEQ ID NO.202), KELQLEESAAEAQDGELDG (SEQ ID NO.203), KTVAAPSG (SEQ ID NO.204) AGGGGSGG (SEQ ID NO.205), AGGGGSG (SEQ ID

NO.206), GSGSGSGSGSGSG (SEQ ID NO.207), QPDEPGGSG (SEQ ID NO.208), và TVAAPSG (SEQ ID NO.209).

Theo một số phương án, vùng Fc được sử dụng trong thể dung hợp adnectin kháng myostatin bao gồm vùng bản lề của phân tử Fc. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, vùng "bản lề" bao gồm các gốc bản lề lõi trải dài từ các vị trí 1-16 của trình tự SEQ ID NO.169 (DKTHTCPPCPAPELLG; SEQ ID NO.170) của vùng Fc IgG1. Theo một số phương án, thể dung hợp adnectin kháng myostatin-Fc có cấu trúc multime (ví dụ, đime) một phần là do các gốc xystein ở các vị trí 6 và 9 của trình tự SEQ ID NO.169 nằm trong vùng bản lề. Theo các phương án khác, vùng bản lề được sử dụng trong bản mô tả này có thể còn bao gồm các gốc có nguồn gốc từ các vùng CH1 và CH2 nằm bên sườn của trình tự bản lề lõi, như được thể hiện trong SEQ ID NO.169. Theo các phương án khác nữa, trình tự bản lề này là GSTHTCPPCPAPELLG (tức là, trình tự bản lề của PRD-932; SEQ ID NO.180).

Theo một số phương án, trình tự bản lề này, có thể bao gồm các thay thế đem lại các đặc tính dược động học, sinh lý, và/hoặc sinh học mong muốn. Một số trình tự bản lề theo sáng chế bao gồm EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO.171; vùng bản lề lõi được gạch chân), EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO 172; vùng bản lề lõi được gạch chân), EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO.173; vùng bản lề lõi được gạch chân), DKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO.174; vùng bản lề lõi được gạch chân), và DKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO.175; vùng bản lề lõi được gạch chân). Theo một phương án, gốc P ở vị trí 18 của trình tự SEQ ID NO.169 đã được thay thế bằng S để loại bỏ chức năng tác động của Fc; việc thay thế này được minh họa trong các bản lề có trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.172, 173, và 175. Theo một phương án khác, các gốc DK ở các vị trí 1-2 của trình tự SEQ ID NO.169 đã được thay thế bằng GS để loại bỏ vị trí cắt tiềm năng; việc thay thế này được minh họa trong SEQ ID NO.173. Theo một phương án khác, C ở vị trí 103 của trình tự SEQ ID NO.176, tương ứng với vùng ổn định của chuỗi nặng của IgG1 của người (tức là, các miền CH1-CH3), đã được thay thế bằng S để ngăn ngừa sự tạo ra liên kết xystein không đúng khi không có chuỗi nhẹ; việc thay thế này được minh họa trong các SEQ ID NO.171-173.

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA

PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO.176)

Theo một số phương án, thể dung hợp adnectin kháng myostatin-Fc có thể có các cấu hình sau: 1) adnectin kháng myostatin-bản lề-Fc hoặc 2) bản lề-Fc-adnectin kháng myostatin. Do đó, adnectin kháng myostatin bất kỳ theo sáng chế có thể được dung hợp với vùng Fc chứa trình tự bản lề theo các cấu hình này. Theo một số phương án, gốc liên kết có thể được sử dụng để gắn adnectin kháng myostatin với nhóm bản lề-Fc, ví dụ, protein dung hợp theo sáng chế có thể có cấu hình adnectin kháng myostatin-gốc liên kết-bản lề-Fc hoặc bản lề-Fc-gốc liên kết-adnectin kháng myostatin. Ngoài ra, tuỳ thuộc vào hệ trong đó polypeptit dung hợp được tạo ra, trình tự chỉ huy có thể được đặt ở đầu tận cùng N của polypeptit dung hợp. Ví dụ, nếu thể dung hợp này được tạo ra trong hệ của động vật có vú, thì trình tự chỉ huy như METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO.177) có thể được bổ sung vào đầu tận cùng N của phân tử dung hợp. khi thể dung hợp này được tạo ra trong *E. coli*, thì trình tự dung hợp sẽ được đứng trước bởi metionin.

Trình tự sau minh họa cấu trúc adnectin kháng myostatin-bản lề-Fc: **GVSDVPRDL***EVVAATPTSLLISWTLPHAGRAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTA TISGLKPGVDYTITVYAVTVTTTKVIHYKPISINYRT*EIEPKSSDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (PRD-1171; SEQ ID NO.253). Trình tự chỉ huy được in đậm, trình tự của adnectin kháng myostatin được in nghiêng, và vùng bản lề được gạch chân. Cần hiểu rằng lysin đầu tận cùng C là tùy chọn.

Ở đây, miền Fc chứa các vùng CH2 và CH3 IgG1 của người như sau: VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO.178) và trình tự bản lề DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO.170).

Trình tự sau minh họa cấu trúc Fc-adnectin kháng myostatin:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPELQLEES
AAEAQEGELE**GVSDVPRDL***EVVAATPTSLLISWSLPHQGKANYYRITYGETGGNSPVQE*
*FTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTDTGYLKYKPISINYRT*EI (PRD-1474; SEQ ID NO.273). Vùng bản lề được gạch chân, trình tự chỉ huy được in đậm, và trình tự của adnectin kháng myostatin được in nghiêng.

Theo sáng chế, miền Fc chứa các vùng CH2 và CH3 IgG1 của người như sau: VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO.179) và trình tự bản lề DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO.170).

Thể dung hợp adnectin kháng myostatin-Fc và thể dung hợp Fc-adnectin kháng myostatin theo sáng chế được thể hiện trong Bảng 6 (các SEQ ID NO.252-273). Tất cả các trình tự có thể bắt đầu bằng metionin hoặc trình tự chỉ huy của động vật có vú (ví dụ, SEQ ID NO.177).

Các adnectin

Theo một số phương án, gốc PK là một adnectin khác đặc hiệu với, ví dụ, protein huyết thanh (ví dụ, albumin huyết thanh của người), như được mô tả trong US 2012/0094909, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các gốc PK khác có thể được sử dụng với các adnectin theo sáng chế được mô tả trong Kontermann và các đồng tác giả, (*Current Opinion in Biotechnology* 2011;22:868-76), như được bàn luận *nêu trên*. Ví dụ, các gốc PK trên cơ sở adnectin này có thể được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với adnectin kháng myostatin thông qua gốc liên kết polypeptit. Các gốc liên kết thích hợp để nối các miền Fn3 là các gốc liên kết cho phép các miền riêng biệt gấp cuộn một cách độc lập với nhau và tạo ra cấu trúc ba chiều cho phép gắn kết ái lực cao với phân tử đích. Các gốc liên kết polypeptit theo sáng chế bao gồm PSTSTST (SEQ ID NO.210), EIDKPSQ (SEQ ID NO.211), và các gốc liên kết GS, như GSGSGSGSGS (SEQ ID

NO.213) và các multime của chúng. Theo một số phương án, gốc liên kết này là gốc liên kết trên cơ sở glyxin-serin. Các gốc liên kết này chứa các gốc glyxin và serin và có thể có chiều dài nằm trong khoảng từ 8 đến 50, từ 10 đến 30, và từ 10 đến 20 axit amin. Các ví dụ bao gồm các gốc liên kết có trình tự axit amin $(GS)_7$ (SEQ ID NO.215), $G(GS)_6$ (SEQ ID NO.216), và $G(GS)_7G$ (SEQ ID NO.217). Các gốc liên kết khác chứa axit glutamic, và bao gồm, ví dụ, $(GSE)_5$ (SEQ ID NO.218) và GGSEGGSE (SEQ ID NO.219). Các gốc liên kết glyxin-serin theo sáng chế khác bao gồm $(GS)_4$ (SEQ ID NO.212), $(GGGGS)_7$ (SEQ ID NO.220), $(GGGGS)_5$ (SEQ ID NO.221), và $(GGGGS)_3G$ (SEQ ID NO.222). Theo một số phương án, gốc liên kết này là gốc liên kết trên cơ sở glyxin-prolin. Các gốc liên kết này chứa các gốc glyxin và prolin và có thể có chiều dài nằm trong khoảng từ 3 đến 30, từ 10 đến 30, và từ 3 đến 20 axit amin. Các ví dụ bao gồm các gốc liên kết có trình tự axit amin $(GP)_3G$ (SEQ ID NO.223), $(GP)_5G$ (SEQ ID NO.224), và GPG. Theo các phương án khác, gốc liên kết này có thể là gốc liên kết trên cơ sở prolin-alanin có chiều dài nằm trong khoảng từ 3 đến 30, từ 10 đến 30, và từ 3 đến 20 axit amin. Ví dụ về gốc liên kết trên cơ sở prolin alanin bao gồm, ví dụ, $(PA)_3$ (SEQ ID NO.225), $(PA)_6$ (SEQ ID NO.226) và $(PA)_9$ (SEQ ID NO.227). Chiều dài tối ưu của gốc liên kết và thành phần axit amin có thể được xác định bằng thử nghiệm thường quy khi xem xét các chỉ dẫn được cung cấp trong bản mô tả này. Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin được liên kết với, ví dụ, adnectin kháng HSA thông qua gốc liên kết polypeptit có vị trí proteaza có thể phân cắt bởi proteaza trong máu hoặc mô đích. Các phương án như vậy có thể được sử dụng để giải phóng adnectin kháng myostatin để phân phối tốt hơn hoặc nhằm các đặc tính trị liệu hoặc sản xuất hiệu quả hơn.

Các gốc liên kết hoặc các phần đệm bổ sung có thể được đưa vào ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của miền Fn3 giữa miền Fn3 và gốc liên kết polypeptit.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin có thể được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với, ví dụ, adnectin kháng HSA thông qua gốc liên kết polyme. Các gốc liên kết polyme có thể được sử dụng để thay đổi một cách tối ưu khoảng cách giữa mỗi thành phần của thể dung hợp để tạo ra thể dung hợp protein có một hoặc nhiều các đặc tính sau: 1) cản trở không gian gắn kết của một hoặc nhiều miền protein giảm hoặc tăng khi gắn kết với protein cần quan tâm, 2) độ ổn định hoặc độ tan của protein tăng, 3) sự kết tập protein giảm, và 4) ái tính hoặc ái lực tổng cộng của protein tăng.

Theo một số phương án, adnectin kháng myostatin được liên kết với, ví dụ, adnectin kháng HSA, thông qua polyme tương hợp sinh học như đường polyme. Đường polyme này có thể chứa vị trí phân cắt bằng enzym dễ phân cắt bởi enzym trong máu hoặc mô đích. Các phương án như vậy có thể được sử dụng để giải phóng adnectin kháng myostatin để phân phối tốt hơn hoặc nhằm các đặc tính trị liệu hoặc sản xuất hiệu quả hơn.

Tóm tắt của các Monoadnectin và các dạng biến đổi của gốc PK tương ứng của chúng (ví dụ, dạng được gắn PEG và thể dung hợp Fc) được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

Mono-adnectin [a]	**Thể đột biến xystein [biến đổi][b]**	**X-gốc liên kết-Fc[c]**	**Fc-gốc liên kết-X[d]**
1979_B06 (SEQ ID NO.80)	ATI-1107 (SEQ ID NO.229) [40k 2-br]		
2062_G02 (SEQ ID NO.81)	ATI-1106 (SEQ ID NO.228) [40k 2-br]		
2522_C09 (SEQ ID NO.82)			
2523_G06 (SEQ ID NO.83)			
2524_C11 (SEQ ID NO.84)			
2524_D09 (SEQ ID NO.85)	ATI-1275 (SEQ ID NO.231) [NEM]; ATI-1276 (SEQ ID NO.231) [40k 2-br]		
2524_E10 (SEQ ID NO.86)			
2524_H05 (SEQ ID NO.87)			
2524_H11 (SEQ ID NO.88)			
2525_B01 (SEQ ID NO.89)			
2525_D02 (SEQ ID NO.90)	ATI-1267 (SEQ ID NO.230) [NEM]; ATI-1266 (SEQ ID NO.230) [40k 2-br]		
2525_D05 (SEQ ID NO.91)	ATI-1277 (SEQ ID NO.232) [NEM]; ATI-1278 (SEQ ID NO.232) [40k 2-br]		PRD-932 [L1] (SEQ ID NO.252)

Mono-adnectin [a]	Thể đột biến xystein [biến đổi][b]	X-gốc liên kết-Fc[c]	Fc-gốc liên kết-X[d]
2525_F07 (SEQ ID NO.92)			
2987_A06 (SEQ ID NO.93)			
2987_B04 (SEQ ID NO.94)			
2987_B09 (SEQ ID NO.95)			
2987_C02 (SEQ ID NO.96)			
2987_D05 (SEQ ID NO.97)			
2987_E03 (SEQ ID NO.98)			
2987_E08 (SEQ ID NO.99)			
2987_F01 (SEQ ID NO.100)			
2987_F06 (SEQ ID NO.101)			
2987_G04 (SEQ ID NO.102)			
2987_G09 (SEQ ID NO.103)			
2987_H02 (SEQ ID NO.104)			
2987_H07 (SEQ ID NO.105)	ATI-1310 (SEQ ID NO.233) [không]; ATI-1340 (SEQ ID NO.233) [NEM]; ATI-1338 (SEQ ID NO.233) [40k 2-br]; ATI-1359 (SEQ ID NO.233) [không His, 40k 2-br]; ATI-1339 (SEQ ID NO.233) [40k 4-br]; ATI-1341 (SEQ ID NO.233) [20k bis-PEG]	PRD-1171[L2] (SEQ ID NO.253); PRD-1173[L3] (SEQ ID NO.254); PRD-1174[L4] (SEQ ID NO.255)	PRD-1175[L1] (SEQ ID NO.256); PRD-1177[L5] (SEQ ID NO.257); PRD-1178[L6] (SEQ ID NO.258); PRD-1180[L7] (SEQ ID NO.259); PRD-1471[L8] (SEQ ID NO.270)
3006_A10 (SEQ ID			

Mono-adnectin [a]	Thể đột biến xystein [biến đổi][b]	X-gốc liên kết-Fc[c]	Fc-gốc liên kết-X[d]
NO.106)			
3007_B08 (SEQ ID NO.107)			
3007_C09 (SEQ ID NO.108)			
3007_C10 (SEQ ID NO.109)			
3008_A03 (SEQ ID NO.110)			
3008_B08 (SEQ ID NO.111)			
3008_D04 (SEQ ID NO.112)			
3008_F01 (SEQ ID NO.113)			
3008_G01 (SEQ ID NO.114)			
3008_G03 (SEQ ID NO.115)			
3115_D04 (SEQ ID NO.116)	ATI-1375 (SEQ ID NO.235) [40k 2-br]	PRD-1301[L2] (SEQ ID NO.265)	PRD-1284[L5] (SEQ ID NO.260)
3115_E06 (SEQ ID NO.117)	ATI-1376 (SEQ ID NO.236) [40k 2-br]	PRD-1302[L2] (SEQ ID NO.266)	PRD-1285[L5] (SEQ ID NO.261); PRD-1472[L8] (SEQ ID NO.271)
3116_A06 (SEQ ID NO.118)	ATI-1379 (SEQ ID NO.239) [40k 2-br]; ATI-1523 (SEQ ID NO.239) [NEM]	PRD-1305[L2] (SEQ ID NO.269)	PRD-1288[L5] (SEQ ID NO.264); PRD-1474[L8] (SEQ ID NO.273)
3116_A07 (SEQ ID NO.119)	ATI-1377 (SEQ ID NO.237) [40k 2-br]	PRD-1303[L2] (SEQ ID NO.267)	PRD-1286[L5] (SEQ ID NO.262); PRD-1473[L8] (SEQ ID NO.272)
3116_C01 (SEQ ID NO.120)			
3116_C06 (SEQ ID NO.121)			
3116_H06 (SEQ ID			

Mono-adnectin [a]	Thể đột biến xystein [biến đổi][b]	X-gốc liên kết-Fc[c]	Fc-gốc liên kết-X[d]
NO.122)			
3146_A08 (SEQ ID NO.123)	ATI-1378 (SEQ ID NO.238) [40k 2-br]	PRD-1304[L2] (SEQ ID NO.268)	PRD-1287[L5] (SEQ ID NO.263)

[a] Các monoadnectin chưa được biến đổi có trình tự adnectin lõi được đứng trước bởi trình tự kéo dài đầu tận cùng N (MGVSDVPRDL; SEQ ID NO.306) và tiếp theo bởi đầu tận cùng C (EIDKPSQHHHHHH; SEQ ID NO.325), như được thể hiện trong bảng 2. Trình tự adnectin lõi tương ứng với trình tự monoadnectin không có trình tự kéo dài đầu tận cùng N và trình tự đầu tận cùng C.

[b]adnectin có thể đột biến xystein có trình tự adnectin lõi của monoadnectin trong cột thứ nhất, và được đứng trước bởi trình tự kéo dài đầu tận cùng N (MGVSDVPRDL; SEQ ID NO.306) và tiếp theo bởi đầu tận cùng C (GSGC[biến đổi]HHHHHH; SEQ ID NO.326 hoặc EGSGC[biến đổi]HHHHHH; SEQ ID NO.327), như được thể hiện trong bảng 5.

[c]adnectin có nhóm Fc trên đầu tận cùng C có trình tự adnectin lõi của monoadnectin trong cột thứ nhất, được đứng trước bởi trình tự kéo dài đầu tận cùng N (GVSDVPRDL; SEQ ID NO.307) và tiếp theo bởi đầu tận cùng C (EI), đuôi này được tiếp theo bởi trình tự gốc liên kết (Bảng 4) và trình tự vùng Fc, như được mô tả trong Bảng 6.

[d]adnectin có nhóm Fc trên đầu tận cùng N có trình tự vùng Fc được đứng trước bởi trình tự bản lề đầu tận cùng N và tiếp theo bởi gốc liên kết (Bảng 4) và trình tự adnectin lõi của monoadnectin trong cột thứ nhất, bản thân nó được đứng trước bởi trình tự kéo dài đầu tận cùng N (GVSDVPRDL; SEQ ID NO.307) và tiếp theo bởi đầu tận cùng C (EI), như được thể hiện trong bảng 6.

Các SEQ ID NO của các gốc liên kết theo sáng chế được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4

SEQ ID NO.	Gốc liên kết	Trình tự
181	L1	GAGGGGSG
182	L2	EPKSSD
---	L3	D
183	L4	ESPKAQASSVPTAQPQAEGLA
184	L5	ELQLEESAAEAQDGELD
185	L6	GQPDEPGGS
186	L7	GGSGSGSGSGSGS
187	L8	ELQLEESAAEAQEGELE
Các gốc liên kết bổ sung theo sáng chế		
188	L9	GSGSG
189	L10	GSGC
190	L11	AGGGGSG
191	L12	GSGS
192	L13	QPDEPGGS
193	L14	GSGSGS
194	L15	TVAAPS
195	L16	KAGGGGSG
196	L17	KGSGSGSGSGSGS
197	L18	KQPDEPGGS
198	L19	KELQLEESAAEAQDGELD
199	L20	KTVAAPS
200	L21	KAGGGGSGG

SEQ ID NO.	Gốc liên kết	Trình tự
201	L22	KGSGSGSGSGSGSG
202	L23	KQPDEPGGSG
203	L24	KELQLEESAAEAQDGELDG
204	L25	KTVAAPSG
205	L26	AGGGGSGG
206	L27	AGGGGSG
207	L28	GSGSGSGSGSGSG
208	L29	QPDEPGGSG
209	L30	TVAAPSG
210	L31	PSTSTST
211	L32	EIDKPSQ
212	L33	GSGSGSGS
213	L34	GSGSGSGSGS
214	L35	GSGSGSGSGSGS
215	L36	GSGSGSGSGSGSGS
216	L37	GGSGSGSGSGSGS
217	L38	GGSGSGSGSGSGSGSG
218	L39	GSEGSEGSEGSEGSE
219	L40	GGSEGGSE
220	L41	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGS
221	L42	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
222	L43	GGGGSGGGGSGGGGSG
223	L44	GPGPGPG
224	L45	GPGPGPGPGPG
---	L46	GPG
225	L47	PAPAPA
226	L48	PAPAPAPAPAPA
227	L49	PAPAPAPAPAPAPAPAPA

Các SEQ ID NO. của các adnectin kháng myostatin được gắn PEG theo sáng chế được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5

Các adnectin kháng myostatin được gắn PEG		
	Trình tự	
Dòng	Trình tự axit amin	Trình tự axit nucleic
ATI-1106 [40K PEG 2 nhánh]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWVSPRGRARYYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGSTATISGLKP GVDYTITVYAVTIYRDGMSHHD PISINYRTGSGC[Biến đổi]HHHHHH (SEQ ID NO.228)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGGTTTCTCCGCGTGGTCGT GCTCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAA ACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGCCTGGTCGTGGTTCTACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCTAC CGTGACGGTATGTCTCATCATGACCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGGTAGCGGTTGC CACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO.240)

ATI-1107 [40K PEG 2 nhánh]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPHAGHVNYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTKSQMIHY MPISINYRTGSGC[Biến đổi]HHHHHH (SEQ ID NO.229)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCATGCTGGT CATGTGAACTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTCTG ACTAAATCTCAGATGATCCATTACATGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGGTAGCGGT TGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO.241)
ATI-1266 [40K PEG 2 nhánh] ATI-1267 [N-etylmaleimit]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWTLPHAGRAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTTTSVILY KPISINYRTEGSGC[Biến đổi]HHHHHH (SEQ ID NO.230)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGACTTTGCCGCATGCTGGT CGTGCGCACTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGGCGGGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTG ACGACAACTTCGGTGATCCTTTACAAGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGC GGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO.242)
ATI-1275 [N-etylmaleimit] ATI-1276 [40 K PEG 2 nhánh]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWYLPYPAHMNYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGLTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTKSQILHH RPISINYRTEGSGC [Biến đổi]HHHHHH (SEQ ID NO.231)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTACCTCCCGTATCCTGCG CATATGAACTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGGCGGGGTCTGACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTCTG ACAAAATCTCAGATTCTCCATCATAGGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGC GGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO.243)
ATI-1277 [N-etylmaleimit] ATI-1278 [40 K PEG 2 nhánh]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPYAGHLNYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTLTKSQLIHY MPISINYRTEGSGC [Biến đổi]HHHHHH (SEQ ID NO.232)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTTCCTTATGCTGGT CATCTAAACTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTGACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTCTG ACTAAGTCTCAGCTGATACATTACATGCCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGC GGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO.244)

ATI-1310 [Cys tự do] ATI-1338 [40 K PEG 2 nhánh] ATI-1339 [40 K PEG 4 nhánh] ATI-1340 [N-etylmaleimit] ATI-1341 [20K Bis-PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWTLPHAGRAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTTTKVIHY KPISINYRTEGSGC [Biến đổi]HHHHHH (SEQ ID NO.233)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCAGGT CGTGCACATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCGTT ACCACCACCAAAGTGATTCATTATAAACCG ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGC GGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO.245)
ATI-1359 [40 K PEG 2 nhánh]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWTLPHAGRAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTTTKVIHY KPISINYRTEGSGC [Biến đổi]HHHHHH (SEQ ID NO.234)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTG GAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTG CTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCAGGT CGTGCACATTATTATCGTATTACCTATGGT GAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCAGGAA TTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTACCGCA ACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGTGTTGAT TACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCGTT ACCACCACCAAAGTGATTCATTATAAACCG ATTTCCATTAATTACCGAACAGAAGGTAGC GGTTGC (SEQ ID NO.246)
ATI-1375 [40 K PEG 2 nhánh]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPRGLARYYRITYGETGGN SPVQEFTVFGRGTTATISGLKP GVDYTITVYAVTIDRDGTRSFD PISINYRTEGSGC[Biến đổi]HHHHHH (SEQ ID NO.235)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGGACGCTCCGAGAGGTCTG GCTCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAA ACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGTTCGGTCGTGGTACCACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCGAC CGTGACGGTACCCGCAGCTTCGACCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGCGGT TGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO.247)
ATI-1376 [40 K PEG 2 nhánh]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPAGLARYYRITYGETGGN SPVQEFTVVGRGNTATISGLKP GVDYTITVYAVTIFRDGPVTWD PISINYRTEGSGC[Biến đổi]HHHHHH (SEQ ID NO.236)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGTCTG GCTCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAA ACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGGTCGGTCGTGGTAACACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCTTC CGTGACGGTCCCGTCACCTGGGACCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGCGGT TGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO.248)

ATI-1377 [40 K PEG 2 nhánh]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPKGLARYYRITYGETGGN SPVQEFTVVGRGNTATISGLKP GVDYTITVYAVTIFRDGPVTWD PISINYRTEGSGC [Biến đổi]HHHHHH (SEQ ID NO.237)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGGACGCTCCGAAGGGTCTG GCTCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAA ACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGGTCGGTCGTGGTAACACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTAT ACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCTTC CGTGACGGTCCCGTCACCTGGGACCCAATT TCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGCGGT TGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO.249)
ATI-1378 [40 K PEG 2 nhánh]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPNPGNAHYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTDTGFITY KPISINYRTEGSGC [Biến đổi]HHHHHH (SEQ ID NO.238)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGAATCCGGGT AACGCCCATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTT ACTGACACAGGTTTCATCACGTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGC GGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO.250)
ATI-1379 [40 K PEG 2 nhánh] ATI-1523 [N-etylmaleimit]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWSLPHQGKANYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGRGVTATISGLK PGVDYTITVYAVTVTDTGYLKY KPISINYRTEGSGC [Biến đổi]HHHHHH (SEQ ID NO.239)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTG CTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCACCAAGGT AAAGCCAATTATTACCGCATCACTTACGGC GAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGAT TATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTT ACTGATACAGGGTACCTCAAGTACAAACCA ATTTCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGC GGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO.251)

Các SEQ ID NO của các adnectin kháng myostatin được dung hợp Fc theo sáng chế được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6

Các adnectin kháng myostatin được dung hợp Fc					
Trình tự					
Dòng	Trình tự axit amin	Miền đầu tận cùng N	Gốc liên kết	Miền đầu tận cùng C	Trình tự axit nucleic
PRD-932	EPKSSGSTH TCPPCPAPE LLGGSSVFL FPPKPKDTL MISRTPEVT CVVVDVSHE DPEVKFNWY	EPKSSGSTH TCPPCPAPE LLGGSSVFL FPPKPKDTL MISRTPEVT CVVVDVSHE DPEVKFNWY	GAGGGGS G (SEQ ID NO.181)	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WSLPYAGHLNY YRITYGETGGN SPVQEFTVPGR GVTATISGLKP GVDYTITVYAV	GAGCCCAAATCTAGCG GGTCGACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCA CCTGAACTCCTGGGGG GAAGCTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCATGA

	VDGVEVHNA KTKPREEQY NSTYRVVSV LTVLHQDWL NGKEYKCKV SNKALPAPI EKTISKAKG QPREPQVYT LPPSRDELT KNQVSLTCL VKGFYPSDI AVEWESNGQ PENNYKTTP PVLDSDGSF FLYSKLTVD KSRWQQGNV FSCSVMHEA LHNHYTQKS LSLSPGAGG GGSGGVSDV PRDLEVVAA TPTSLLISW SLPYAGHLN YYRITYGET GGNSPVQEF TVPGRGVTA TISGLKPGV DYTITVYAV TLTKSQLIH YMPISINYR TEI (SEQ ID NO.252)	VDGVEVHNA KTKPREEQY NSTYRVVSV LTVLHQDWL NGKEYKCKV SNKALPAPI EKTISKAKG QPREPQVYT LPPSRDELT KNQVSLTCL VKGFYPSDI AVEWESNGQ PENNYKTTP PVLDSDGSF FLYSKLTVD KSRWQQGNV FSCSVMHEA LHNHYTQKS LSLSP (SEQ ID NO.274)		TLTKSQLIHYM PISINYRTEI (SEQ ID NO.282)	TCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACG AAGACCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCC CTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGT ACACCCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTCAGCC TGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGG CTCCTTCTTCCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTC CCGGCGCCGGAGGCGG CGGATCCGGTGGAGTT TCTGATGTGCCGCGCG ACCTGGAAGTGGTTGC TGCCACCCCCACCAGC CTGCTGATCAGCTGGT CTCTTCCTTATGCTGG TCATCTAAACTATTAC CGCATCACTTACGGCG AAACAGGAGGCAATAG CCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGCCTGGTCGTG GTGTGACAGCTACCAT CAGCGGCCTTAAACCT GGCGTTGATTATACCA TCACTGTGTATGCTGT CACTCTGACTAAGTCT CAGCTGATACATTACA TGCCAATTTCCATTAA TTACCGGACCGAAATC (SEQ ID NO.284)

PRD-1171	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWTLPH AGRAHYYRI TYGETGGNS PVQEFTVPG RGVTATISG LKPGVDYTI TVYAVTVTT TKVIHYKPI SINYRTEIE PKSSDKTHT CPPCPAPEL LGGPSVFLF PPKPKDTLM ISRTPEVTC VVVDVSHED PEVKFNWYV DGVEVHNAK TKPREEQYN STYRVVSVL TVLHQDWLN GKEYKCKVS NKALPAPIE KTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRDELTK NQVSLTCLV KGFYPSDIA VEWESNGQP ENNYKTTPP VLDSDGSFF LYSKLTVDK SRWQQGNVF SCSVMHEAL HNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO.253)	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWTLPH AGRAHYYRI TYGETGGNS PVQEFTVPG RGVTATISG LKPGVDYTI TVYAVTVTT TKVIHYKPI SINYRTEI (SEQ ID NO.275)	EPKSSD (SEQ ID NO.182)	KTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLF PPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNA KTKPREEQYNS TYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYK CKVSNKALPAP IEKTISKAKGQ PREPQVYTLPP SRDELTKNQVS LTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTPPV LDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO.283)	GGCGTGAGCGACGTGC CCCGGGATCTAGAAGT GGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCT CCTGGACACTGCCTCA CGCTGGCCGGGCTCAT TACTATAGAATTACCT ACGGGGAGACAGGCGG GAACTCTCCCGTGCAG GAATTCACCGTGCCTG GAAGGGGCGTGACTGC CACCATCAGTGGGCTG AAGCCAGGAGTGGACT ACACAATTACCGTGTA CGCTGTGACTGTGACC ACAACTAAAGTGATCC ACTACAAACCCATCTC TATTAATTATCGGACC GAAATTGAGCCTAAGA GCTCCGACAAAACCCA CACATGCCCACCTTGT CCAGCCCCCGAACTGC TGGGCGGCCCTTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTG CACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCC CCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAA

					TGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGC CTCCCGTGTTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCCGGGAAA (SEQ ID NO.285)
PRD-1173	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWTLPH AGRAHYYRI TYGETGGNS PVQEFTVPG RGVTATISG LKPGVDYTI TVYAVTVTT TKVIHYKPI SINYRTEID KTHTCPPCP APELLGGPS VFLFPPKPK DTLMISRTP EVTCVVVDV SHEDPEVKF NWYVDGVEV HNAKTKPRE EQYNSTYRV VSVLTVLHQ DWLNGKEYK CKVSNKALP APIEKTISK AKGQPREPQ VYTLPPSRD ELTKNQVSL TCLVKGFYP SDIAVEWES NGQPENNYK TTPPVLDSD GSFFLYSKL TVDKSRWQQ GNVFSCSVM HEALHNHYT QKSLSLSPG K (SEQ ID NO.254)	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWTLPH AGRAHYYRI TYGETGGNS PVQEFTVPG RGVTATISG LKPGVDYTI TVYAVTVTT TKVIHYKPI SINYRTEI (SEQ ID NO.275)	D	KTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLF PPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNA KTKPREEQYNS TYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYK CKVSNKALPAP IEKTISKAKGQ PREPQVYTLPP SRDELTKNQVS LTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTPPV LDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO.283)	GGCGTGAGCGACGTGC CCCGGGATCTAGAAGT GGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCT CCTGGACACTGCCTCA CGCTGGCCGGGCTCAT TACTATAGAATTACCT ACGGGGAGACAGGCGG GAACTCTCCCGTGCAG GAATTCACCGTGCCTG GAAGGGGCGTGACTGC CACCATCAGTGGGCTG AAGCCAGGAGTGGACT ACACAATTACCGTGTA CGCTGTGACTGTGACC ACAACTAAAGTGATCC ACTACAAACCCATCTC TATTAATTATCGGACC GAAATTGACAAGACCC ACACATGCCCACCTTG TCCAGCCCCCGAGCTG CTGGGCGGCCCTTCAG TCTTCCTCTTCCCCCC AAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTCACATG CGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGC

					CCCCATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGTTGGACT CCGACGGCTCCTTCTT CCTCTACAGCAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGGGAAA (SEQ ID NO.286)
PRD-1174	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWTLPH AGRAHYYRI TYGETGGNS PVQEFTVPG RGVTATISG LKPGVDYTI TVYAVTVTT TKVIHYKPI SINYRTEIE SPKAQASSV PTAQPQAEG LAKTHTCPP CPAPELLGG PSVFLFPPK PKDTLMISR TPEVTCVVV DVSHEDPEV KFNWYVDGV EVHNAKTKP REEQYNSTY RVVSVLTVL HQDWLNGKE YKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPRE PQVYTLPPS RDELTKNQV SLTCLVKGF YPSDIAVEW ESNGQPENN YKTTPPVLD SDGSFFLYS KLTVDKSRW QQGNVFSCS VMHEALHNH	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWTLPH AGRAHYYRI TYGETGGNS PVQEFTVPG RGVTATISG LKPGVDYTI TVYAVTVTT TKVIHYKPI SINYRTEI (SEQ ID NO.275)	ESPKAQA SSVPTAQ PQAEGLA (SEQ ID NO.183)	KTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLF PPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNA KTKPREEQYNS TYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYK CKVSNKALPAP IEKTISKAKGQ PREPQVYTLPP SRDELTKNQVS LTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTPPV LDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO.283)	GGCGTGAGCGACGTGC CCCGGGATCTAGAAGT GGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCT CCTGGACACTGCCTCA CGCTGGCCGGGCTCAT TACTATAGAATTACCT ACGGGGAGACAGGCGG GAACTCTCCCGTGCAG GAATTCACCGTGCCTG GAAGGGGCGTGACTGC CACCATCAGTGGGCTG AAGCCAGGAGTGGACT ACACAATTACCGTGTA CGCTGTGACTGTGACC ACAACTAAAGTGATCC ACTACAAACCCATCTC TATTAATTATCGGACC GAAATTGAGTCTCCAA AGGCTCAGGCCAGCTC CGTGCCTACCGCTCAG CCACAGGCTGAGGGCC TGGCTAAGACCCACAC ATGCCCCCCTTGTCCA GCTCCCGAACTGCTGG GCGGGCCTTCAGTCTT CCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGT

	YTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO.255)				ACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCCAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGG TGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGT CTCCCGGGAAA (SEQ ID NO.287)
PRD-1175	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP GAGGGGSGG VSDVPRDLE	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO.276)	GAGGGGS G (SEQ ID NO.181)	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WTLPHAGRAHY YRITYGETGGN SPVQEFTVPGR GVTATISGLKP GVDYTITVYAV TVTTTKVIHYK PISINYRTEI (SEQ ID NO.275)	GACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGC

	VVAATPTSL LISWTLPHA GRAHYYRIT YGETGGNSP VQEFTVPGR GVTATISGL KPGVDYTIT VYAVTVTTT KVIHYKPIS INYRTEI (SEQ ID NO.256)				CTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCC GTGTTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCT CCCGGCGCCGGAGGCG GCGGATCCGGTGGCGT GTCCGACGTGCCCCGG GATCTAGAAGTGGTGG CTGCTACCCCCACAAG CTTGCTGATCTCCTGG ACACTGCCTCACGCTG GCCGGGCTCATTACTA TAGAATTACCTACGGG GAGACAGGCGGGAACT CTCCCGTGCAGGAATT CACCGTGCCTGGAAGG GGCGTGACTGCCACCA TCAGTGGGCTGAAGCC AGGAGTGGACTACACA ATTACCGTGTACGCTG TGACTGTGACCACAAC TAAAGTGATCCACTAC AAACCCATCTCTATTA ATTATCGGACCGAAAT C (SEQ ID NO.288)
PRD-1177	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY	ELQLEES AAEAQDG ELD (SEQ ID NO.184)	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WTLPHAGRAHY YRITYGETGGN SPVQEFTVPGR GVTATISGLKP GVDYTITVYAV TVTTTKVIHYK PISINYRTEI (SEQ ID NO.275)	GACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCA

	KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP ELQLEESAA EAQDGELDG VSDVPRDLE VVAATPTSL LISWTLPHA GRAHYYRIT YGETGGNSP VQEFTVPGR GVTATISGL KPGVDYTIT VYAVTVTTT KVIHYKPIS INYRTEI (SEQ ID NO.257)	KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO.276)			AGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCT CCCGAGCTGCAGCTGG AGGAAAGCGCCGCTGA GGCTCAGGACGGAGAA CTGGATGGCGTGAGCG ACGTGCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGCTGCT ACCCCCACAAGCTTGC TGATCTCCTGGACACT GCCTCACGCTGGCCGG GCTCATTACTATAGAA TTACCTACGGGGAGAC AGGCGGGAACTCTCCC GTGCAGGAATTCACCG TGCCTGGAAGGGGCGT GACTGCCACCATCAGT GGGCTGAAGCCAGGAG TGGACTACACAATTAC CGTGTACGCTGTGACT GTGACCACAACTAAAG TGATCCACTACAAACC CATCTCTATTAATTAT CGGACCGAAATT (SEQ ID NO.289)
PRD-1178	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY	GQPDEPG GS (SEQ ID NO.185)	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WTLPHAGRAHY YRITYGETGGN SPVQEFTVPGR GVTATISGLKP GVDYTITVYAV TVTTTKVIHYK PISINYRTEI (SEQ ID NO.275)	GACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGT

	KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP GQPDEPGGS GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWTLPH AGRAHYYRI TYGETGGNS PVQEFTVPG RGVTATISG LKPGVDYTI TVYAVTVTT TKVIHYKPI SINYRTEI (SEQ ID NO.258)	KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO.276)			GGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCT CCCGGCCAGCCCGACG AGCCTGGCGGGAGCGG CGTGAGCGACGTGCCA CGGGATCTAGAAGTGG TGGCTGCTACCCCCAC AAGCTTGCTGATCTCC TGGACACTGCCTCACG CTGGCCGGGCTCATTA CTATAGAATTACCTAC GGGGAGACAGGCGGGA ACTCTCCCGTGCAGGA ATTCACCGTGCCTGGA AGGGGCGTGACTGCCA CCATCAGTGGGCTGAA GCCAGGAGTGGACTAC ACAATTACCGTGTACG CTGTGACTGTGACCAC AACTAAAGTGATCCAC TACAAACCCATCTCTA TTAATTATCGGACCGA AATT (SEQ ID NO.290)

PRD-1180	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP GGSGSGSGS GSGSGVSDV PRDLEVVAA TPTSLLISW TLPHAGRAH YYRITYGET GGNSPVQEF TVPGRGVTA TISGLKPGV DYTITVYAV TVTTTKVIH YKPISINYR TEI (SEQ ID NO.259)	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO.276)	GGSGSGS GSGSGS (SEQ ID NO.186)	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WTLPHAGRAHY YRITYGETGGN SPVQEFTVPGR GVTATISGLKP GVDYTITVYAV TVTTTKVIHYK PISINYRTEI (SEQ ID NO.275)	GACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCT CCCGGCGGCAGCGGGT CTGGATCTGGCAGTGG GAGCGGCTCTGGCGTG AGCGACGTGCCACGGG ATCTAGAAGTGGTGGC TGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCTCCTGGA CACTGCCTCACGCTGG CCGGGCTCATTACTAT AGAATTACCTACGGGG AGACAGGCGGGAACTC TCCCGTGCAGGAATTC ACCGTGCCTGGAAGGG GCGTGACTGCCACCAT CAGTGGGCTGAAGCCA

					GGAGTGGACTACACAA TTACCGTGTACGCTGT GACTGTGACCACAACT AAAGTGATCCACTACA AACCCATCTCTATTAA TTATCGGACCGAAATT (SEQ ID NO.291)
PRD-1284	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP ELQLEESAA EAQDGELDG VSDVPRDLE VVAATPTSL LISWDAPRG LARYYRITY GETGGNSPV QEFTVFGRG TTATISGLK PGVDYTITV YAVTIDRDG TRSFDPISI NYRTEI (SEQ ID NO.260)	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO.276)	ELQLEES AAEAQDG ELD (SEQ ID NO.184)	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WDAPRGLARYY RITYGETGGNS PVQEFTVFGRG TTATISGLKPG VDYTITVYAVT IDRDGTRSFDP ISINYRTEI (SEQ ID NO.277)	GACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCT CCCGAGCTGCAGCTGG AGGAAAGCGCCGCTGA GGCTCAGGACGGAGAA CTGGATGGCGTGAGCG ACGTGCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGCTGCT ACCCCCACAAGCTTGC

					TGATCAGCTGGGACGC TCCGAGAGGTCTGGCT CGATATTACCGCATCA CTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGT TCGGTCGTGGTACCAC AGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGT GTATGCTGTCACTATC GACCGTGACGGTACCC GCAGCTTCGACCCAAT TTCCATTAATTACCGG ACCGAAATT (SEQ ID NO.292)
PRD-1285	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP ELQLEESAA EAQDGELDG VSDVPRDLE VVAATPTSL LISWDAPAG LARYYRITY GETGGNSPV QEFTVVGRG NTATISGLK PGVDYTITV YAVTIFRDG PVTWDPISI NYRTEI (SEQ ID NO.261)	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO.276)	ELQLEES AAEAQDG ELD (SEQ ID NO.184)	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WDAPAGLARYY RITYGETGGNS PVQEFTVVGRG NTATISGLKPG VDYTITVYAVT IFRDGPVTWDP ISINYRTEI (SEQ ID NO.278)	GACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAA

					GAGCCTCTCCCTGTCT CCCGAGCTGCAGCTGG AGGAAAGCGCCGCTGA GGCTCAGGACGGAGAA CTGGATGGCGTGAGCG ACGTGCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGCTGCT ACCCCCACAAGCTTGC TGATCAGCTGGGACGC TCCGGCTGGTCTGGCT CGATATTACCGCATCA CTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGG TCGGTCGTGGTAACAC AGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGT GTATGCTGTCACTATC TTCCGTGACGGTCCCG TCACCTGGGACCCAAT TTCCATTAATTACCGG ACCGAAATT (SEQ ID NO.293)
PRD-1286	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP ELQLEESAA EAQDGELDG VSDVPRDLE VVAATPTSL LISWDAPKG LARYYRITY GETGGNSPV	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO.276)	ELQLEES AAEAQDG ELD (SEQ ID NO.184)	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WDAPKGLARYY RITYGETGGNS PVQEFTVVGRG NTATISGLKPG VDYTITVYAVT IFRDGPVTWDP ISINYRTEI (SEQ ID NO.279)	GACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTA

	QEFTVVGRG NTATISGLK PGVDYTITV YAVTIFRDG PVTWDPISI NYRTEI (SEQ ID NO.262)				CAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCT CCCGAGCTGCAGCTGG AGGAAAGCGCCGCTGA GGCTCAGGACGGAGAA CTGGATGGCGTGAGCG ACGTGCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGCTGCT ACCCCCACAAGCTTGC TGATCAGCTGGGACGC TCCGAAGGGTCTGGCT CGATATTACCGCATCA CTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGG TCGGTCGTGGTAACAC AGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGT GTATGCTGTCACTATC TTCCGTGACGGTCCCG TCACCTGGGACCCAAT TTCCATTAATTACCGG ACCGAAATT (SEQ ID NO.294)
PRD-1287	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV	ELQLEES AAEAQDG ELD (SEQ ID NO.184)	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WSLPNPGNAHY YRITYGETGGN SPVQEFTVPGR GVTATISGLKP GVDYTITVYAV TVTDTGFITYK PISINYRTEI (SEQ ID NO.280)	GACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCC

	MHEALHNHY TQKSLSLSP ELQLEESAA EAQDGELDG VSDVPRDLE VVAATPTSL LISWSLPNP GNAHYYRIT YGETGGNSP VQEFTVPGR GVTATISGL KPGVDYTIT VYAVTVTDT GFITYKPIS INYRTEI (SEQ ID NO.263)	MHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO.276)			CCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCT CCCGAGCTGCAGCTGG AGGAAAGCGCCGCTGA GGCTCAGGACGGAGAA CTGGATGGCGTGAGCG ACGTGCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGCTGCT ACCCCCACAAGCTTGC TGATCAGCTGGTCTCT GCCGAATCCGGGTAAC GCCCATTATTACCGCA TCACTTACGGCGAAAC AGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCACTG TGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGC GGCCTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCAC TGTGTATGCTGTCACT GTTACTGACACAGGTT TCATCACGTACAAACC AATTTCCATTAATTAC CGGACCGAAATT (SEQ ID NO.295)
PRD-1288	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP	ELQLEES AAEAQDG ELD (SEQ ID NO.184)	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WSLPHQGKANY YRITYGETGGN SPVQEFTVPGR GVTATISGLKP GVDYTITVYAV TVTDTGYLKYK PISINYRTEI (SEQ ID NO.281)	GACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCA

	QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP ELQLEESAA EAQDGELDG VSDVPRDLE VVAATPTSL LISWSLPHQ GKANYYRIT YGETGGNSP VQEFTVPGR GVTATISGL KPGVDYTIT VYAVTVTDT GYLKYKPIS INYRTEI (SEQ ID NO.264)	QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO.276)			GTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCT CCCGAGCTGCAGCTGG AGGAAAGCGCCGCTGA GGCTCAGGACGGAGAA CTGGATGGCGTGAGCG ACGTGCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGCTGCT ACCCCCACAAGCTTGC TGATCAGCTGGTCTCT GCCGCACCAAGGTAAA GCCAATTATTACCGCA TCACTTACGGCGAAAC AGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCACTG TGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGC GGCCTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCAC TGTGTATGCTGTCACT GTTACTGATACAGGGT ACCTCAAGTACAAACC AATTTCCATTAATTAC CGGACCGAAATT (SEQ ID NO.296)
PRD-1301	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWDAPR GLARYYRIT YGETGGNSP	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWDAPR GLARYYRIT YGETGGNSP	EPKSSD (SEQ ID NO.182)	KTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLF PPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN	GGCGTGAGCGACGTGC CCCGGGATCTAGAAGT GGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCA GCTGGGACGCTCCGAG

	VQEFTVFGR GTTATISGL KPGVDYTIT VYAVTIDRD GTRSFDPIS INYRTEIEP KSSDKTHTC PPCPAPELL GGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDP EVKFNWYVD GVEVHNAKT KPREEQYNS TYRVVSVLT VLHQDWLNG KEYKCKVSN KALPAPIEK TISKAKGQP REPQVYTLP PSRDELTKN QVSLTCLVK GFYPSDIAV EWESNGQPE NNYKTTPPV LDSDGSFFL YSKLTVDKS RWQQGNVFS CSVMHEALH NHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO.265)	VQEFTVFGR GTTATISGL KPGVDYTIT VYAVTIDRD GTRSFDPIS INYRTEI (SEQ ID NO.277)		WYVDGVEVHNA KTKPREEQYNS TYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYK CKVSNKALPAP IEKTISKAKGQ PREPQVYTLPP SRDELTKNQVS LTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTPPV LDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO.283)	AGGTCTGGCTCGATAT TACCGCATCACTTACG GCGAAACAGGAGGCAA TAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGTTCGGTC GTGGTACCACAGCTAC CATCAGCGGCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATA CCATCACTGTGTATGC TGTCACTATCGACCGT GACGGTACCCGCAGCT TCGACCCAATTTCCAT TAATTACCGGACCGAA ATTGAGCCTAAGAGCT CCGACAAAACCCACAC ATGCCCACCTTGTCCA GCCCCCGAACTGCTGG GCGGCCCTTCAGTCTT CCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCCAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGG TGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTC CCGTGTTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGT CTCCCGGGAAA (SEQ

					ID NO.297)
PRD-1302	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWDAPA GLARYYRIT YGETGGNSP VQEFTVVGR GNTATISGL KPGVDYTIT VYAVTIFRD GPVTWDPIS INYRTEIEP KSSDKTHTC PPCPAPELL GGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDP EVKFNWYVD GVEVHNAKT KPREEQYNS TYRVVSVLT VLHQDWLNG KEYKCKVSN KALPAPIEK TISKAKGQP REPQVYTLP PSRDELTKN QVSLTCLVK GFYPSDIAV EWESNGQPE NNYKTTPPV LDSDGSFFL YSKLTVDKS RWQQGNVFS CSVMHEALH NHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO.266)	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWDAPA GLARYYRIT YGETGGNSP VQEFTVVGR GNTATISGL KPGVDYTIT VYAVTIFRD GPVTWDPIS INYRTEI (SEQ ID NO.278)	EPKSSD (SEQ ID NO.182)	KTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLF PPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNA KTKPREEQYNS TYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYK CKVSNKALPAP IEKTISKAKGQ PREPQVYTLPP SRDELTKNQVS LTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTPPV LDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO.283)	GGCGTGAGCGACGTGC CCCGGGATCTAGAAGT GGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCA GCTGGGACGCTCCGGC TGGTCTGGCTCGATAT TACCGCATCACTTACG GCGAAACAGGAGGCAA TAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGGTCGGTC GTGGTAACACAGCTAC CATCAGCGGCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATA CCATCACTGTGTATGC TGTCACTATCTTCCGT GACGGTCCCGTCACCT GGGACCCAATTTCCAT TAATTACCGGACCGAA ATTGAGCCTAAGAGCT CCGACAAAACCCACAC ATGCCCACCTTGTCCA GCCCCCGAACTGCTGG GCGGCCCTTCAGTCTT CCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCCAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGG TGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTC CCGTGTTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCG

					TGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGT CTCCCGGGAAA (SEQ ID NO.298)
PRD-1303	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWDAPK GLARYYRIT YGETGGNSP VQEFTVVGR GNTATISGL KPGVDYTIT VYAVTIFRD GPVTWDPIS INYRTEIEP KSSDKTHTC PPCPAPELL GGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDP EVKFNWYVD GVEVHNAKT KPREEQYNS TYRVVSVLT VLHQDWLNG KEYKCKVSN KALPAPIEK TISKAKGQP REPQVYTLP PSRDELTKN QVSLTCLVK GFYPSDIAV EWESNGQPE NNYKTTPPV LDSDGSFFL YSKLTVDKS RWQQGNVFS CSVMHEALH NHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO.267)	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWDAPK GLARYYRIT YGETGGNSP VQEFTVVGR GNTATISGL KPGVDYTIT VYAVTIFRD GPVTWDPIS INYRTEI (SEQ ID NO.279)	EPKSSD (SEQ ID NO.182)	KTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLF PPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNA KTKPREEQYNS TYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYK CKVSNKALPAP IEKTISKAKGQ PREPQVYTLPP SRDELTKNQVS LTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTPPV LDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO.283)	GGCGTGAGCGACGTGC CCCGGGATCTAGAAGT GGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCA GCTGGGACGCTCCGAA GGGTCTGGCTCGATAT TACCGCATCACTTACG GCGAAACAGGAGGCAA TAGCCCTGTCCAGGAG TTCACTGTGGTCGGTC GTGGTAACACAGCTAC CATCAGCGGCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATA CCATCACTGTGTATGC TGTCACTATCTTCCGT GACGGTCCCGTCACCT GGGACCCAATTTCCAT TAATTACCGGACCGAA ATTGAGCCTAAGAGCT CCGACAAAACCCACAC ATGCCCACCTTGTCCA GCCCCCGAACTGCTGG GCGGCCCTTCAGTCTT CCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCCAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGG TGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCC

					AGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTC CCGTGTTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGT CTCCCGGGAAA (SEQ ID NO.299)
PRD-1304	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWSLPN PGNAHYYRI TYGETGGNS PVQEFTVPG RGVTATISG LKPGVDYTI TVYAVTVTD TGFITYKPI SINYRTEIE PKSSDKTHT CPPCPAPEL LGGPSVFLF PPKPKDTLM ISRTPEVTC VVVDVSHED PEVKFNWYV DGVEVHNAK TKPREEQYN STYRVVSVL TVLHQDWLN GKEYKCKVS NKALPAPIE KTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRDELTK NQVSLTCLV KGFYPSDIA VEWESNGQP ENNYKTTPP VLDSDGSFF LYSKLTVDK SRWQQGNVF SCSVMHEAL HNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO.268)	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWSLPN PGNAHYYRI TYGETGGNS PVQEFTVPG RGVTATISG LKPGVDYTI TVYAVTVTD TGFITYKPI SINYRTEI (SEQ ID NO.280)	EPKSSD (SEQ ID NO.182)	KTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLF PPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNA KTKPREEQYNS TYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYK CKVSNKALPAP IEKTISKAKGQ PREPQVYTLPP SRDELTKNQVS LTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTPPV LDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO.283)	GGCGTGAGCGACGTGC CCCGGGATCTAGAAGT GGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCA GCTGGTCTCTGCCGAA TCCGGGTAACGCCCAT TATTACCGCATCACTT ACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGCCTG GTCGTGGTGTTACAGC TACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATT ATACCATCACTGTGTA TGCTGTCACTGTTACT GACACAGGTTTCATCA CGTACAAACCAATTTC CATTAATTACCGGACC GAAATTGAGCCTAAGA GCTCCGACAAAACCCA CACATGCCCACCTTGT CCAGCCCCCGAACTGC TGGGCGGCCCTTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTG CACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCC CCATCGAGAAAACCAT

					CTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGC CTCCCGTGTTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCCGGGAAA (SEQ ID NO.300)
PRD-1305	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWSLPH QGKANYYRI TYGETGGNS PVQEFTVPG RGVTATISG LKPGVDYTI TVYAVTVTD TGYLKYKPI SINYRTEIE PKSSDKTHT CPPCPAPEL LGGPSVFLF PPKPKDTLM ISRTPEVTC VVVDVSHED PEVKFNWYV DGVEVHNAK TKPREEQYN STYRVVSVL TVLHQDWLN GKEYKCKVS NKALPAPIE KTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRDELTK NQVSLTCLV KGFYPSDIA VEWESNGQP ENNYKTTPP VLDSDGSFF LYSKLTVDK SRWQQGNVF	GVSDVPRDL EVVAATPTS LLISWSLPH QGKANYYRI TYGETGGNS PVQEFTVPG RGVTATISG LKPGVDYTI TVYAVTVTD TGYLKYKPI SINYRTEI (SEQ ID NO.281)	EPKSSD (SEQ ID NO.182)	KTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLF PPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNA KTKPREEQYNS TYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYK CKVSNKALPAP IEKTISKAKGQ PREPQVYTLPP SRDELTKNQVS LTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTPPV LDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO.283)	GGCGTGAGCGACGTGC CCCGGGATCTAGAAGT GGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCA GCTGGTCTCTGCCGCA CCAAGGTAAAGCCAAT TATTACCGCATCACTT ACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGCCTG GTCGTGGTGTTACAGC TACCATCAGCGGCCTT AAACCTGGCGTTGATT ATACCATCACTGTGTA TGCTGTCACTGTTACT GATACAGGGTACCTCA AGTACAAACCAATTTC CATTAATTACCGGACC GAAATTGAGCCTAAGA GCTCCGACAAAACCCA CACATGCCCACCTTGT CCAGCCCCCGAACTGC TGGGCGGCCCTTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCA

	SCSVMHEAL HNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO.269)				CGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTG CACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCC CCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGC CTCCCGTGTTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCCGGGAAA (SEQ ID NO.301)
PRD-1471	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP ELQLEESAA EAQEGELEG	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO.276)	ELQLEES AAEAQEG ELE (SEQ ID NO.187)	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WTLPHAGRAHY YRITYGETGGN SPVQEFTVPGR GVTATISGLKP GVDYTITVYAV TVTTTKVIHYK PISINYRTEI (SEQ ID NO.275)	GACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGC

	VSDVPRDLE VVAATPTSL LISWTLPHA GRAHYYRIT YGETGGNSP VQEFTVPGR GVTATISGL KPGVDYTIT VYAVTVTTT KVIHYKPIS INYRTEI (SEQ ID NO.270)				CTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCT CCCGAGCTGCAGCTGG AGGAAAGCGCCGCTGA GGCTCAGGAAGGAGAA CTGGAAGGCGTGAGCG ACGTGCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGCTGCT ACCCCCACAAGCTTGC TGATCTCCTGGACACT GCCTCACGCTGGCCGG GCTCATTACTATAGAA TTACCTACGGGGAGAC AGGCGGGAACTCTCCC GTGCAGGAATTCACCG TGCCTGGAAGGGGCGT GACTGCCACCATCAGT GGGCTGAAGCCAGGAG TGGACTACACAATTAC CGTGTACGCTGTGACT GTGACCACAACTAAAG TGATCCACTACAAACC CATCTCTATTAATTAT CGGACCGAAATT (SEQ ID NO.302)
PRD-1472	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE	ELQLEES AAEAQEG ELE (SEQ ID NO.187)	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WDAPAGLARYY RITYGETGGNS PVQEFTVVGRG NTATISGLKPG VDYTITVYAVT IFRDGPVTWDP ISINYRTEI (SEQ ID NO.278)	GACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGC

	SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP ELQLEESAA EAQEGELEG VSDVPRDLE VVAATPTSL LISWDAPAG LARYYRITY GETGGNSPV QEFTVVGRG NTATISGLK PGVDYTITV YAVTIFRDG PVTWDPISI NYRTEI (SEQ ID NO.271)	SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO.276)			AAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCT CCCGAGCTGCAGCTGG AGGAAAGCGCCGCTGA GGCTCAGGAAGGAGAA CTGGAAGGCGTGAGCG ACGTGCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGCTGCT ACCCCCACAAGCTTGC TGATCAGCTGGGACGC TCCGGCTGGTCTGGCT CGATATTACCGCATCA CTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGG TCGGTCGTGGTAACAC AGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGT GTATGCTGTCACTATC TTCCGTGACGGTCCCG TCACCTGGGACCCAAT TTCCATTAATTACCGG ACCGAAATT (SEQ ID NO.303)
PRD-1473	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR	DKTHTCPPC PAPELLGGP SVFLFPPKP KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPR EEQYNSTYR	ELQLEES AAEAQEG ELE (SEQ ID NO.187)	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WDAPKGLARYY RITYGETGGNS PVQEFTVVGRG NTATISGLKPG VDYTITVYAVT IFRDGPVTWDP ISINYRTEI	GACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCAC

	VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP ELQLEESAA EAQEGELEG VSDVPRDLE VVAATPTSL LISWDAPKG LARYYRITY GETGGNSPV QEFTVVGRG NTATISGLK PGVDYTITV YAVTIFRDG PVTWDPISI NYRTEI (SEQ ID NO.272)	VVSVLTVLH QDWLNGKEY KCKVSNKAL PAPIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSR DELTKNQVS LTCLVKGFY PSDIAVEWE SNGQPENNY KTTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO.276)		(SEQ ID NO.279)	GAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCT CCCGAGCTGCAGCTGG AGGAAAGCGCCGCTGA GGCTCAGGAAGGAGAA CTGGAAGGCGTGAGCG ACGTGCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGCTGCT ACCCCCACAAGCTTGC TGATCAGCTGGGACGC TCCGAAGGGTCTGGCT CGATATTACCGCATCA CTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGG TCGGTCGTGGTAACAC AGCTACCATCAGCGGC CTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGT GTATGCTGTCACTATC TTCCGTGACGGTCCCG TCACCTGGGACCCAAT TTCCATTAATTACCGG ACCGAAATT (SEQ ID NO.304)

					GACAAAACTCACACAT
					GCCCACCGTGCCCAGC
					ACCTGAACTCCTGGGG
					GGACCGTCAGTCTTCC
					TCTTCCCCCCAAAACC
					CAAGGACACCCTCATG
					ATCTCCCGGACCCCTG
					AGGTCACATGCGTGGT
	DKTHTCPPC				GGTGGACGTGAGCCAC
	PAPELLGGP				GAAGACCCTGAGGTCA
	SVFLFPPKP				AGTTCAACTGGTACGT
	KDTLMISRT				GGACGGCGTGGAGGTG
	PEVTCVVVD				CATAATGCCAAGACAA
	VSHEDPEVK				AGCCGCGGGAGGAGCA
	FNWYVDGVE				GTACAACAGCACGTAC
	VHNAKTKPR	DKTHTCPPC			CGTGTGGTCAGCGTCC
	EEQYNSTYR	PAPELLGGP			TCACCGTCCTGCACCA
	VVSVLTVLH	SVFLFPPKP			GGACTGGCTGAATGGC
	QDWLNGKEY	KDTLMISRT			AAGGAGTACAAGTGCA
	KCKVSNKAL	PEVTCVVVD			AGGTCTCCAACAAAGC
	PAPIEKTIS	VSHEDPEVK			CCTCCCAGCCCCCATC
	KAKGQPREP	FNWYVDGVE			GAGAAAACCATCTCCA
	QVYTLPPSR	VHNAKTKPR			AAGCCAAAGGGCAGCC
	DELTKNQVS	EEQYNSTYR		GVSDVPRDLEV	CCGAGAACCACAGGTG
	LTCLVKGFY	VVSVLTVLH		VAATPTSLLIS	TACACCCTGCCCCCAT
	PSDIAVEWE	QDWLNGKEY		WSLPHQGKANY	CCCGGGATGAGCTGAC
	SNGQPENNY	KCKVSNKAL	ELQLEES	YRITYGETGGN	CAAGAACCAGGTCAGC
PRD-1474	KTTPPVLDS	PAPIEKTIS	AAEAQEG	SPVQEFTVPGR	CTGACCTGCCTGGTCA
	DGSFFLYSK	KAKGQPREP	ELE	GVTATISGLKP	AAGGCTTCTATCCCAG
	LTVDKSRWQ	QVYTLPPSR	(SEQ ID	GVDYTITVYAV	CGACATCGCCGTGGAG
	QGNVFSCSV	DELTKNQVS	NO.187)	TVTDTGYLKYK	TGGGAGAGCAATGGGC
	MHEALHNHY	LTCLVKGFY		PISINYRTEI	AGCCGGAGAACAACTA
	TQKSLSLSP	PSDIAVEWE		(SEQ ID	CAAGACCACGCCTCCC
	ELQLEESAA	SNGQPENNY		NO.281)	GTGCTGGACTCCGACG
	EAQEGELEG	KTTPPVLDS			GCTCCTTCTTCCTCTA
	VSDVPRDLE	DGSFFLYSK			CAGCAAGCTCACCGTG
	VVAATPTSL	LTVDKSRWQ			GACAAGAGCAGGTGGC
	LISWSLPHQ	QGNVFSCSV			AGCAGGGGAACGTCTT
	GKANYYRIT	MHEALHNHY			CTCATGCTCCGTGATG
	YGETGGNSP	TQKSLSLSP			CATGAGGCTCTGCACA
	VQEFTVPGR	(SEQ ID			ACCACTACACGCAGAA
	GVTATISGL	NO.276)			GAGCCTCTCCCTGTCT
	KPGVDYTIT				CCCGAGCTGCAGCTGG
	VYAVTVTDT				AGGAAAGCGCCGCTGA
	GYLKYKPIS				GGCTCAGGAAGGAGAA
	INYRTEI				CTGGAAGGCGTGAGCG
	(SEQ ID				ACGTGCCACGGGATCT
	NO.273)				AGAAGTGGTGGCTGCT
					ACCCCCACAAGCTTGC
					TGATCAGCTGGTCTCT
					GCCGCACCAAGGTAAA
					GCCAATTATTACCGCA
					TCACTTACGGCGAAAC
					AGGAGGCAATAGCCCT
					GTCCAGGAGTTCACTG
					TGCCTGGTCGTGGTGT
					TACAGCTACCATCAGC

					GGCCTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCAC TGTGTATGCTGTCACT GTTACTGATACAGGGT ACCTCAAGTACAAACC AATTTCCATTAATTAC CGGACCGAAATT (SEQ ID NO.305)

Các SEQ ID NO. của các trình tự chỉ huy (phần kéo dài đầu tận cùng N) và đầu tận cùng C theo sáng chế được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7

Trình tự theo sáng chế			
SEQ ID NO.	Mô tả	Tên	Trình tự
306	Trình tự chỉ huy	AdNT1	MGVSDVPRDL
307	Trình tự chỉ huy	AdNT2	GVSDVPRDL
308	Trình tự chỉ huy	AdNT3	VSDVPRDL
309	Trình tự chỉ huy	AdNT4	SDVPRDL
310	Trình tự chỉ huy	AdNT5	DVPRDL
311	Trình tự chỉ huy	AdNT6	VPRDL
312	Trình tự chỉ huy	AdNT7	PRDL
---	Trình tự chỉ huy	AdNT8	RDL
---	Trình tự chỉ huy	AdNT9	DL
211	Đầu tận cùng	AdCT1	EIDKPSQ
---	Đầu tận cùng	AdCT2	EI
313	Đầu tận cùng	AdCT3	EIEPKSS
314	Đầu tận cùng	AdCT4	EIDKPC
315	Đầu tận cùng	AdCT5	EIDKP
316	Đầu tận cùng	AdCT6	EIDK
317	Đầu tận cùng	AdCT7	EIDKPS
318	Đầu tận cùng	AdCT8	EIEKPSQ
319	Đầu tận cùng	AdCT9	EIDKPSQLE
320	Đầu tận cùng	AdCT10	EIEDEDEDEDED
321	Đầu tận cùng	AdCT11	EGSGS
322	Đầu tận cùng	AdCT12	EIDKPCQ
189	Đầu tận cùng	AdCT13	GSGC
323	Đầu tận cùng	AdCT14	EGSGC
324	Đầu tận cùng	AdCT15	EIDKPCQLE
325	Đầu tận cùng	AdCT16	EIDKPSQHHHHHH
326	Đầu tận cùng	AdCT17	GSGCHHHHHH
327	Đầu tận cùng	AdCT18	EGSGCHHHHHH
328	nhãn	T1	HHHHHH

IV. Kỹ thuật dung hợp axit nucleic-protein

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến adnectin chứa các miền fibronectin typ III gắn kết với myostatin. Một cách để tạo ra và thử nghiệm nhanh các miền Fn3 về các đặc tính gắn kết đặc hiệu là kỹ thuật dung hợp axit nucleic-protein của Adnexus, Bristol-

Myers Squibb R&D Company. Sáng chế này sử dụng kỹ thuật biểu hiện và gắn nhãn *in vitro*, được gọi là 'dung hợp với protein (PROfusion)' khai thác thể dung hợp axit nucleic-protein (thể dung hợp ARN- và ADN-protein) để nhận diện mới các polypeptit và các cấu trúc axit amin mới là quan trọng trong việc gắn kết với protein. Kỹ thuật dung hợp axit nucleic-protein là kỹ thuật ghép đồng hóa trị protein với thông tin di truyền mã hóa của nó. Để mô tả chi tiết kỹ thuật dung hợp ARN-protein và các phương pháp sàng lọc thư viện protein có khung trên cơ sở fibronectin, xem Szostak và các đồng tác giả, patent Mỹ các số 6,258,558, 6,261,804, 6,214,553, 6,281,344, 6,207,446, 6,518,018 và 6,818,418; Roberts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997;94:12297-12302; và Kurz et al., *Molecules*, 2000;5:1259-64, tất cả các tài liệu này được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

V. Vectơ và polynucleotit

Các axit nucleic mã hóa các protein hoặc polypeptit bất kỳ khác nhau được mô tả trong bản mô tả này có thể được tổng hợp hóa học. Sử dụng cođon có thể được chọn sao cho cải thiện được sự biểu hiện trong tế bào. Việc sử dụng cođon như vậy sẽ phụ thuộc vào loại tế bào được chọn. Các mô hình sử dụng coðon chuyên biệt ðã được phát triển đối với *E. coli* và các vi khuẩn khác, cũng như các tế bào động vật có vú, tế bào thực vật, tế bào nấm men và tế bào côn trùng. Xem, ví dụ: Mayfield et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(2):438-442 (21 tháng 1 năm 2003); Sinclair et al., *Protein Expr. Purif.*, 26(I):96-105 (tháng 10 năm 2002); Connell, N.D., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12(5):446-449 (tháng 10 năm 2001); Makrides et al., *Microbiol. Rev.*, 60(3):512-538 (tháng 9 năm 1996); và Sharp et al., *Yeast*, 7(7):657-678 (tháng 10 năm 1991).

Các kỹ thuật chung để xử lý axit nucleic được mô tả trong, ví dụ, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), hoặc Ausubel, F. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987) và các bản cập nhật định kỳ, được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Nhìn chung, ADN mã hóa polypeptit được liên kết có điều khiển với các yếu tố điều hòa phiên mã hoặc dịch mã thích hợp có nguồn gốc từ các gen của động vật có vú, virut, hoặc côn trùng. Các yếu tố điều hòa này bao gồm vùng khởi đầu phiên mã, trình tự điều khiển tùy chọn để kiểm soát sự phiên mã, trình tự mã hóa vị trí gắn kết ribosom của ARN thông tin thích hợp, và các

trình tự kiểm soát sự kết thúc phiên mã và dịch mã. Khả năng sao chép trong vật chủ, thường được tạo ra bởi vùng khởi đầu sao chép, và việc chọn lọc gen để tạo thuận lợi cho việc nhận diện các thể biến nạp được kết hợp bổ sung.

Các protein được mô tả trong bản mô tả này có thể được sản xuất tái tổ hợp không chỉ trực tiếp, mà còn dưới dạng polypeptit dung hợp với polypeptit khác loại, tốt hơn nếu trình tự tín hiệu hoặc polypeptit khác có vị trí phân cắt đặc hiệu ở đầu tận cùng N của protein hoặc polypeptit trưởng thành. Trình tự tín hiệu khác loại được chọn tốt hơn nếu trình tự được nhận diện và được xử lý (tức là, được phân cắt bằng peptiđaza tín hiệu) bởi tế bào chủ. Trình tự chỉ huy đầu tận cùng N theo sáng chế để sản xuất các polypeptit trong hệ động vật có vú là: METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO.177), trình tự này được loại bỏ bởi tế bào chủ sau khi biểu hiện.

Đối với tế bào chủ của sinh vật nhân sơ không nhận diện và xử lý trình tự tín hiệu nguyên thể, thì trình tự tín hiệu này được thay thế bởi trình tự tín hiệu của sinh vật nhân sơ được chọn, ví dụ, từ nhóm phosphataza kiềm, penicillinaza, 1 pp, hoặc các đoạn chỉ huy enterotoxin II ổn định nhiệt.

Đối với sự bài tiết của nấm men, trình tự tín hiệu nguyên thể có thể được thay thế bởi, ví dụ, đoạn chỉ huy invertaza của nấm men, đoạn chỉ huy yếu tố (bao gồm các đoạn chỉ huy yếu tố alpha của Saccharomyces và Kluyveromyces), hoặc đoạn chỉ huy axit phosphataza, đoạn chỉ huy glucoamylaza của C. albicans, hoặc trình tự tín hiệu được mô tả trong patent Mỹ số 5,631,144. Trong sự biểu hiện của tế bào động vật có vú, các trình tự tín hiệu của động vật có vú cũng như các đoạn chỉ huy tiết của virut, ví dụ, tín hiệu gD của herpes simplex, là có thể sử dụng. ADN của các vùng tiền chất này có thể được cài vào trong khung đọc với ADN mã hóa protein.

Cả hai vectơ biểu hiện và tách dòng chứa trình tự axit nucleic cho phép vectơ này sao chép trong một hoặc nhiều tế bào chủ được chọn. Nhìn chung, trong các vectơ tách dòng, trình tự này là trình tự cho phép vectơ sao chép một cách độc lập với ADN nhiễm sắc thể của vật chủ, và bao gồm các vùng khởi đầu sao chép hoặc các trình tự sao chép tự chủ. Các trình tự này là đã biết trong nhiều vi khuẩn, nấm men, và virut. Vùng khởi đầu sao chép từ plasmit pBR322 là thích hợp đối với hầu hết vi khuẩn gram âm, vùng khởi đầu của plasmit 2 micron là thích hợp đối với nấm men, và các vùng khởi đầu của virut khác nhau (SV40, polioma, adenovirut, VSV hoặc BPV) là hữu ích đối với các vectơ tách

dòng trong các tế bào động vật có vú. Nhìn chung, thành phần vùng khởi đầu sao chép không cần thiết đối với các vectơ biểu hiện của động vật có vú (chỉ vùng khởi đầu SV40 là thường được sử dụng do nó chứa vùng khởi đầu sớm).

Các vectơ biểu hiện và tách dòng có thể chứa gen chọn lọc, còn được gọi là gen đánh dấu dễ chọn lọc. Các gen chọn lọc điển hình mã hóa các protein mà (a) đem lại tính kháng với các kháng sinh hoặc các độc tố khác, ví dụ, ampicillin, neomycin, metotrexat, hoặc tracycline, (b) bổ sung sự thiếu hụt dinh dưỡng thụ động, hoặc (c) cung cấp các chất dinh dưỡng thiết yếu không có sẵn từ môi trường phức hợp, ví dụ, gen mã hóa D-alanin racemaza đối với Bacilli.

Các vectơ biểu hiện và tách dòng thường chứa vùng khởi đầu được nhận diện bởi sinh vật chủ và được liên kết có điều khiển với axit nucleic mã hóa protein theo sáng chế, ví dụ, protein có khung trên cơ sở fibronectin. Các vùng khởi đầu thích hợp để sử dụng với vật chủ sinh vật nhân sơ bao gồm vùng khởi đầu phoA, hệ vùng khởi đầu beta-lactamaza và lactoza, phosphataza kiềm, hệ vùng khởi đầu tryptophan (trp), và các vùng khởi đầu lai như vùng khởi đầu tan. Tuy nhiên, các vùng khởi đầu đã biết khác của vi khuẩn là thích hợp. Các vùng khởi đầu để sử dụng trong các hệ vi khuẩn cũng sẽ chứa trình tự Shine-Dalgarno (S.D.) được liên kết có điều khiển với ADN mã hóa protein theo sáng chế. Các vùng khởi đầu là đã biết đối với sinh vật có nhân thật. Gần như tất cả các gen của sinh vật có nhân thật có vùng giàu AT nằm ở khoảng 25 đến 30 bazơ phía trước vị trí mà sự phiên mã được bắt đầu. Một trình tự khác tìm thấy ở khoảng 70 đến 80 bazơ phía trước vị trí khởi đầu phiên mã của nhiều gen là vùng CNCAAT trong đó N có thể là nucleotit bất kỳ. Ở đầu 3' của hầu hết gen của sinh vật có nhân thật là trình tự AATAAA có thể là tín hiệu để bổ sung đuôi poly A vào đầu 3' của trình tự mã hóa. Tất cả trong số các trình tự này được cài xen thích hợp vào trong vectơ biểu hiện của sinh vật có nhân thật.

Ví dụ về các vùng khởi đầu thích hợp để sử dụng với vật chủ nấm men bao gồm các vùng khởi đầu mã hóa 3-phosphoglycerat kinaza hoặc các enzym thủy phân glucoza khác, như enolaza, glyceraldehyt-3-phosphat đehyđrogenaza, hexokinaza, pyruvat decarboxylaza, phosphofructokinaza, glucoza-6-phosphat isomeraza, 3-phosphoglycerat mutaza, pyruvat kinaza, triosephosphat isomeraza, phosphoglucoza isomeraza, và glucokinaza.

Sự phiên mã từ các vectơ trong tế bào chủ động vật có vú có thể được kiểm soát, ví dụ, bằng các vùng khởi đầu thu được từ các hệ gen của virut như virut polioma, virut gây bệnh đậu gà, adenovirut (như adenovirut 2), virut gây u nhú ở loài bò, virut gây sacom ở loài chim, cytomegalovirut, retrovirut, virut gây bệnh viêm gan B và tốt nhất là virut 40 ở khỉ (Simian Virus 40 - SV40), từ các vùng khởi đầu của động vật có vú khác loại, ví dụ, vùng khởi đầu actin hoặc vùng khởi đầu globulin miễn dịch, từ vùng khởi đầu sốc nhiệt, miễn là các vùng khởi đầu này là tương hợp với hệ tế bào chủ.

Sự phiên mã của ADN mã hóa protein theo sáng chế bởi các sinh vật có nhân thật cao hơn thường được tăng lên bằng cách cài xen trình tự tăng cường vào trong vectơ. Nhiều trình tự tăng cường hiện đã biết từ các gen của động vật có vú (globin, elastaza, albumin, α-fetoprotein, và insulin). Tuy nhiên, thông thường sẽ sử dụng trình tự tăng cường từ virut tế bào của sinh vật có nhân thật. Các ví dụ bao gồm trình tự tăng cường của SV40 trên mặt muộn của vùng khởi đầu sao chép (bp 100-270), trình tự tăng cường khởi động sớm của cytomegalovirut, trình tự tăng cường của virut polioma trên mặt muộn của vùng khởi đầu sao chép, và trình tự tăng cường của adenovirut. Cũng xem Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982) về các yếu tố tăng cường để hoạt hóa các vùng khởi đầu của sinh vật có nhân thật. Trình tự tăng cường có thể được ghép vào vectơ ở vị trí 5' hoặc 3' của trình tự mã hóa peptit, nhưng tốt hơn nếu nằm ở vị trí 5' của vùng khởi đầu.

Các vectơ biểu hiện được sử dụng trong tế bào chủ sinh vật có nhân thật (ví dụ, nấm men, nấm, côn trùng, thực vật, động vật, người, hoặc các tế bào có nhân từ sinh vật đa bào khác) sẽ còn chứa các trình tự cần thiết để kết thúc phiên mã và để làm ổn định ARN thông tin. Các trình tự này thường có ở các vùng không được dịch mã 5' và, thỉnh thoảng là 3', của các ADN hoặc ADN bổ sung của sinh vật có nhân thật hoặc virut. Các vùng này chứa các đoạn nucleotit được phiên mã dưới dạng các mảnh được polyadenyl hóa trong phần không được dịch mã của ARN thông tin mã hóa protein theo sáng chế. Một thành phần kết thúc phiên mã hữu ích là vùng polyadenyl hóa hormon tăng trưởng của loài bò. Xem WO 94/11026 và vectơ biểu hiện được mô tả trong đó.

ADN tái tổ hợp cũng có thể bao gồm loại trình tự nhãn protein bất kỳ có thể hữu ích để tinh chế protein. Ví dụ về các nhãn protein bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhãn histiđin, nhãn FLAG, nhãn myc, nhãn HA, hoặc nhãn GST. Các vectơ tách dòng và biểu hiện thích hợp để sử dụng với tế bào chủ của vi khuẩn, nấm, nấm men, và động vật

có vú có thể được tìm thấy trong Cloning Vectors: A Laboratory Manual, (Elsevier, New York (1985)), được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Cấu trúc biểu hiện được đưa vào tế bào chủ bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đối với tế bào chủ, vốn là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Nhiều phương pháp để đưa các axit nucleic vào trong tế bào chủ là đã biết trong lĩnh vực, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, điện di; chuyển nạp dùng canxi clorua, rubiđi clorua, canxi phosphat, DEAE-đextran, hoặc các chất khác; súng bắn gen; gây nhiễm bằng liposom; và gây nhiễm (trong đó vectơ là tác nhân gây nhiễm).

Các tế bào chủ thích hợp bao gồm các tế bào của sinh vật nhân sơ, nấm men, động vật có vú, hoặc vi khuẩn. Vi khuẩn thích hợp bao gồm sinh vật gram âm hoặc gram dương, ví dụ, *E. coli* hoặc Bacillus spp. Nấm men, tốt hơn nếu từ loài Saccharomyces, như *S. cerevisiae*, cũng có thể được sử dụng để sản xuất các polypeptit. Các hệ nuôi cấy tế bào động vật có vú hoặc côn trùng khác nhau cũng có thể được sử dụng để biểu hiện các protein tái tổ hợp. Các hệ baculovirut để sản xuất các protein khác loại trong tế bào côn trùng được xem xét bởi Luckow và các đồng tác giả (Bio/Technology, 6:47 (1988)). Ví dụ về các dòng tế bào chủ động vật có vú thích hợp bao gồm tế bào nội mô, tế bào thận khỉ COS-7, CV-1, tế bào L, C127, 3T3, buồng trứng chuột hamster Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO), tế bào thận phôi người, HeLa, 293, 293T, và các dòng tế bào BHK. Các polypeptit tinh chế được tạo ra bằng cách nuôi cấy các hệ vật chủ/vectơ thích hợp để biểu hiện các protein tái tổ hợp. Trong nhiều ứng dụng, kích thước nhỏ của nhiều polypeptit được mô tả trong bản mô tả này sẽ làm cho việc biểu hiện trong *E. coli* là phương pháp biểu hiện được ưu tiên. Sau đó, protein này được tinh chế từ môi trường nuôi cấy hoặc dịch chiết tế bào.

VI. Sản xuất protein

Sáng chế cũng đề cập đến dòng tế bào biểu hiện adnectin kháng myostatin hoặc polypeptit dung hợp của nó. Việc tạo ra và phân lập các dòng tế bào sản xuất adnectin kháng myostatin có thể được thực hiện bằng các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực, như các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này.

Các tế bào chủ được biến nạp bằng các vectơ biểu hiện hoặc tách dòng được mô tả trong bản mô tả này để sản xuất protein và được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được biến đổi thích hợp để gây ra các vùng khởi đầu, chọn lọc thể biến nạp,

hoặc khuếch đại các gen mã hóa các trình tự mong muốn. Trong các ví dụ được thể hiện ở đây, các tế bào chủ được sử dụng để sản xuất protein với hiệu suất cao (high-throughput protein production - HTPP) và sản xuất ở quy mô trung bình là các tế bào chủ từ chủng vi khuẩn HMS174.

Các adnectin theo sáng chế cũng có thể thu được ở dạng không glycosyl hóa bằng cách sản xuất các adnectin trong, ví dụ, các tế bào của sinh vật nhân sơ (ví dụ, *E. coli*). Đáng lưu ý, các dạng không glycosyl hóa của các adnectin theo sáng chế có cùng ái lực, hiệu lực, và cơ chế tác dụng như các adnectin được glycosyl hóa khi được thử nghiệm *in vitro*.

Các tế bào chủ được sử dụng để sản xuất các protein theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong nhiều môi trường. Các môi trường có trên thị trường như Ham's F10 (Sigma), Môi trường cơ bản tối thiểu ((Minimal Essential Medium - MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma), và môi trường Eagle cải biến của Dulbecco ((Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM), Sigma)) là thích hợp để nuôi cấy các tế bào chủ. Ngoài ra, nhiều môi trường được mô tả trong Ham et al., Meth. Enzymol., 58:44 (1979), Barites et al., Anal. Biochem., 102:255 (1980), patent Mỹ các số 4,767,704, 4,657,866, 4,927,762, 4,560,655, 5,122,469, 6,048,728, 5,672,502, hoặc patent Mỹ số RE 30,985 có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy cho các tế bào chủ. Môi trường bất kỳ trong số các môi trường này có thể được bổ sung, nếu cần, các hormon và/hoặc các yếu tố sinh trưởng khác (như insulin, transferin, hoặc yếu tố sinh trưởng biểu bì), các muối (như natri clorua, canxi, magie, và phosphat), các dung dịch đệm (như HEPES), các nucleotit (như ađenosin và thymiđin), các kháng sinh (như gentamycin), các nguyên tố vi lượng (được định nghĩa là các hợp chất vô cơ thường có mặt ở nồng độ cuối trong khoảng micromol), và glucoza hoặc nguồn năng lượng tương đương. Các chất bổ sung cần thiết khác bất kỳ cũng có thể được bao gồm ở các nồng độ thích hợp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này kỹ thuật này sẽ biết được. Các điều kiện nuôi cấy, như nhiệt độ, độ pH, và các điều kiện tương tự, là các điều kiện trước đó được sử dụng với tế bào chủ được chọn để biểu hiện, và sẽ là hiển nhiên đối với chuyên gia có trình độ thông thường trong lĩnh vực.

Các protein được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được sản xuất bằng cách sử dụng hệ dịch mã bởi tế bào. Để đạt được các mục đích này, các axit nucleic mã hóa

polypeptit cần phải được biến đổi để cho phép phiên mã *in vitro* để sản xuất mARN và cho phép dịch mã không tế bào của mARN trong hệ không tế bào cụ thể được sử dụng (sinh vật có nhân thật như động vật có vú hoặc hệ dịch mã không tế bào của nấm men hoặc sinh vật nhân sơ như hệ dịch mã không tế bào của vi khuẩn.

Các protein theo sáng chế cũng có thể được sản xuất bằng cách tổng hợp hóa học (ví dụ, bằng các phương pháp được mô tả trong Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Edition, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984)). Các biến đổi đối với protein này cũng có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học.

Các protein theo sáng chế có thể được tinh chế bằng các phương pháp phân lập/tinh chế protein đã biết phổ biến trong lĩnh vực hóa học protein. Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn bao gồm chiết, tái kết tinh, tách bằng muối (ví dụ, bằng amoni sulfat hoặc natri sulfat), ly tâm, thẩm tách, siêu lọc, sắc ký hấp phụ, sắc ký trao đổi ion, sắc ký kỵ nước, sắc ký pha thông thường, sắc ký pha đảo, lọc gel, sắc ký thấm gel, sắc ký ái lực, điện di, phân bố ngược dòng hoặc kết hợp bất kỳ các phương pháp này. Sau khi tinh chế, các polypeptit có thể được trao đổi trong các dung dịch đệm khác nhau và/hoặc được cô bằng phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, lọc và thẩm tách.

Polypeptit tinh chế tốt hơn nếu có độ tinh khiết ít nhất bằng 85%, hoặc tốt hơn nếu có độ tinh khiết ít nhất bằng 95%, và tốt nhất là có độ tinh khiết ít nhất bằng 98%. Không quan tâm đến trị số chính xác của độ tinh khiết, polypeptit này là đủ tinh khiết để sử dụng làm dược phẩm.

VII. Mô tả đặc điểm sinh lý và sinh hóa

Việc gắn kết của adnectin kháng myostatin theo sáng chế với phân tử đích (ví dụ, myostatin) có thể được đánh giá về hằng số cân bằng (ví dụ, hằng số phân ly, K_D) và các hằng số động học (ví dụ, hằng số gắn kết tiến, k_{on} và hằng số gắn kết lùi, k_{off}). Adnectin thường sẽ gắn kết với phân tử đích với K_D nhỏ hơn 500nM, 100nM, 10nM, 1nM, 500pM, 200pM, hoặc 100pM, mặc dù các giá trị K_D cao hơn có thể được cho phép trong đó k_{off} là đủ thấp hoặc k_{on} là đủ cao.

Các thử nghiệm gắn kết ái lực *in vitro*

Các adnectin kháng myostatin gắn kết với và đối kháng myostatin có thể được nhận diện bằng các thử nghiệm *in vitro* khác nhau. Tốt hơn nếu, các thử nghiệm này là thử nghiệm có hiệu suất cao cho phép sàng lọc nhiều adnectin dự tuyển đồng thời. Theo một số phương án, BMP-11, có độ tương đồng axit amin bằng 90% so với myostatin, có thể được sử dụng làm chất thay thế cho myostatin trong các thử nghiệm *in vitro* khi thử nghiệm này được thực hiện dưới các điều kiện bão hòa. Đáng lưu ý, các adnectin kháng myostatin được dung hợp với các miền Fc có thể gắn kết với cả myostatin và BMP-11, trong khi các Monoadnectin gắn kết ưu tiên với myostatin. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, điều này có thể phản ánh ái tính tăng của các adnectin được dung hợp Fc có hóa trị hai so với các adnectin có hóa trị một. Việc gắn kết với BMP11 tăng tương tự được quan sát thấy với các adnectin được gắn PEG có hóa trị hai, như ATI-1341, bao gồm các adnectin được dung hợp với hai đầu của nhóm PEG 20kDa.

Các thử nghiệm theo sáng chế để xác định ái lực gắn kết của các adnectin kháng myostatin được mô tả trong phần Ví dụ *dưới đây*, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phương pháp trong pha dung dịch như thử nghiệm loại trừ động học (KinExA) (Blake et al., *JBC* 1996;271:27677-85; Drake et al., *Anal Biochem* 2004;328:35-43), cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance - SPR) bằng hệ Biacore (Uppsala, Sweden) (Welford et al., *Opt. Quant. Elect* 1991;23:1; Morton and Myszka, *Methods in Enzymology* 1998;295:268) và thử nghiệm huỳnh quang đồng nhất phân giải theo thời gian (homogeneous time resolved fluorescence - HTRF) (Newton et al., *J Biomol Screen* 2008;13:674-82; Patel et al., *Assay Drug Dev Technol* 2008;6:55-68).

Theo một số phương án, các tương tác phân tử sinh học có thể được giám sát theo thời gian thực bằng hệ Biacore, sử dụng SPR để phát hiện các thay đổi trong góc cộng hưởng của ánh sáng ở bề mặt của màng vàng mỏng trên giá thuỷ tinh do các thay đổi về chỉ số khúc xạ của bề mặt lên đến 300nM. Phân tích Biacore thu được hằng số tốc độ liên kết, hằng số tốc độ phân ly, hằng số phân ly cân bằng, và hằng số ái lực. Ái lực gắn kết thu được bằng cách đánh giá các hằng số tốc độ liên kết và phân ly bằng cách sử dụng hệ cộng hưởng plasmon bề mặt Biacore (Biacore, Inc.). Chip cảm biến sinh học được kích hoạt để tạo cặp đồng hóa trị với đích. Sau đó, đích được pha loãng và được tiêm lên chip để thu được tín hiệu theo đơn vị đáp ứng của nguyên liệu được giữ cố định. Do tín hiệu tính theo đơn vị cộng hưởng (resonance unit - RU) là tỉ lệ thuận với khối lượng của

nguyên liệu được giữ cố định, nên tín hiệu này thể hiện khoảng mật độ đích được giữ cố định trên chất nền. Dữ liệu liên kết và phân ly được làm khớp đồng thời trong phân tích toàn bộ để tìm ra biểu thức tốc độ thực đối với tương tác hai phân tử 1:1, thu được giá trị khớp tốt nhất đối với k_{on}, k_{off} và R_{max} (đáp ứng lớn nhất ở bão hoà). Các hằng số phân ly cân bằng của gắn kết, K_D được tính từ các phép đo SPR dưới dạng k_{off}/k_{on}.

Theo một số phương án, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế có K_D trong thử nghiệm ái lực SPR được mô tả trong ví dụ 6 bằng 500nM hoặc nhỏ hơn, 400nM hoặc nhỏ hơn, 300nM hoặc nhỏ hơn, 200nM hoặc nhỏ hơn, 150nM hoặc nhỏ hơn, 100nM hoặc nhỏ hơn, 90nM hoặc nhỏ hơn, 80nM hoặc nhỏ hơn, 70nM hoặc nhỏ hơn, 60nM hoặc nhỏ hơn, 50nM hoặc nhỏ hơn, 40nM hoặc nhỏ hơn, 30nM hoặc nhỏ hơn, 20nM hoặc nhỏ hơn, 15nM hoặc nhỏ hơn, 10nM hoặc nhỏ hơn, 5nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 1nM hoặc nhỏ hơn. Tốt hơn nếu K_D bằng 15nM hoặc nhỏ hơn. Tốt hơn nữa nếu K_D bằng 2,0nM hoặc nhỏ hơn.

Theo một số phương án, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế có IC50 trong thử nghiệm HTRF được mô tả trong ví dụ 4 bằng 5nM hoặc nhỏ hơn, 4nM hoặc nhỏ hơn, 3nM hoặc nhỏ hơn, 2,5nM hoặc nhỏ hơn, 2nM hoặc nhỏ hơn, 1,5nM hoặc nhỏ hơn, 1nM hoặc nhỏ hơn, 0,5nM hoặc nhỏ hơn, 0,2nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 0,1nM hoặc nhỏ hơn. Tốt hơn nếu IC50 bằng 1,5nM hoặc nhỏ hơn. Tốt hơn nữa nếu IC50 bằng 0,5nM hoặc nhỏ hơn.

Theo một số phương án, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế có K_D trong thử nghiệm loại trừ động học được mô tả trong ví dụ 7 bằng 2nM hoặc nhỏ hơn, 1,5nM hoặc nhỏ hơn, 1nM hoặc nhỏ hơn, 900pM hoặc nhỏ hơn, 850pM hoặc nhỏ hơn, 800pM hoặc nhỏ hơn, 750pM hoặc nhỏ hơn, 700pM hoặc nhỏ hơn, 650pM hoặc nhỏ hơn, 600pM hoặc nhỏ hơn, 550pM hoặc nhỏ hơn, 500pM hoặc nhỏ hơn, 450pM hoặc nhỏ hơn, 400pM hoặc nhỏ hơn, 350pM hoặc nhỏ hơn, 340pM hoặc nhỏ hơn, 330pM hoặc nhỏ hơn, 300pM hoặc nhỏ hơn, 250pM hoặc nhỏ hơn, 200pM hoặc nhỏ hơn, 150pM hoặc nhỏ hơn, hoặc 100pM hoặc nhỏ hơn. Tốt hơn nếu K_D bằng 850pM hoặc nhỏ hơn.

Cần hiểu rằng các thử nghiệm được mô tả trên đây theo sáng chế, và phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực để xác định ái lực gắn kết giữa các protein (ví dụ, chuyển năng lượng trên cơ sở huỳnh quang (FRET), thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết

enzym, và thử nghiệm gắn kết cạnh tranh (ví dụ, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ)) có thể được sử dụng để đánh giá ái lực gắn kết của các adnectin kháng myostatin theo sáng chế.

Thử nghiệm đánh giá hoạt tính chất đối kháng *in vitro*

Khả năng của các adnectin kháng myostatin đối kháng hoạt tính myostatin có thể được xác định dễ dàng bằng cách sử dụng các thử nghiệm *in vitro* khác nhau. Tốt hơn nếu, các thử nghiệm này là thử nghiệm có hiệu suất cao cho phép sàng lọc nhiều adnectin dự tuyển đồng thời. Theo một số phương án, tác dụng đối kháng của các adnectin kháng myostatin trên hoạt tính myostatin có thể được xác định trong thử nghiệm chất chỉ thị yếu tố đáp ứng activin (activin responsive element - ARE)-luxiferaza trên cơ sở tế bào, như được mô tả trong ví dụ 3. Theo một số phương án, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế làm giảm hoạt tính ARE-luxiferaza gây ra bởi myostatin xuống ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90% hoặc nhiều hơn so với đối chứng khi ủ đồng thời myostatin với adnectin kháng myostatin trước khi kích thích các tế bào bằng hỗn hợp này. Phản ứng đối chứng theo sáng chế bao gồm xử lý tế bào bằng myostatin đơn lẻ hoặc myostatin được ủ trước bằng một lượng dư chất ức chế myostatin tiêu chuẩn như Human Activin RIIB Fc Chimera (R&D Systems) hoặc ActRIIb-Fc như được mô tả trong Morrison và các đồng tác giả (*Experimental Neurology* 2009; 217:258-68). Theo các phương án khác, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế ức chế hoạt tính chất chỉ thị ARE-luxiferaza với IC50 bằng 500nM hoặc nhỏ hơn, 400nM hoặc nhỏ hơn, 300nM hoặc nhỏ hơn, 200nM hoặc nhỏ hơn, 100nM hoặc nhỏ hơn, 50nM hoặc nhỏ hơn, 10nM hoặc nhỏ hơn, 5nM hoặc nhỏ hơn, 1nM, 0,5nM hoặc nhỏ hơn, 0,4nM hoặc nhỏ hơn, 0,3nM hoặc nhỏ hơn, 0,2nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 0,10nM hoặc nhỏ hơn, như được mô tả trong ví dụ 3.

Theo các phương án khác, tác dụng đối kháng của các adnectin kháng myostatin trên hoạt tính myostatin có thể được xác định bằng cách đo mức độ phosphoryl hóa SMAD trong các tế bào được xử lý bằng myostatin, như được mô tả trong ví dụ 5. Theo một số phương án, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế làm giảm mức độ phosphoryl hóa SMAD gây ra bởi myostatin xuống ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 97% hoặc nhiều hơn so với đối chứng khi ủ đồng thời myostatin với adnectin kháng myostatin trước khi kích thích các tế bào bằng hỗn hợp này. Phản ứng đối chứng

theo sáng chế bao gồm xử lý tế bào bằng myostatin đơn lẻ hoặc myostatin được ủ trước bằng một lượng dư chất ức chế myostatin tiêu chuẩn như Human Activin RIIB Fc Chimera (R&D Systems) hoặc ActRIIb-Fc như được mô tả trong Morrison và các đồng tác giả (*Experimental Neurology* 2009;217:258-68). Theo một số phương án, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế ức chế sự phosphoryl hóa SMAD với IC50 bằng 1nM hoặc nhỏ hơn, 0,8nM hoặc nhỏ hơn, 0,6nM hoặc nhỏ hơn, 0,4nM hoặc nhỏ hơn, 0,3nM hoặc nhỏ hơn, 0,2nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 0,1nM hoặc nhỏ hơn trong đáp ứng ức chế gồm 12 điểm hoặc 4 điểm, như được mô tả trong ví dụ 5. Theo các phương án khác, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế ở nồng độ 10nM ức chế sự phosphoryl hóa SMAD bởi myostatin xuống ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, hoặc ít nhất 98% hoặc nhiều hơn, như được mô tả trong ví dụ 5.

Ngoài ra, một số hệ mô hình *in vitro* là đã biết, trong đó sử dụng các tế bào, các phương pháp nuôi cấy mô và mô học để nghiên cứu bệnh tế bào thần kinh vận động. Ví dụ, lát cắt kiểu cơ quan tủy sống chuột cống được đem gây độc do kích thích bởi glutamat là hữu ích làm hệ mô hình thử nghiệm hiệu quả của các adnectin kháng myostatin trong việc phòng ngừa sự thoái hóa nơron vận động. Corse et al., Neurobiol. Dis. (1999) 6:335 346. Để bàn luận về các hệ in vitro để sử dụng trong nghiên cứu ALS, xem, ví dụ, Bar, P. R., Eur. J. Pharmacol. (2000) 405:285 295; Silani et al., J. Neurol. (2000) 247 Suppl 1:128 36; Martin et al., Int. J. Mol. Med. (2000) 5:3 13.

Cần hiểu rằng các thử nghiệm được mô tả trong bản mô tả này theo sáng chế, và phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực có thể dùng để chỉ ra hoạt tính myostatin là thích hợp để sử dụng trong thử nghiệm tác dụng đối kháng myostatin của các adnectin kháng myostatin theo sáng chế (ví dụ, RT-PCR theo thời gian thực của các mARN của gen đích SMAD (ví dụ, Smad 7; Ciarmela et al., *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011;96;755-65) hoặc các mARN của gen chứa ARE).

Mô hình *in vivo*

Các mô hình động vật khác nhau được công nhận trong lĩnh vực hiện có tóm lược các triệu chứng của bệnh, rối loạn, và tình trạng bệnh liên quan đến hao mòn cơ được liên kết với, ví dụ, cơ, thần kinh cơ, thần kinh và rối loạn chuyển hóa. Các mô hình này có thể được sử dụng để thử nghiệm hiệu lực của các adnectin kháng myostatin theo sáng chế.

Ví dụ, các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về các mô hình động vật này bao gồm, ví dụ, mô hình chuột nhắt bị bệnh loạn dưỡng cơ được liên kết với nhiễm sắc thể giới tính X (mdx) (US2011/0008375, Gehrig et al., *Nature* 2012;484:394-8), bao gồm 4 chủng bổ sung của chuột nhắt *mdx*—chuột nhắt *mdx*2cv, *mdx*3cv, *mdx*4cv, hoặc *mdx*5cv (Phelps *et al., Human Molecular Genetics*. 1996;5(8):1149-1153), chuột nhắt *mdx* có cắt bỏ thêm chất tương tự dystrophin là utrophin (*mdx/utr*$^{-/-}$) (Deconinck *et al., Cell*. 1997;90(4):717-727), chuột nhắt C57BL/6 thiếu alpha-SG (Duclos *et al.i*(1998) J. Cell Biol. 142, 1461-1471), và các mô hình gần đây được xem xét trong Nakamura và các đồng tác giả, (*J Biomed Biotechnol*. 2011; số ID bài báo: 184393), ví dụ, chuột nhắt mdx52, trong đó exon 52 của gen DMD của chuột nhắt được loại bỏ, mô hình bệnh loạn dưỡng cơ ở chó Golden Retriever (Golden Retriever muscular dystrophy - GRMD), mô hình bệnh loạn dưỡng cơ liên quan đến nhiễm sắc thể X ở loài chó (Canine X-Linked Muscular Dystrophy - $CXMD_J$), và mô hình bệnh loạn dưỡng cơ phì đại ở loài mèo (Hypertrophy Feline Muscular Dystrophy - HFMD) (ví dụ, Shelton *et al., Neuromuscular Disorders*. 2005;15(2):127-138).

Các mô hình động vật đối với nghiên cứu về các rối loạn thần kinh vận động như ALS là chuột chuyển gen có đột biến liên quan đến ALS của gen Cu/Zn peroxit đismutaza (SOD1) (mSOD1G93A và/hoặc mSOD1G37R). Các con chuột này phát triển rối loạn liệt khởi phát ở động vật trưởng thành được di truyền trội với nhiều dấu hiệu lâm sàng và bệnh lý của ALS có tính chất gia đình. (ví dụ, Gurney et al., Science (1994) 264:1772 1775; Nagano et al., Life Sci (2002) 72:541 548). Các mô hình động vật khác bao gồm hai mô hình của chuột có trong tự nhiên đối với bệnh thần kinh vận động tiến triển (progressive motor neuronopathy - pmn) và hội chứng wobbler (Haegggeli and Kato, Neurosci. Lett. (2002) 335:39 43). Để xem xét các mô hình động vật khác nhau để sử dụng trong nghiên cứu các bệnh thần kinh vận động như ALS, xem, ví dụ, Jankowsky et al., Curr Neurol Neurosci. Rep. (2002) 2:457 464; Elliott, J. L., Neurobiol. Dis. (1999) 6:310 20; và Borchelt et al., Brain Pathol. (1998) 8:735 757.

Các mô hình động vật của các bệnh thoái hóa thần kinh hoặc bệnh học thần kinh khác ngoài ALS bao gồm mô hình chuột chuyển gen để đánh giá bệnh teo cơ hành và tủy sống (spinal and bulbar muscular atrophy - SBMA) (Katsuno et al., Neuron (2002) 35:843 854), các mô hình động vật đối với bệnh viêm tủy xám gây liệt ở người (Ford et

al., Microb. Pathog. (2002) 33:97 107), các mô hình động vật của bệnh teo cơ tủy (Schmid *et al.,* J. Child Neurol. 22, 1004-1012, 2007), các mô hình động vật của bệnh cơ xa và bệnh cơ thể vùi di truyền (Malicdan *et al.,* Acta Myol. tháng 12 năm 2007; 26(3): 171-175), mô hình chuột của bệnh hủy myelin di truyền (Suzuki *et al.,* Microsc. Res. Tech. 1995;32:204-214), và các mô hình được mô tả bởi Meyer ZuHörste *et al.* (Curr. Opin. Neurol. 2006;19:464-473).

Các mô hình động vật để thử nghiệm hiệu lực của các adnectin kháng myostatin theo sáng chế đối với việc giảm thể tích cơ do teo và/hoặc kém hoạt động bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mô hình chuột nhắt bất động một bên (Madaro et al., *Basic Applied Myology* 2008;18:149-153), rạch gân Achilles (mở gân) (Bialek et al., *Physiol Genomics* 2011;43:1075-86), và các mô hình được mô tả trong Powers và các đồng tác giả (*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R337-44), như, treo chân sau của các động vật, giữ cố định chân, và thông khí cơ học có kiểm soát.

Các mô hình động vật liên quan để thử nghiệm hiệu lực của các adnectin kháng myostatin theo sáng chế trong việc điều trị rối loạn chuyển hóa bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các mô hình được mô tả trong Ramaro và các đồng tác giả (*Indian J Med Res* 2007;125:451-472) và Kennedy và các đồng tác giả (*Disease Models & Mechanisms* 2010;3:156-166), cả hai tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn). Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về các mô hình động vật như vậy bao gồm chuột nhắt $Lep^{ob/ob}$, chuột nhắt $Lepr^{db}$, chuột nhắt Kuo Kondo, chuột nhắt $KK/^{Ay}$, chuột nhắt bị bệnh béo phì Niu Di Lân (New Zealand Obese -NZO), chuột nhắt NONcNZO10, chuột nhắt bị bệnh đái tháo đường do béo phì Tsumara Suzuki (Tsumara Suzuki Obese Diabetes - TSOD) và bệnh béo phì không phải Tsumara Suzuki (Tsumara Suzuki Non Obese - TSNO), chuột nhắt M16, chuột cống béo Zucker, chuột cống béo đái tháo đường Zucker, chuột cống cp SHR/N-, chuột cống cp JCR/LA -, chuột cống béo Otsuka Long Evans Tokushima, khỉ nâu béo phì, chuột cống bị đái tháo đường Cohen, chuột cống Goto-Kakizaki, và chuột nhắt đột biến C57 BL/6 (Akita) không béo phì. Bệnh đái tháo đường typ 2 cũng có thể được gây ra bởi chế độ ăn bằng cách, ví dụ, cho chuột nhắt C57BL6 không béo phì, không đái tháo đường ăn thức ăn có lượng chất béo cao (Surwit et al., *Diabetes* 1988;37:1163-7). Bệnh đái tháo đường typ 2 cũng có thể được gây ra bằng hóa học bằng, ví dụ, goldthioglucoza (Le Marchand Brustel et al., *Am J Physiol*

1978;234:E348-58) hoặc streptozotocin, hoặc gây ra bằng phẫu thuật (ví dụ, các động vật bị đái tháo đường được phẫu thuật mở tuyến tụy một phần) (McNeil JH., Experimental models of diabetes. Florida, US: CRC Press LLc; 1999; Sasaki et al., *In Vivo* 2000;14:535-41). Nhiều mô hình động vật di truyền cũng được biết là tóm lược các triệu chứng và kiểu hình của rối loạn chuyển hóa, như các mô hình được xem xét trong Kennedy và các đồng tác giả, 2010 (*nêu trên*).

Theo một số phương án, hiệu lực của các adnectin kháng myostatin theo sáng chế trong việc làm tăng khối lượng hoặc thể tích cơ có thể được thử nghiệm bằng cách tiêm dưới da cho chuột nhắt, như được mô tả trong ví dụ 9. Do việc ức chế myostatin làm tăng khối lượng cơ, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế được mong đợi là làm tăng thể trọng và khối lượng cơ, mức độ có thể được sử dụng để xác định hiệu lực của các adnectin.

Theo một số phương án, đặc biệt khi các adnectin kháng myostatin có tác dụng sinh miễn dịch ở chuột nhắt (ví dụ, do việc sử dụng miền fibronectin typ III của người) và mong muốn điều trị lâu dài, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế có thể được sử dụng cho chuột nhắt SCID, là loài không thể làm tăng đáp ứng miễn dịch tế bào hoặc dịch thể. Theo một số phương án, chuột nhắt SCID có thể được lai với các mô hình di truyền khác, như mô hình được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, chuột nhắt bị đái tháo đường), để phát triển mô hình chuột bị suy giảm miễn dịch tuân theo việc điều trị lâu dài bằng các adnectin kháng myostatin theo sáng chế.

VIII. Các ứng dụng điều trị bệnh

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến adnectin kháng myostatin hữu ích để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến myostatin, ví dụ, rối loạn hao mòn cơ, chứng teo cơ, rối loạn chuyển hóa, và các rối loạn thoái hóa xương. Do đó, sáng chế mô tả các phương pháp làm giảm hoặc ức chế bệnh hoặc rối loạn liên quan đến myostatin ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng dùng polypeptit gắn kết myostatin, tức là adnectin kháng myostatin, với lượng hữu hiệu. Theo một số phương án, đối tượng này là người. Theo một số phương án, các adnectin kháng myostatin là dược dụng đối với động vật có vú, đặc biệt là người. Thuật ngữ "polypeptit dược dụng" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit được sử dụng cho động vật mà không gây ra hậu quả y học bất lợi đáng kể, như hầu như không có nội độc tố, hoặc lượng nội độc tố rất thấp.

Theo một số phương án, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế sẽ được sử dụng cho đối tượng kết hợp (đồng thời hoặc riêng biệt) với chất đã biết trong lĩnh vực là hữu ích đối với rối loạn hoặc bệnh cụ thể cần điều trị.

Theo một số phương án, nhóm đối tượng bị bệnh cần điều trị bằng adnectin kháng myostatin là nhóm đối tượng bị bệnh không tuân theo phương pháp điều trị chuẩn đối với bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh cần điều trị do, ví dụ, tuổi, các tình trạng bệnh đã có từ trước, cấu trúc di truyền, và/hoặc tình trạng bệnh mắc đồng thời. Các adnectin kháng myostatin theo sáng chế có thể có chức năng như phương pháp điều trị thay thế cho các phương pháp điều trị đang có liên quan đến các tác dụng phụ trọng yếu (ví dụ, khả năng sinh sản) hoặc lo lắng về độ an toàn.

Các bệnh, rối loạn, và tình trạng bệnh theo sáng chế mà các adnectin kháng myostatin theo sáng chế sẽ hữu ích được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Bệnh và rối loạn cơ, thần kinh, và chuyển hóa

Các adnectin kháng myostatin theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các rối loạn cơ, thần kinh và chuyển hóa liên quan đến việc hao mòn cơ và/hoặc chứng teo cơ. Ví dụ, sự biểu hiện myostatin quá mức *in vivo* gây ra các dấu hiệu và các triệu chứng đặc trưng của chứng suy mòn, và chất gắn kết myostatin có thể giải quyết một phần tác dụng hao mòn cơ của myostatin (Zimmers et al., *Science* 2002;296:1486-8). Các đối tượng bị bệnh bị AIDS còn biểu hiện mức nguyên liệu phản ứng miễn dịch với myostatin trong huyết thanh tăng so với các đối tượng bị bệnh không bị AIDS hoặc các đối tượng bị bệnh bị AIDS không biểu hiện giảm cân (Gonzalez-Cadavid et al., *PNAS* 1998;95:14938-43). Cũng quan sát thấy rằng việc loại bỏ myostatin đặc hiệu tim làm giảm chứng teo cơ xương ở chuột nhắt bị bệnh suy tim, và ngược lại, đặc biệt, việc biểu hiện quá mức myostatin trong tim là đủ để gây ra sự hao mòn cơ (Breitbart et al., *AJP-Heart*; 2011;300:H1973-82). Ngược lại, chuột nhắt được làm giảm myostatin thể hiện khối lượng cơ tăng, và sự giảm theo tuổi về sự tích tụ chất béo so với đối tác thể dại của chúng (McPherron et al., *Clin. Invest.* 2002;109:595-601).

Các rối loạn theo sáng chế có thể được điều trị bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm các bệnh về cơ và các bệnh thần kinh, bao gồm, ví dụ, bệnh tế bào thần kinh vận động, các rối loạn thần kinh cơ và thần kinh.

Ví dụ, các adnectin kháng myostatin có thể được sử dụng để điều trị các bệnh về cơ và các rối loạn thần kinh cơ di truyền (ví dụ, bệnh loạn dưỡng cơ (Gonzalez-Kadavid et al., *PNAS*, 1998;95:14938-43), các rối loạn nơron vận động, các bệnh về cơ bẩm sinh, các bệnh cơ viêm và các bệnh cơ chuyển hóa), cũng như các bệnh cơ mắc phải (ví dụ, bệnh cơ gây ra do thuốc, bệnh cơ gây ra do độc tố, bệnh cơ gây ra do nhiễm trùng, bệnh cơ cận ung thư và các bệnh về cơ khác liên quan đến các chứng bệnh có tính quyết định).

Các rối loạn như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, bệnh loạn dưỡng cơ tiến triển, bệnh loạn dưỡng cơ kiểu Becker, bệnh loạn dưỡng cơ Dejerine-Landouzy, bệnh loạn dưỡng cơ Erb, bệnh loạn dưỡng cơ Emery Dreifuss, bệnh loạn dưỡng cơ gốc chi, bệnh loạn dưỡng cơ mắt họng (oculopharyngeal muscular dystrophy - OPMD), bệnh loạn dưỡng cơ mặt-vai-cánh tay, bệnh loạn dưỡng cơ bẩm sinh, bệnh loạn dưỡng cơ sợi trục thần kinh ở trẻ em, bệnh loạn dưỡng tăng trương lực cơ (bệnh Steinert), bệnh loạn dưỡng cơ ngoại biên, bệnh về thớ cơ (nemaline myopathy), chứng liệt định kỳ có tính chất gia đình, bệnh loạn trương lực cơ không loạn dưỡng, chứng liệt định kỳ, bệnh teo cơ tủy (spinal muscular atrophy- SMA), bệnh xơ cứng cột bên teo cơ (amyotrophic lateral sclerosis - ALS), bệnh xơ cứng cột bên nguyên phát (primary lateral sclerosis - PLS), bệnh teo cơ tiến triển (progressive muscular atrophy - PMA), bệnh cơ ngoại biên, bệnh cơ hình ống/nhân trung tâm (myotubular/centronuclear myopathy), bệnh về thớ cơ, đối tượng bị bệnh mini, đối tượng bị bệnh trung tâm, bệnh cơ liên quan đến desmin, bệnh viêm cơ thể vùi, bệnh viêm bì cơ, bệnh viêm đa cơ, bệnh cơ ty thể, hội chứng nhược cơ bẩm sinh, chứng nhược cơ năng, loạn chức năng cơ sau bệnh bại liệt, bệnh cơ do steroit, bệnh cơ do rượu, chứng teo cơ trong thời kỳ phẫu thuật và bệnh thần kinh cơ ICU (bệnh thần kinh cơ do mắc bệnh trầm trọng).

Các bệnh thần kinh và bệnh rễ thần kinh di truyền và mắc phải mà có thể được điều trị bằng các adnectin kháng myostatin bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hội chứng cứng cột sống, bệnh cơ-mắt-não, bệnh thần kinh vận động và cảm giác di truyền, bệnh Carcot-Marie-Tooth, bệnh thần kinh viêm mạn tính, bệnh thần kinh phì đại tiến triển, bệnh thần kinh ngoại biên di truyền dễ liệt do chèn ép (tomaculous neuropathy), bệnh luput, hội chứng Guillain-Barre, mạn tính viêm demyelinating bệnh đa dây thần kinh, bệnh đa xơ cứng, bệnh sacoit, bệnh thần kinh do đái tháo đường, alcoholic bệnh thần

kinh, bệnh liên quan các bệnh thần kinh (ví dụ,., HIV/AIDS, bệnh Lyme), độc tố liên quan các bệnh thần kinh (ví dụ,., heavy kim loại, hóa trị liệu), nén các bệnh thần kinh (ví dụ,., các khối u, entrapment bệnh thần kinh), và các bệnh thần kinh được kết hợp với tổn thương hoặc chấn thương (ví dụ,., cauda loài ngựa hội chứng, liệt chi dưới, liệt tứ chi).

Theo một số phương án, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh loạn dưỡng cơ (ví dụ, bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, bệnh loạn dưỡng cơ kiểu Becker), ALS, và bệnh giảm khối cơ.

Các rối loạn khác liên quan đến hao mòn cơ có thể được điều trị bằng các adnectin kháng myostatin theo sáng chế bao gồm chứng suy mòn, hội chứng hao mòn, bệnh giảm khối cơ, bệnh phổi tắc nghẽn sung huyết, chứng xơ hóa nang (chứng suy mòn phổi), bệnh tim hoặc suy tim (chứng suy mòn tim), bệnh ung thư, hao mòn do AIDS, hao mòn do suy thận, bệnh thận, bệnh khập khiễng, chứng suy mòn liên quan đến sự thẩm tách, chứng ure huyết, bệnh viêm khớp dạng thấp, tổn thương cơ, phẫu thuật, hồi phục cơ tổn thương, tình trạng suy nhược, chứng teo do không dùng đến, bệnh loãng xương, bệnh viêm xương khớp, sự sinh trưởng và hồi phục dây chằng.

Các phương pháp theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để làm tăng thể tích cơ ở các đối tượng bị chứng teo cơ do không dùng đến. Chứng teo do không dùng đến có thể gây ra do nhiều nguyên nhân bao gồm rối loạn hoặc tình trạng bất kỳ dẫn đến bất động hoặc không dùng đến trong thời gian dài, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nằm trên giường trong thời gian dài, phải ngồi xe lăn, bất động chân tay, không sử dụng cơ hoành thông qua việc thông khí cơ học, cấy ghép cơ quan rắn, thay khớp, bệnh đột quỵ, yếu liên quan đến tổn thương CNS, tổn thương tủy sống, hồi phục sau bỏng nặng, thẩm tách máu mạn tính cố định, hồi phục sau chấn thương, hồi phục sau nhiễm trùng máu và tiếp xúc với vi trọng lực (Powers et al., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R337-44).

Ngoài ra, việc tăng tỷ lệ giữa chất béo và cơ liên quan đến tuổi, và chứng teo cơ liên quan đến tuổi dường như liên quan đến myostatin. Ví dụ, protein phản ứng miễn dịch với myostatin huyết thanh trung bình tăng theo tuổi ở các nhóm nam và nữ trẻ tuổi (19-35 tuổi), trung tuổi (36-75 tuổi), và cao tuổi (76-92 tuổi), trong khi khối lượng cơ và khối lượng không chất béo trung bình giảm theo tuổi ở các nhóm này (Yarasheski et al. J Nutr Aging 6(5):343-8 (2002)). Do đó, các đối tượng bị chứng teo cơ do lão hóa, và/hoặc các

đối tượng bị suy nhược do, ví dụ, bệnh giảm khối cơ, cũng sẽ có lợi từ việc điều trị bằng các adnectin kháng myostatin theo sáng chế.

Sáng chế mô tả phương pháp làm tăng khối lượng cơ ở động vật dùng làm thực phẩm bằng cách cho các động vật này dùng các adnectin kháng myostatin với liều hữu hiệu. Do polypeptit myostatin đầu tận cùng C trưởng thành là giống nhau ở tất cả các loài, các adnectin kháng myostatin được mong đợi sẽ làm tăng hiệu quả khối lượng cơ và làm giảm chất béo ở loài bất kỳ quan trọng trong nông nghiệp, ví dụ, nhưng không giới hạn ở, gia súc, gà, gà tây, và lợn.

Hiệu lực của adnectin kháng myostatin trong việc điều trị các rối loạn hao mòn cơ hoặc chứng teo cơ có thể được xác định, ví dụ, bằng một hoặc nhiều phương pháp đo mức tăng khối lượng hoặc thể tích cơ, mức tăng số lượng các tế bào cơ (sự tăng sản), mức tăng kích thước tế bào cơ (chứng phì đại) và/hoặc mức tăng độ bền cơ. Ví dụ, tác dụng làm tăng thể tích cơ của các adnectin kháng myostatin theo sáng chế được minh họa trong các ví dụ được mô tả *dưới đây*. Các phương pháp xác định "khối lượng cơ tăng" là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, hàm lượng cơ có thể được đo trước và sau khi dùng adnectin kháng myostatin theo sáng chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn, như cân dưới nước (xem, ví dụ, Bhasin et al. New Eng. J. Med. (1996) 335:1-7) và phép đo độ hấp thụ tia x năng lượng kép (xem, ví dụ, Bhasin et al. Mol. Endocrinol. (1998) 83:3155-3162). Mức độ tăng kích thước cơ có thể được chứng minh bởi mức tăng khối lượng ít nhất khoảng 5-10%, tốt hơn nếu ít nhất khoảng 10-20% hoặc lớn hơn.

Rối loạn chuyển hóa

Các adnectin kháng myostatin theo sáng chế, làm giảm hoạt tính và/hoặc tín hiệu myostatin, là hữu ích để điều trị rối loạn chuyển hóa, như bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường typ II, bệnh đái tháo đường liên quan đến rối loạn, hội chứng chuyển hóa, và chứng tăng glucoza huyết.

Myostatin có liên quan trong sinh bệnh học của bệnh đái tháo đường typ II. Myostatin được biểu hiện trong mô mỡ và chuột nhắt thiếu myostatin thể hiện sự giảm tích tụ chất béo khi chúng già. Ngoài ra, mức nạp glucoza, mức tích tụ chất béo, và tổng thể trọng được giảm ở chuột lang aguti bị bệnh béo phì và vàng da gây chết thiếu myostatin ($Lep^{ob/ob}$) (Yen et al., *FASEB J.* 8:479, 1994; McPherron et al., 2002). Như được mô tả trong US2011/0008375, các chất đối kháng myostatin có thể làm giảm tỷ lệ

chất béo và cơ trong mô hình chuột lão hóa, bảo tồn khối lượng cơ xương và trọng lượng nạc của cơ thể, và làm giảm chứng phì đại thận ở chuột nhắt bị bệnh đái tháo đường gây ra bởi STZ.

Thuật ngữ "bệnh béo phì" là tình trạng trong đó chất béo dư của cơ thể được tích lũy đến mức mà sức khỏe có thể bị ảnh hưởng tiêu cực. Tình trạng này thường được xác định dưới dạng chỉ số cân nặng cơ thể (body mass index - BMI) bằng 30 kg/m2 hoặc cao hơn, khác biệt với tình trạng thừa cân được xác định khi BMI bằng 25 kg/m2 hoặc cao hơn (xem, ví dụ, World Health Organization (2000) (PDF). Technical report series 894: Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization). Thể trọng dư thừa liên quan đến các bệnh khác nhau, đặc biệt là bệnh tim mạch, bệnh đái tháo đường typ II, ngưng thở khi ngủ do tắc nghẽn, một số loại bệnh ung thư, và bệnh viêm xương khớp.

Đối tượng bị bệnh béo phì có thể được nhận diện, ví dụ, bằng cách xác định BMI (BMI được tính bằng lấy khối lượng cơ thể chia cho bình phương chiều cao), vòng eo và tỷ lệ eo-hông (vòng eo tuyệt đối (>102 cm ở nam và >88 cm ở nữ) và tỷ lệ eo-hông (chu vi eo chia cho chu vi hông >0,9 ở nam và >0,85 ở nữ) (xem, ví dụ, Yusuf S, et al., (2004). Lancet 364: 937-52), và/hoặc tỷ lệ phần trăm chất béo trong cơ thể (tổng chất béo trong cơ thể được tính dưới dạng tỷ lệ phần trăm tổng thể trọng: nam lớn hơn 25% chất béo trong cơ thể và nữ lớn hơn 33% chất béo trong cơ thể là béo phì; tỷ lệ phần trăm chất béo trong cơ thể có thể được ước lượng từ BMI của bản thân bằng công thức sau: % chất béo trong cơ thể = (1,2 * BMI) + (0,23 * tuổi) − 5,4 − (10,8 * giới tính), trong đó giới tính bằng 0 nếu là nữ và bằng 1 nếu là nam). Các kỹ thuật đo tỷ lệ phần trăm chất béo trong cơ thể bao gồm, ví dụ, chụp cắt lớp vi tính (quét CT), chụp ảnh cộng hưởng từ (magnetic resonance imaging - MRI), và đo độ hấp thụ tia X năng lượng kép (dual energy X-ray absorptiometry - DEXA).

Thuật ngữ "bệnh đái tháo đường typ II" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ bệnh mạn tính, kéo dài suốt đời sinh ra khi insulin trong cơ thể không hoạt động hiệu quả. Yếu tố chính của bệnh đái tháo đường typ II là "tính kháng insulin", trong đó insulin được sản xuất bởi tuyến tụy không kết nối được với chất béo và các tế bào cơ để cho phép glucoza bên trong sản sinh năng lượng, gây ra chứng tăng glucoza huyết (glucoza máu cao). Để bù lại, tuyến tụy sản sinh thêm insulin, và các tế bào, nhận biết dòng insulin này, trở nên

kháng hơn, dẫn đến vòng luẩn quẩn của mức glucoza cao và mức insulin cao thường xuyên.

Cụm từ "rối loạn kết hợp với bệnh đái tháo đường" hoặc "rối loạn liên kết với bệnh đái tháo đường" hoặc "rối loạn liên quan đến bệnh đái tháo đường" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các tình trạng bệnh và các bệnh khác thường kết hợp với hoặc liên quan đến bệnh đái tháo đường. Ví dụ về các rối loạn liên quan đến bệnh đái tháo đường bao gồm, ví dụ, chứng tăng glucoza huyết, chứng tăng insulin huyết, chứng tăng lipit huyết, chứng kháng insulin, bệnh giảm chuyển hóa glucoza, bệnh béo phì, bệnh võng mạc do đái tháo đường, bệnh thoái hóa điểm vàng, bệnh đục thuỷ tinh thể, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh xơ hóa tiểu cầu, bệnh thần kinh do đái tháo đường, rối loạn cương, hội chứng tiền kinh nguyệt, chứng tái phát hẹp mạch máu, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh mạch vành tim, bệnh tăng huyết áp, bệnh đau thắt ngực, bệnh nhồi máu cơ tim, bệnh đột quỵ, rối loạn da và mô liên kết, bệnh loét bàn chân, chứng nhiễm axit chuyển hóa, bệnh viêm khớp, và bệnh loãng xương.

Hiệu lực của các adnectin kháng myostatin trong điều trị của rối loạn chuyển hóa có thể được xác định, ví dụ, bằng một hoặc nhiều phương pháp đo mức tăng tính mẫn cảm insulin, tăng hấp thu glucoza bởi các tế bào của đối tượng, giảm nồng độ glucoza máu, và giảm chất béo trong cơ thể.

Ví dụ, ở các đối tượng có bệnh đái tháo đường typ II hoặc đối tượng có nguy cơ phát triển bệnh đái tháo đường, mức HbA1c có thể được giám sát. Thuật ngữ "hemoglobin 1 AC" hoặc "HbA1c" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sản phẩm của quá trình glycat hóa không enzym chuỗi hemoglobin B. Khoảng hàm lượng HbA1c đích mong muốn đối với những người bị bệnh đái tháo đường có thể được xác định theo hướng dẫn của American Diabetes Association (ADA), tức là Standards of Medical Care in Diabetes (*Diabetes Care* 2012;35(Suppl 1):S511-563). Hàm lượng đích của HbA1c phổ biến thường <7,0% đối với những người bị bệnh đái tháo đường, và những người không bị bệnh đái tháo đường thường có giá trị HbA1c nhỏ hơn 6%. Do đó, hiệu lực của các adnectin kháng myostatin theo sáng chế có thể được xác định bởi mức giảm hàm lượng HBA1c quan sát được ở đối tượng.

Các phương pháp theo sáng chế còn bao gồm việc dùng adnectin kháng myostatin đơn lẻ, hoặc kết hợp với các chất khác đã biết trong lĩnh vực để kiểm soát đường huyết

(ví dụ, insulin, GLP1) hoặc để điều trị các biến chứng liên quan đến bệnh đái tháo đường đã biết trong lĩnh vực.

Các rối loạn khác

Chuột nhắt bất hoạt gen myostatin biểu hiện tăng khối lượng cơ, cũng như tăng hàm lượng và mật độ chất khoáng của xương cánh tay chuột nhắt, và tăng hàm lượng chất khoáng của cả xương xốp lẫn xương đặc ở các vùng mà cơ gắn vào (Hamrick et al. *Calcif Tissue Intl* 2002;71:63-8). Điều này gợi ý rằng việc tăng khối lượng cơ có thể giúp cải thiện độ bền xương và làm giảm bệnh loãng xương và các bệnh thoái hóa xương khác.

Các bệnh hoặc các rối loạn khác mà các adnectin kháng myostatin theo sáng chế là hữu ích bao gồm liền vết thương, bệnh kháng xơ hóa, hội chứng Lambert-Eaton, và bệnh Parkinson.

Phương pháp điều trị kết hợp

Các adnectin kháng myostatin được đề cập đến trong bản mô tả này có thể được sử dụng kết hợp với các chất chống đái tháo đường, các chất chống tăng glucoza huyết, các chất chống tăng insulin huyết, các chất chống bệnh võng mạc, các chất chống bệnh thần kinh, các chất chống thoái hóa thần kinh, các chất chống bệnh thận, các chất chống xơ vữa động mạch, các chất chống thiếu máu cục bộ, các chất chống tăng huyết áp, các chất chống béo phì, các chất chống rối loạn lipit máu, các chất chống rối loạn lipit máu, các chất chống tăng lipit máu, các chất chống tăng triglyxerit huyết, các chất chống tăng cholesterol máu, các chất chống tái phát hẹp, các chất chống bệnh tụy, các chất làm giảm lipit, các chất gây chán ăn, các chất tăng cường trí nhớ, các chất chống sa sút trí tuệ, hoặc các chất làm tăng nhận thức, các thuốc làm giảm cảm giác thèm ăn, các thuốc điều trị phục hồi thần kinh hoặc cơ, điều trị bệnh suy tim, điều trị bệnh động mạch ngoại biên và các chất chống viêm.

Các chất chống đái tháo đường được sử dụng kết hợp với các adnectin kháng myostatin bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất kích thích bài tiết insulin hoặc chất nhạy cảm với insulin, chất điều hòa thụ thể GPR40, hoặc các chất chống đái tháo đường khác. Các chất này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất ức chế dipeptidyl peptidaza IV (DP4) (ví dụ, sitagliptin, saxagliptin, alogliptin, vildagliptin và các chất tương tự), biguanide (ví dụ, metformin, phenformin và các chất tương tự), sulfonyl ure (ví dụ,

gliburide, glimepiride, glipizide và các chất tương tự), chất ức chế glucosidaza (ví dụ, acarbose, miglitol, và các chất tương tự), chất chủ vận PPARγ như thiazolidindion (ví dụ, rosiglitazone, pioglitazone, và các chất tương tự), chất chủ vận kép PPAR α/γ (ví dụ, muraglitazar, tesaglitazar, aleglitazar, và các chất tương tự), chất hoạt hóa glucokinaza (như được mô tả trong Fyfe et al., *Drugs of the Future*, 34(8):641-653 (2009) và được hợp nhất vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), chất điều hòa thụ thể GPR119 (MBX-2952, PSN821, APD597 và các chất tương tự), chất ức chế SGLT2 (dapagliflozin, canagliflozin, remagliflozin và các chất tương tự), chất tương tự amylin như pramlintide, và/hoặc insulin. Việc xem xét các phương pháp điều trị hiện có và đang nghiên cứu để điều trị bệnh đái tháo đường có thể được tìm thấy trong: Mohler et al., *Medicinal Research Reviews*, 29(1):125-195 (2009), và Mizuno et al., *Current Medicinal Chemistry*, 15:61-74 (2008).

Các adnectin kháng myostatin theo sáng chế cũng có thể tùy ý được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều chất làm giảm hấp thu thức ăn như diethylpropion, phendimetrazine, phentermine, orlistat, sibutramin, lorcaserin, pramlintide, topiramate, chất đối kháng thụ thể MCHR1, oxyntomodulin, naltrexon, Amylin peptit, chất điều hòa thụ thể NPY Y5, chất điều hòa thụ thể NPY Y2, chất điều hòa thụ thể NPY Y4, cetilistat, chất điều hòa thụ thể 5HT2c, và các chất tương tự. Các adnectin kháng myostatin theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với chất chủ vận của thụ thể peptit-1 tương tự glucagon (glucagon-like peptide-1 receptor - GLP-1 R), như exenatide, liraglutide, GPR-1(1-36) amit, GLP-1(7-36) amit, GLP-1(7-37) (như được mô tả trong patent Mỹ số 5,614,492 của Habener, nội dung của patent đó được hợp nhất vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), có thể được sử dụng bằng cách tiêm, dùng trong mũi, hoặc bằng dụng cụ qua da hoặc má. Việc xem xét các phương pháp điều trị hiện có và đang nghiên cứu để điều trị bệnh béo phì có thể được tìm thấy trong: Melnikova et al., *Nature Reviews Drug Discovery*, 5:369-370 (2006); Jones, *Nature Reviews: Drug Discovery*, 8:833-834 (2009); Obici, *Endocrinology*, 150(6):2512-2517 (2009); và Elangbam, *Vet. Pathol.*, 46(1):10-24 (2009).

Các adnectin kháng myostatin theo sáng chế cũng có thể được sử dụng với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung, khi thích hợp đối với bệnh hoặc rối loạn cụ thể cần điều trị. Các ví dụ không giới hạn về các chất bổ sung bao gồm các chất hữu ích để điều trị rối

loạn chuyển hóa như bệnh đái tháo đường typ II và bệnh giảm khối cơ và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, GLP-1, thụ thể tương tự GLP-1, amylin, và FGF21; các chất hữu ích để điều trị bệnh chống xơ hóa, bệnh thần kinh cơ, bệnh tế bào thần kinh vận động, và bệnh giảm khối cơ và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ghrelin, SARM, Riluzole, testosteron, vàrogen, hormon tăng trưởng, phương pháp điều trị hormon thay thế, chất ức chế COX-2, chất hoạt hóa troponin, chất chủ vận β2, CTLA4-Ig (ví dụ, abetacept, belatacept) và các kháng thể kháng TGFβ; các chất hữu ích để điều trị chứng suy mòn và các hội chứng hao mòn khác và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất ức chế kinaza thụ thể TGFβ, ljác IL-6, và chất ức chế ubiquitin-proteasom; các chất hữu ích để điều trị chứng chuột rút liên quan đến bệnh loạn trương lực cơ và PLS bao gồm, nhưng không giới hạn ở phytoin, quinin, Baclofen và tizanidine; các chất hữu ích đối với các bệnh thần kinh bao gồm thuốc chống trầm cảm (ví dụ, các thuốc chống trầm cảm ba vòng và chất ức chế tái thấp thu serotonin-norepinephrin (serotonin-norepinephrine re-uptake inhibitor - SNRI's) chọn lọc), thuốc chống co giật, cannbinoid, botulinum độc tố loại A, chất đối kháng NMDA (ví dụ, ketamin), thực phẩm bổ sung (ví dụ, axit alpha lipoic và benfotiamine); các chất hữu ích để điều trị các bệnh thần kinh viêm mạn tính bao gồm, nhưng không giới hạn ở, corticosteroit, globulin miễn dịch trong tĩnh mạch, và thuốc ức chế miễn dịch (ví dụ, xyclophosphamit, ciclosporin, azathiprine, mycophenolat mofetil, globulin kháng thymocyte, rituximab); và các chất hữu ích để điều trị hội chứng Guillain Barré, bệnh giảm khối cơ, gãy xương, và mất xương và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Boniva (ibandronate) và PTH.

Các adnectin kháng myostatin theo sáng chế có thể được sử dụng với một hoặc nhiều chất bổ sung được sử dụng trong điều trị triệu chứng. Các ví dụ không giới hạn về các chất để điều trị triệu chứng của ALS bao gồm chất hoạt hóa lỗ bán thấm của màng trong ty thể (mitochondrial permeability transition - MPT), chất hoạt hóa troponin xương nhanh, chất điều hòa đại thực bào (ví dụ, NP001), chất điều trị bệnh dự trữ lysosom (ví dụ, NP003), và chất đối kháng thụ thể axetylcholin nicotinic (nicotinic acetylcholine receptor - nAchR) . Ví dụ không giới hạn về các chất bổ sung để sử dụng trong điều trị các triệu chứng của DMD/BMD là chất làm tăng hàm lượng ATP.

Các adnectin kháng myostatin theo sáng chế cũng có thể được sử dụng với một hoặc nhiều chất bổ sung được sử dụng trong phương pháp điều trị thay đổi bệnh. Các ví

dụ không giới hạn về các chất để điều trị ALS bao gồm chất loại bỏ gốc tự do (ví dụ, edaravone (norphenazone), CV-3611), chất chủ vận VEGF (ví dụ, sNN0029), Nogo-A protein I (ví dụ, GSK122324), chất ức chế SOD1 (ví dụ, ISIS-SOD1Rx) , và chất ức chế PGE syntaza 1 (ví dụ, AAD-2004). Các ví dụ không giới hạn về các chất để điều trị DMD/BMD bao gồm các chất thúc đẩy cách quãng exon (ví dụ, các phân tử đối mã như drisapersen (PRO051/GSK2402968), PRO044, Eteplirsen, AVI-4658, AVI-5038, Ataluren (PTC124)), các chất trị liệu gen, chất chống viêm (ví dụ, CRD007), và chất chống xơ hóa (ví dụ, HT-100).

Như đã mô tả trên đây, các chất thúc đẩy cách quãng exon có thể được sử dụng kết hợp với các adnectin kháng myostatin theo sáng chế để điều trị bệnh loạn dưỡng cơ của Duchenne và bệnh loạn dưỡng cơ kiểu Becker. Ví dụ về các exon đặc hiệu có thể hướng đích phục hồi dystrophin chức năng bao gồm các exon 7, 8, 17, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 53, và 55 (xem, ví dụ, Lu et al., *Molecular Therapy* 2011;19:9-15). Theo một số phương án, nhiều hơn một chất, ví dụ, các oligonucleotit đối mã, có thể được sử dụng để gây ra cách quãng nhiều exon.

IX. Dược phẩm

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa adnectin kháng myostatin hoặc protein dung hợp của nó được mô tả trong bản mô tả này, trong đó dược phẩm này hầu như không chứa nội độc tố, hoặc ít nhất chứa nội độc tố không quá hàm lượng chấp nhận được khi được xác định bởi cơ quan quản lý thích hợp (ví dụ, FDA).

Dược phẩm theo sáng chế có thể ở dạng viên tròn, viên nén, viên nang, thuốc lỏng, hoặc viên nén giải phóng kéo dài để dùng qua đường miệng; dạng lỏng để dùng trong tĩnh mạch, dưới da hoặc ngoài đường tiêu hóa; hoặc gel, thuốc xức, thuốc mỡ, kem, hoặc polyme hoặc hệ giải phóng kéo dài khác để dùng tại chỗ.

Các phương pháp đã biết trong lĩnh vực để bào chế dược phẩm có thể tìm thấy, ví dụ, trong "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20th ed., ed. A. R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.). Chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa có thể, ví dụ, chứa tá dược, nước vô trùng, nước muối, polyalkylen glycol như polyetylen glycol, dầu có nguồn gốc thực vật, hoặc naptalen được hyđro hóa. Polyme lactit dễ phân huỷ sinh học và tương hợp sinh học, copolyme lactit/glycolit, hoặc copolyme polyoxyetylen-polyoxypropylen có thể được sử dụng để

kiểm soát việc giải phóng hợp chất. Dược phẩm dạng hạt nano (ví dụ, hạt nano dễ phân huỷ sinh học, hạt nano lipit rắn, liposom) có thể được sử dụng để kiểm soát sự phân phối sinh học của hợp chất. Các hệ phân phối ngoài đường tiêu hóa có thể hữu ích khác bao gồm các hạt copolyme etylen-vinyl axetat, bơm thẩm thấu, các hệ tiêm truyền cấy được dưới da, và liposom. Nồng độ hợp chất trong dược phẩm thay đổi tùy thuộc vào một số yếu tố, bao gồm liều thuốc cần dùng, và đường dùng.

Các chất mang, tá dược, hoặc chất ổn định có thể chấp nhận là không độc với thể nhận ở liều dùng và nồng độ được sử dụng, và bao gồm các dung dịch đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và metionin; chất bảo quản (như octađexylđimetylbenzyl amoni clorua; hexametoni clorua; benzalkoni clorua, benzethoni clorua; phenol, rượu butyl hoặc benzyl; các alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorcinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); các polypeptit có khối lượng phân tử thấp (nhỏ hơn 10 gốc); protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; polyme thân nước như polyvinylpyroliđon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histiđin, arginin, hoặc lysin; monosacarit, đisacarit, và các hyđrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc đextran; tác nhân tạo chelat như EDTA; đường như sucroza, manitol, trehaloza hoặc sorbitol; các đối ion tạo muối như natri; các phức hợp kim loại (chẳng hạn, phức hợp Zn-protein); và/hoặc chất diện hoạt không ion hóa như Tween, PLURONIC™ hoặc polyetylen glycol (PEG).

Các polypeptit theo sáng chế có thể tùy ý được sử dụng dưới dạng muối dược dụng, như muối cộng axit không độc hoặc phức kim loại thường được sử dụng trong ngành công nghiệp dược phẩm. Ví dụ về các muối cộng axit bao gồm các axit hữu cơ như axit acetic, lactic, pamoic, maleic, xitric, malic, ascorbic, sucxinic, benzoic, palmitic, suberic, salixylic, tartaric, metansulfonic, toluensulfonic, hoặc trifloaxetic hoặc các axit tương tự; các axit polyme như axit tanic, carboxymetyl xenluloza, hoặc các axit tương tự; và các axit vô cơ như axit clohydric, axit bromhydric, axit sunfuric, axit phosphoric, hoặc các axit tương tự. Các phức kim loại bao gồm kẽm, sắt, và các chất tương tự. Theo một ví dụ, polypeptit được bào chế với sự có mặt của natri axetat để làm tăng độ ổn định nhiệt.

Các hoạt chất cũng có thể được giữ trong vi nang được bào chế bằng, ví dụ, kỹ thuật đông tụ hoặc bằng polyme hóa mặt phân cách, ví dụ, vi nang hyđroxymetylxenluloza hoặc gelatin và vi nang poly-(metylmetaxylat), tương ứng, trong

hệ phân phối thuốc keo (ví dụ, liposom, albumin, vi cầu, vi nhũ tương, tiểu phân có kích thước nano và nang có kích thước nano) hoặc trong nhũ tương thô. Các kỹ thuật này được mô tả trong Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Các dược phẩm giải phóng kéo dài có thể được bào chế. Các ví dụ thích hợp về dược phẩm giải phóng kéo dài bao gồm chất nền bán thấm của các polyme rắn kỵ nước chứa protein theo sáng chế, chất nền này ở dạng vật có hình dạng, ví dụ, màng mỏng, hoặc vi nang. Ví dụ về các chất nền giải phóng kéo dài bao gồm polyeste, hydrogel (ví dụ, poly(2-hyđroxyetyl-metacrylat), hoặc poly(rượu vinyl)), polylactit (patent Mỹ số 3,773,919), copolyme của axit L-glutamic và etyl-L-glutamat, etylen-vinyl axetat không bị phân hủy, copolyme axit lactic-axit glycolic có thể dễ phân hủy như LUPRON DEPOT™ (vi cầu để tiêm gồm copolyme axit lactic-axit glycolic và leuprolide axetat), và axit poly-D-(-)-3-hyđroxybutyric. Trong khi các polyme như etylen-vinyl axetat và axit lactic-axit glycolic có thể làm giải phóng các phân tử trong trên 100 ngày, thì một số hydrogel giải phóng các protein trong khoảng thời gian ngắn hơn. Khi các protein kết nang theo sáng chế có thể còn lại trong cơ thể trong thời gian dài, chúng có thể biến tính hoặc kết tụ như kết quả của việc phơi ẩm ở nhiệt độ 37°C, dẫn đến mất hoạt tính sinh học và có thể thay đổi khả năng miễn dịch. Các phương pháp hợp lý có thể được đặt ra để làm ổn định tùy thuộc vào cơ chế được bao gồm. Ví dụ, nếu cơ chế kết tụ được phát hiện để hình thành liên kết S-S nội phân tử qua sự trao đổi thio-đisulfua, có thể đạt được sự ổn định bằng cách biến đổi các gốc sulfhydryl, đông khô từ dung dịch axit, kiểm soát hàm ẩm, sử dụng các chất phụ gia thích hợp, và phát triển các chế phẩm nền polyme đặc hiệu.

Dược phẩm theo sáng chế để dùng qua đường miệng bao gồm viên nén chứa (các) hoạt chất trong hỗn hợp với các tá dược dược dụng không độc. Các tá dược này có thể là, ví dụ, các chất pha loãng hoặc các chất độn trơ (ví dụ, sucroza và sorbitol), chất làm trơn chảy, chất trơn chảy, và chất chống kết dính (ví dụ, magie stearat, kẽm stearat, axit stearic, silic oxit, dầu thực vật được hyđro hóa, hoặc talc). Dược phẩm để dùng qua đường miệng cũng có thể được bào chế dưới dạng viên nhai, hoặc dưới dạng nang gelatin cứng trong đó hoạt chất được trộn với chất pha loãng dạng rắn trơ, hoặc dưới dạng nang gelatin mềm trong đó hoạt chất được trộn với nước hoặc môi trường dầu.

Dược phẩm để dùng *in vivo* thường phải vô trùng. Điều này có thể được thực hiện bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Khi dược phẩm được đông khô, việc tiệt trùng bằng cách sử dụng phương pháp này có thể được tiến hành trước hoặc sau khi đông khô và hoàn nguyên. Dược phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được bảo quản ở dạng đông khô hoặc dạng dung dịch. Ngoài ra, dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa thường được đặt trong vật chứa có cổng truy nhập vô trùng, ví dụ, túi đựng dịch truyền dùng trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút có thể xuyên qua bằng kim tiêm dưới da.

Ngay khi dược phẩm được bào chế, nó có thể được bảo quản trong các lọ vô trùng dưới dạng dung dịch, huyền phù, gel, nhũ tương, dạng rắn, hoặc bột được loại nước hoặc được đông khô. Các sản phẩm này có thể được bảo quản ở dạng dùng ngay hoặc dạng (ví dụ, đông khô) cần hoàn nguyên trước khi dùng.

Dược phẩm trong tài liệu này cũng có thể chứa nhiều hơn một hoạt chất nếu cần cho các chỉ định điều trị cụ thể, tốt hơn nếu chúng có các hoạt tính bổ sung không tác động bất lợi đến nhau. Các phân tử này có mặt thích hợp trong hỗn hợp với lượng có hiệu quả cho mục đích đã định.

X. Sử dụng

Dược phẩm chứa adnectin kháng myostatin theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng có nguy cơ hoặc biểu hiện các bệnh như được mô tả trong bản mô tả này bằng các kỹ thuật dùng chuẩn bao gồm dùng qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, phổi, qua da, trong cơ, trong mũi, má, dưới lưỡi, hoặc thuốc đặt. Tốt hơn nếu, việc dùng các adnectin kháng myostatin theo sáng chế là dùng ngoài đường tiêu hóa. Thuật ngữ "dùng ngoài đường tiêu hóa", được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trực tràng, âm đạo, hoặc trong màng bụng. Việc phân phối toàn thân ngoại biên bằng cách tiêm trong tĩnh mạch hoặc trong màng bụng hoặc dưới da là được ưu tiên.

Liều hữu hiệu trị liệu được sử dụng trong bản mô tả để chỉ liều tạo ra tác dụng điều trị bệnh cho đối tượng được sử dụng. Lượng hữu hiệu của dược phẩm cần dùng để điều trị sẽ phụ thuộc vào, ví dụ, trường hợp điều trị và mục tiêu. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này kỹ thuật này sẽ hiểu rằng hàm lượng liều thích hợp để điều trị sẽ thay đổi tùy thuộc, một phần, vào phân tử được phân phối, chỉ định mà phân tử

chất gắn kết được sử dụng, đường dùng, và kích thước (thể trọng, bề mặt cơ thể hoặc kích thước cơ quan) và tình trạng (tuổi và sức khỏe tổng quát) của đối tượng bị bệnh.

Ví dụ, liều hữu hiệu trị liệu có thể được ước lượng ban đầu trong thử nghiệm môi trường nuôi cấy tế bào hoặc trong mô hình động vật như chuột nhắt, chuột cống, thỏ, chó, lợn, hoặc khỉ. Mô hình động vật cũng có thể được sử dụng để xác định khoảng nồng độ thích hợp và đường dùng. Sau đó, thông tin này có thể được sử dụng để xác định các liều hữu ích và các đường để dùng cho người.

Liều chính xác sẽ được xác định khi xem xét các yếu tố liên quan đến đối tượng cần điều trị, và có thể biết chắc bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn. Liều và việc dùng được điều chỉnh để tạo ra hàm lượng hoạt chất đủ hoặc để duy trì tác dụng mong muốn. Các yếu tố có thể được tính đến bao gồm mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh, sức khỏe tổng quát của đối tượng, tuổi, cân nặng, và giới tính của đối tượng, thời gian và tần suất dùng, (các) kết hợp thuốc, độ mẫn cảm phản ứng, và đáp ứng với trị liệu. Nhìn chung, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 50mg/kg mỗi ngày, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 30mg/kg mỗi ngày, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 20mg/kg mỗi ngày. Theo một số phương án, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế được sử dụng ở các liều hằng tuần nằm trong khoảng từ 1 đến 50mg, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 10 đến 50mg. Theo các phương án khác, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế được sử dụng ở các liều hằng tháng nằm trong khoảng từ 30 đến 200mg, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 50 đến 150mg, và tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 60 đến 120mg.

Tần suất liều sẽ phụ thuộc vào các thông số dược động học của phân tử chất gắn kết trong sản phẩm được sử dụng. Thông thường, dược phẩm được sử dụng cho đến khi liều tiến tới đạt được tác dụng mong muốn. Do đó, dược phẩm này có thể được sử dụng dưới dạng một liều hoặc dưới dạng nhiều liều (ở các nồng độ/liều giống hoặc khác nhau)o thời gian, hoặc dưới dạng tiêm truyền liên tục. Việc chính xác hóa hơn nữa liều thích hợp được thực hiện thường xuyên. Các liều thích hợp có thể biết chắc thông qua việc sử dụng dữ liệu đáp ứng liều thích hợp. Ví dụ, adnectin kháng myostatin có thể được sử dụng hằng ngày (ví dụ, một lần, hai lần, ba lần, hoặc bốn lần mỗi ngày) hoặc ít thường xuyên hơn (ví dụ, hai ngày một lần, một lần hoặc hai lần một tuần, hoặc hằng tháng).

Ngoài ra, như đã biết trong lĩnh vực này, việc điều chỉnh theo tuổi cũng như thể trọng, sức khỏe tổng quát, giới tính, chế độ ăn, thời gian dùng, tương tác thuốc, và mức độ nghiêm trọng của bệnh có thể cần thiết, và sẽ có thể biết được bằng thử nghiệm thường quy bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này kỹ thuật này. Adnectin kháng myostatin được sử dụng thích hợp cho đối tượng bị bệnh ở một thời điểm hoặc qua một đợt điều trị.

Việc dùng adnectin kháng myostatin hoặc thể dung hợp của nó, và một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung, dù được sử dụng đồng thời hoặc được sử dụng lần lượt, có thể được thực hiện như đã nêu trên nhằm các ứng dụng điều trị bệnh. Các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rằng các chất mang, chất pha loãng, và các tá dược dược dụng thích hợp để dùng đồng thời sẽ phụ thuộc vào việc xác định chất trị liệu cụ thể được sử dụng.

XI. Các phương pháp phát hiện và chẩn đoán

Các adnectin kháng myostatin theo sáng chế cũng hữu ích trong nhiều ứng dụng chẩn đoán. Ví dụ, adnectin kháng myostatin theo sáng chế có thể được sử dụng để chẩn đoán rối loạn hoặc bệnh liên quan đến tăng hàm lượng myostatin. Theo cách tương tự, adnectin kháng myostatin có thể được sử dụng trong thử nghiệm để giám sát hàm lượng myostatin ở đối tượng cần điều trị đối với tình trạng bệnh liên quan đến myostatin. Các adnectin kháng myostatin có thể được sử dụng mà có hoặc không được biến đổi, và được đánh dấu bằng gắn kết đồng hóa trị hoặc không đồng hóa trị của nhóm dễ phát hiện. Nhóm dễ phát hiện có thể là nhóm bất kỳ có thể tạo ra, trực tiếp hoặc gián tiếp, tín hiệu dễ phát hiện. Ví dụ, nhóm dễ phát hiện có thể là đồng vị phóng xạ, như H3, C14 hoặc 13, P32, S35, hoặc 1131; hợp chất huỳnh quang hoặc phát quang hóa học, như floresxein isothioxyanat, rođamin, hoặc luciferin; hoặc enzym, như phosphataza kiềm, beta-galactosiđaza hoặc peroxiđaza củ cải ngựa.

Phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực để tiếp hợp protein với nhóm dễ phát hiện có thể được sử dụng, bao gồm các phương pháp được mô tả bởi Hunter, et al., *Nature* 144:945 (1962); David, et al., *Biochemistry* 13:1014 (1974); Pain, et al., *J. Immunol. Meth.* 40:219 (1981); và Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30:407 (1982). Các phương pháp *in vitro* bao gồm hóa học tiếp hợp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm hóa học tương hợp với protein, như hóa học đối với các axit amin đặc hiệu, như Cys và

Lys. Để liên kết nhóm (như PEG) với protein theo sáng chế, nhóm liên kết hoặc nhóm phản ứng được sử dụng. Các nhóm liên kết thích hợp là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm nhóm đisulfua, nhóm thioete, nhóm không bền với axit, nhóm không bền với ánh sáng, nhóm không bền với peptidaza và nhóm không bền với esteraza. Các nhóm liên kết được ưu tiên là nhóm đisulfua và nhóm thioete, tuỳ thuộc vào ứng dụng. Đối với các polypeptit không có axit amin Cys, thì Cys có thể được xử lý kỹ thuật ở vị trí để cho phép hoạt tính của protein vẫn tồn tại trong khi tạo ra vị trí tiếp hợp.

Các adnectin kháng myostatin được liên kết với nhóm dễ phát hiện cũng hữu ích để tạo ảnh *in vivo*. Polypeptit có thể được liên kết với chất chắn phóng xạ hoặc đồng vị phóng xạ, được sử dụng cho đối tượng, tốt hơn nếu trong dòng máu, và sự có mặt và vị trí của protein được đánh dấu ở đối tượng được thử nghiệm. Kỹ thuật tạo ảnh này là hữu ích trong việc xác định giai đoạn và điều trị khối u ác tính. Protein này có thể được đánh dấu bằng nhóm bất kỳ dễ phát hiện ở đối tượng, bằng cộng hưởng từ hạt nhân, công nghệ x quang, hoặc các cách phát hiện khác đã biết trong lĩnh vực.

Các adnectin kháng myostatin cũng hữu ích làm các chất tinh chế ái lực. Trong quy trình này, các polypeptit được giữ cố định trên chất mang thích hợp, như nhựa Sephadex hoặc giấy lọc, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Các adnectin kháng myostatin có thể được sử dụng trong phương pháp thử nghiệm đã biết bất kỳ, như thử nghiệm gắn kết cạnh tranh, thử nghiệm kẹp trực tiếp và gián tiếp, và thử nghiệm kết tủa miễn dịch (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện phân tử đích trong mẫu. Phương pháp này có thể bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc với các adnectin kháng myostatin được đề cập đến trong bản mô tả này, trong đó việc tiếp xúc này được thực hiện dưới các điều kiện cho phép tạo ra phức hợp adnectin kháng myostatin-đích; và phát hiện phức hợp này, từ đó phát hiện ra đích trong mẫu. Việc phát hiện có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, chụp tia X, thử nghiệm miễn dịch, phát hiện huỳnh quang, phổ khối, hoặc cộng hưởng plasmon bề mặt. Mẫu có thể là từ người hoặc động vật có vú khác. Các adnectin kháng myostatin có thể được đánh dấu bằng nhóm đánh dấu, như nhóm phóng xạ, nhóm huỳnh quang, nhóm sinh

màu, nhóm phát quang hóa học, hoặc nhóm hapten. Các adnectin kháng myostatin có thể được giữ cố định trên chất mang rắn.

XII. Kit và sản phẩm sản xuất

Adnectin kháng myostatin theo sáng chế có thể được cung cấp trong kit, tổ hợp bao gói gồm các chất phản ứng với các lượng định trước cùng với hướng dẫn sử dụng trong các phương pháp trị liệu hoặc chẩn đoán theo sáng chế.

Ví dụ, theo một phương án, sáng chế đề cập đến sản phẩm sản xuất chứa các nguyên liệu hữu ích để điều trị hoặc phòng ngừa các rối loạn hoặc các tình trạng bệnh nêu trên. Sản phẩm sản xuất này bao gồm vật chứa và chất đánh dấu. Các vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, bơm tiêm, và ống nghiệm. Các vật chứa có thể được tạo ra từ nhiều nguyên liệu như thủy tinh hoặc nhựa. Vật chứa chứa dược phẩm theo sáng chế có hiệu quả để phòng ngừa hoặc điều trị rối loạn hoặc tình trạng bệnh và có thể có cổng truy nhập vô trùng (ví dụ, vật chứa này có thể là túi đựng dịch truyền tĩnh mạch hoặc lọ có nắp có thể xuyên qua bằng kim tiêm dưới da). Hoạt chất trong dược phẩm là adnectin kháng myostatin theo sáng chế. Nhãn ở trên, hoặc liên kết với, vật chứa chỉ ra rằng dược phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh được chọn. Sản phẩm sản xuất có thể bao gồm vật chứa thứ hai chứa dung dịch đệm dược dụng, như dung dịch đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch đextroza. Sản phẩm này còn có thể bao gồm các vật khác theo mục đích thương mại và quan điểm của người sử dụng, bao gồm các dung dịch đệm khác, chất pha loãng, chất độn, kim tiêm, xi lanh, và tờ gắn kèm để hướng dẫn sử dụng.

Tất cả các tài liệu và các tài liệu tham khảo, bao gồm các tài liệu patent và các trang web, được nêu trong bản mô tả này được hợp nhất riêng biệt bằng cách viện dẫn vào bản mô tả này ở phạm vi giống như thể các tài liệu đó được viết đầy đủ hoặc một phần vào bản mô tả này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả thông qua các ví dụ sau, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và không được dự định làm giới hạn sáng chế. Tuy sáng chế được mô tả chi tiết và viện dẫn đến các phương án thực hiện cụ thể của nó, nhưng các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này kĩ thuật này sẽ thấy rõ rằng có thể có nhiều thay đổi và cải biến khác nhau mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1 - Sản xuất protein

Sản xuất protein có hiệu suất cao (High Throughput Protein Production - HTPP)

Chất gắn kết được chọn được tách dòng vào vectơ PET9d nằm trước HIS_6tag và biến nạp vào tế bào *E.coli* BL21 DE3 plysS, được gây nhiễm trong 5mL môi trường LB chứa 50µg/mL kanamycin trong đĩa 24 giếng và được phát triển ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Việc nuôi cấy 5mL môi trường LB mới (50µg/mL kanamycin) được chuẩn bị để biểu hiện cảm ứng bằng cách hút 200µL từ môi trường nuôi cấy qua đêm và rót vào trong giếng thích hợp. Môi trường nuôi cấy được phát triển ở nhiệt độ 37°C cho đến khi A_{600} bằng 0,6-0,9. Sau khi cảm ứng bằng 1mM isopropyl-β-thiogalactoside (IPTG), môi trường nuôi cấy được biểu hiện trong 6 giờ ở nhiệt độ 30°C và thu nhận bằng cách ly tâm trong 10 phút ở 2750 g ở nhiệt độ 4°C.

Các hạt tế bào (trong đĩa 24 giếng) được dung giải bằng cách tạo hỗn dịch lại trong 450µl dung dịch đệm gây tan (50mM NaH_2PO_4, 0,5M NaCl, 1x hỗn hợp chất ức chế proteaza hoàn chỉnh không chứa EDTA (Complete ™ Protease Inhibitor Cocktail-EDTA free) (Roche), 1mM PMSF, 10mM CHAPS, 40mM imidazol, 1mg/mL lysozym, 30µg/mL deoxyribonucleaza, 2µg/mL aprotonin, độ pH=8,0) và lắc ở nhiệt độ phòng trong 1-3 giờ. Dịch tan được làm trong và đưa lại vào trong đĩa 96 giếng bằng cách chuyển vào trong Whatman GF/D Unifilter 96 giếng được lắp đĩa hãm 96 giếng, 1,2mL và được lọc bằng áp lực dương. Dịch tan trong được chuyển sang đĩa tạo chelat bằng niken hoặc coban 96 giếng đã được làm cân bằng bằng dung dịch đệm cân bằng (50mM NaH_2PO_4, 0,5M NaCl, 40mM imidazol, độ pH=8,0) và ủ trong 5 phút. Nguyên liệu hông gắn kết được loại bỏ bằng áp lực dương. Nhựa được rửa hai lần bằng 0,3mL/giếng bằng dung dịch đệm rửa #1 (50mM NaH_2PO_4, 0,5M NaCl, 5mM CHAPS, 40mM imidazol, độ pH=8,0). Mỗi dịch rửa được loại bỏ bằng áp lực dương. Trước khi rửa giải, mỗi giếng được rửa bằng 50µL dung dịch đệm rửa giải (PBS + 20mM EDTA), ủ trong 5 phút, và dịch rửa này được loại bỏ bằng áp lực dương. Protein được rửa giải bằng cách đưa thêm 100µL dung dịch đệm rửa giải vào mỗi giếng. Sau 30 phút ủ ở nhiệt độ phòng, (các) đĩa được ly tâm trong 5 phút ở 200 g và rửa giải protein thu được trong các đĩa hãm 96 giếng chứa 5µlmgCl_2 0,5M được bổ sung vào đáy của đĩa hãm rửa giải trước khi rửa giải. Protein rửa giải được được định lượng bằng cách sử dụng thử nghiệm toàn bộ protein với miền ^{10}Fn3 thể dại làm protein chuẩn.

Sự biểu hiện và tinh chế chất gắn kết protein có khung trên cơ sở fibronectin không tan

Để biểu hiện, các dòng chọn được, tiếp theo là HIS_6tag, được tách dòng vào vectơ pET9d và được biểu hiện trong tế bào *E.coli* BL21 DE3 plysS. Hai mươimL môi trường nuôi cấy gây nhiễm (được tạo ra từ một khuẩn lạc đĩa) được sử dụng để gây nhiễm 1L môi trường LB hoặc môi trường biểu hiện qua đêm TB (tự cảm ứng) chứa 50µg/mL Kanamycin và 34µg/mL chloramphenicol. Môi trường nuôi cấy trong môi trường LB được ủ ở nhiệt độ 37°C cho đến khi A_{600} nằm trong khoảng 0,6-1,0, ở thời điểm đó, chúng được cảm ứng bằng 1mM isopropyl-β-thiogalactoside (IPTG) và được phát triển trong 4 giờ ở nhiệt độ 30°C. Môi trường nuôi cấy được phát triển trong môi trường biểu hiện qua đêm TB được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5 giờ, ở thời điểm đó, nhiệt độ được hạ thấp xuống 18°C và được phát triển trong 19 giờ. Môi trường nuôi cấy được thu bằng cách ly tâm trong 30 phút ở tốc độ ≥10000 g ở nhiệt độ 4°C. Các hạt tế bào được đông lạnh ở nhiệt độ -80°C. Sau khi làm tan, các hạt tế bào được tạo hỗn dịch lại trong 25mL dung dịch đệm gây tan (20mM NaH_2PO_4, 0,5M NaCl, 1x hỗn hợp chất ức chế proteaza ™ hoàn chỉnh không chứa EDTA (Roche), độ pH=7,4) bằng cách sử dụng thiết bị đồng nhất hóa Ultra-turrax (IKA works) trên đá. Việc gây tan bào đạt được bằng cách đồng nhất hóa ở áp suất cao (≥18.000 psi) bằng cách sử dụng Model M-110S Microfluidizer (Microfluidics). Phần không tan được tách bằng cách ly tâm trong 30 phút ở ≥23,300 g ở nhiệt độ 4°C. Hạt không tan thu lại từ việc ly tâm dịch tan được rửa bằng 20mM natri phosphat/500mM NaCl, độ pH=7,4. Hạt này được hòa tan lại trong 6 M guaniđin hyđroclorua trong 20mM natri phosphat/500mM NaCl, độ pH=7,4 kết hợp siêu âm, tiếp theo ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1-2 giờ. Các hạt đã hòa tan lại được lọc bằng màng lọc cỡ 0,45µm và nạp lên trên cột Histrap được làm cân bằng bằng dung dịch đệm 20mM natri phosphat/500mM NaCl/6 M guaniđin độ pH=7,4. Sau khi nạp, cột được rửa bằng cùng dung dịch đệm đó với lượng bằng 25 lần thể tích cột. Protein gắn kết được rửa giải bằng 50mM imidazol trong 20mM natri phosphat/500mM NaCl/6M guaniđin-HCl, độ pH=7,4. Protein tinh chế được tái gấp cuộn bằng cách thẩm tách bằng 50mM natri axetat/150mM NaCl, độ pH = 4,5 hoặc PBS, độ pH = 7,2.

Sự biểu hiện và tinh chế chất gắn kết protein có khung trên cơ sở fibronectin hòa tan

Ngoài việc tinh chế chất gắn kết không tan, việc tinh chế chất gắn kết hòa tan cũng có thể được sử dụng. Để biểu hiện, (các) dòng chọn được, tiếp theo là HIS_6tag, được tách dòng vào vectơ pET9d và được biểu hiện trong tế bào *E.coli* BL21 DE3 plysS. Hai mươimL môi trường nuôi cấy gây nhiễm (được tạo ra từ một khuẩn lạc đĩa) được sử dụng để gây nhiễm 1L môi trường LB hoặc môi trường biểu hiện qua đêm TB (tự cảm ứng) chứa 50µg/mL Kanamycin và 34µg/mL chloramphenicol. Môi trường nuôi cấy trong môi trường LB được ủ ở nhiệt độ 37°C cho đến khi A_{600} nằm trong khoảng 0,6-1,0, tiếp theo cản ứng bằng 1mM isopropyl-β-thiogalactoside (IPTG) và được phát triển trong 4 giờ ở nhiệt độ 30°C. Môi trường nuôi cấy được phát triển trong môi trường biểu hiện qua đêm TB được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5 giờ, sau đó, nhiệt độ được hạ thấp xuống 18°C và chúng được phát triển trong 19 giờ. Môi trường nuôi cấy được thu bằng cách ly tâm trong 30 phút ở tốc độ ≥10000 g ở nhiệt độ 4°C. Các hạt tế bào được đông lạnh ở nhiệt độ -80°C. Các hạt tế bào đã tan được tạo hỗn dịch lại trong 25mL dung dịch đệm gây tan (20mM NaH_2PO_4, 0,5M NaCl, 1x hỗn hợp chất ức chế proteaza ™ hoàn chỉnh không chứa EDTA (Roche), độ pH=7,4) bằng cách sử dụng thiết bị đồng nhất hóa Ultra-turrax (IKA works) trên đá. Việc gây tan bào đạt được bằng cách đồng nhất hóa ở áp suất cao (≥18.000 psi) bằng cách sử dụng Model M-110S Microfluidizer (Microfluidics). Phần tan được tách bằng cách ly tâm trong 30 phút ở ≥23,300 g ở nhiệt độ 4°C. Dịch nổi được làm trong bằng cách sử dụng màng lọc cỡ 0,45µm. Dịch tan đã làm trong được nạp lên trên cột Histrap (GE) được làm cân bằng trước bằng 20mM natri phosphat/500mM NaCl, độ pH = 7,4. Sau đó, cột được rửa bằng cùng dung dịch đệm với lượng bằng 25 lần thể tích cột, tiếp theo bằng 20mM natri phosphat/500mM NaCl/25mM imidazol, độ pH = 7,4 với lượng bằng 20 lần thể tích cột và sau đó, bằng 20mM natri phosphat/500mM NaCl/40mM imidazol, độ pH = 7,4 với lượng bằng 35 lần thể tích cột. Protein được rửa giải bằng 20mM natri phosphat/500mM NaCl/500mM imidazol, độ pH = 7,4 với lượng bằng 15Lần thể tích cột, các phần được gộp lại dựa trên độ hấp thụ ở A_{280}, và được thẩm tách bằng 1x PBS hoặc 50mM Tris, 150mM NaCl, pH 8,5 hoặc 50mM NaOAc, 150mM NaCl, pH4,5. Kết tủa được loại bỏ bằng cách lọc bằng màng lọc cỡ 0,22µm.

PEG hóa đặc hiệu vị trí các adnectin bằng polyetylen glycol (PEG)

Các adnectin chứa gốc xystein được xử lý kỹ thuật được tiếp hợp với PEG hoặc chất phong bế xystein thông qua hóa học bổ sung Michael giữa nhóm thiol trên xystein

và nhóm chức maleimit của PEG hoặc n-etylmaleimit (NEM). Để PEG hóa bằng PEG 40kDa có 2 nhánh (NOF Corporation, P/N GL2-400MA), PEG được bổ sung với lượng mol dư vào dung dịch protein dưới điều kiện axit nhẹ đến trung tính. Phản ứng được để tiếp diễn ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ đến qua đêm. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được đưa vào cột trao đổi ion để tách adnectin được gắn PEG ra khỏi PEG-maleimit không phản ứng và adnectin không được gắn PEG. Để PEG hóa bằng PEG 40kDa 4 nhánh (NOF, P/N GL4-400MA) hoặc bis-PEG 20kDa (NOF corporation, P/N DE-200MA), adnectin được tinh chế từ SP FF trong dung dịch đệm xitrat, độ pH = 6,5. Sau khi khử bằng DTT, mẫu được loại muối trên cột G25 trong cùng dung dịch đệm để loại bỏ DTT và được cho phản ứng với bis-PEG 20kDa hoặc PEG 40 K 4 nhánh ở tỷ lệ 2:1 (PEG:adnectin) trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, và phản ứng được làm ngừng bằng cách bổ sung BME dư. Mẫu được tinh chế bằng cột Resource 15S (GE #17-0944-10) để loại chọn lọc chất chưa được gắn PEG (và chất được gắn PEG một lần trong trường hợp phản ứng bis-PEG 20kDa). Cột SEC điều chế cuối cùng (GE #17-1071-01, Superdex200, 26/60) được sử dụng (nếu cần) để loại bỏ các chất phân tử cao và adnectin chưa phản ứng. Để điều chế adnectin được phong bế bằng CYS, một lượng mol dư gấp 10Lần của NEM (Pierce Chemical) được bổ sung ngay sau bước loại muối G25 nêu trên trong dung dịch đệm xitrat (độ pH = 6,5). Hỗn hợp này được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng và phản ứng được làm ngừng bằng cách bổ sung BME dư. Sau đó, mẫu được thẩm tách kỹ bằng PBS. Các adnectin tiếp hợp đã tinh chế được phân tích bằng SDS-PAGE và sắc ký loại cỡ.

Tinh chế và PEG hóa chất gắn kết protein có khung trên cơ sở fibronectin không được đánh dấu

Chất gắn kết chọn được được tách dòng vào trong vectơ pET9d không có HIS_6tag và được biểu hiện trong tế bào *E.coli* BL21 DE3 plysS. 25mL môi trường nuôi cấy gây nhiễm đã được tách trước từ một khuẩn lạc đĩa được phát triển trong bình thót cổ dung tích 125mL cho đến khi OD 600nm đạt tới 1-2, bằng cách sử dụng môi trường có độ pH=6,85 + 50µg/mL kanamycin (amoni clorua, axit xitric, sắt (III) amoni xitrat, magie sulfat, mononatri phosphat monohyđrat, dextroza khan, glyxerol, Phyton Pepton, dịch chiết nấm men được tạo hạt, Kanamycin sulfat, amoni sulfat để điều chỉnh độ pH). Thùng lên men 10L (thể tích ban đầu của mẻ môi trường là 7,5L) được gây nhiễm ở OD 600nm cuối bằng của 0,003. Môi trường nuôi cấy này được phát triển qua đêm ở nhiệt độ 25°C

cùng với tốc độ trộn không đổi 650 vòng/phút và hàm lượng O_2 hòa tan >30%, đồng thời duy trì độ pH. Ngày tiếp theo, nhiệt độ được thay đổi đến 37°C và môi trường nuôi cấy được phát triển cho đến khi OD 600nm đạt được 20-25. Ngay khi đạt được OD đích, nhiệt độ được thay đổi đến 30°C và môi trường nuôi cấy được cảm ứng bằng IPTG (nồng độ cuối: 1mM). Môi trường nuôi dưỡng (glyxerol, phyton pepton, dịch chiết nấm men tạo hạt, kanamycin sulfat, và axit phosphoric để điều chỉnh độ pH) được bổ sung ở tốc độ 40mL môi trường/l thể tích tạo ra/giờ. Các tế bào được thu bằng cách ly tâm ở tốc độ 10000g trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các hạt tế bào được đông lạnh ở nhiệt độ -80°C.

Hỗn hợp tế bào nhão được làm tan trong 1x PBS ở tỷ lệ 10mL dung dịch đệm/g tế bào nhão. Ngay khi làm tan, mẫu bị phá vỡ bằng thiết bị đồng nhất hóa UltraTurrax (IKA works) cho đến khi đồng nhất. Sau đó, dung dịch được đưa hai lần qua thiết bị vi lỏng hóa ở 18.000 psi. Phần hòa tan được tách bằng cách ly tâm trong 30 phút ở ≥10000 g ở 4°C. Dịch nổi được pha loãng tỷ lệ 1:1 bằng natri axetat (độ pH = 4,5), và được làm trong bằng màng lọc cỡ 0,2µm. Dịch tan trong được nạp lên trên cột SP FF (SP1; GE) được làm cân bằng trước bằng 50mM natri axetat (độ pH = 4,5). Sau đó, cột được rửa bằng cùng dung dịch đệm với lượng gấp 2 lần thể tích cột, tiếp theo bằng 50mM natri axetat/350mM NaCl, độ pH = 4,5 với lượng gấp 8 lần thể tích cột. Protein được rửa giải bằng 50mM natri axetat/700mM NaCl, độ pH = 4,5. Dịch rửa giải được gộp dựa trên độ hấp thụ ở A_{280}.

Dịch rửa giải SP1 được pha loãng tỷ lệ 1:5 bằng 20mM natri phosphat (độ pH = 6,7) và nạp lên trên cột SP FF (SP2) được làm cân bằng trước bằng 20mM natri phosphat/100mM NaCl, độ pH = 6,7. Sau đó, cột được rửa bằng cùng dung dịch đệm với lượng gấp 2 lần thể tích cột. Protein được rửa giải khỏi cột bằng 20mM natri phosphat/0,5M NaCl, độ pH = 6,7. Dịch rửa giải được gộp dựa trên độ hấp thụ ở A_{280}.

Dịch rửa giải SP2 được pha loãng đến 100mM NaCl bằng 20mM natri phosphat (độ pH = 6,7) và nạp lên trên cột Q FF (GE) được làm cân bằng trước bằng 20mM natri phosphat/100mM NaCl, độ pH = 6,7. Pic FT (chứa sản phẩm) được thu lại. Cột được rửa bằng dung dịch đệm cân bằng cho đến khi pic FT được trở lại đường nền.

Các adnectin chứa gốc xystein được xử lý kỹ thuật được tiếp hợp với PEG thông qua hóa học bổ sung Michael giữa nhóm thiol trên xystein và nhóm chức maleimit của chất phản ứng PEG. Phần Q FT được gắn PEG bằng PEG nhánh 40kDa ở tỷ lệ mol PEG

và protein bằng 2:1. Mẫu được ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng PEG hóa được pha loãng bằng 2 phần 50mM natri axetat (độ pH = 4,5) và nạp lên trên cột SP FF (GE) được làm cân bằng trước bằng 50mM natri axetat (độ pH = 4,5). Cột được rửa bằng cùng dung dịch đệm với lượng gấp 2 lần thể tích cột. Protein được gắn PEG được rửa giải khỏi cột bằng 50mM natri axetat/200mM NaCl, độ pH = 4,5). Dịch rửa giải được gộp dựa trên độ hấp thụ ở A_{280}. Protein được gắn PEG được cô bằng cách sử dụng màng Millipore Biomax 30kDa. Mẫu được lọc bằng màng lọc 0,22µm và được bảo quản ở, ví dụ, 4°C, -20°C, hoặc -80°C.

Biểu hiện tạm thời và tinh chế chất gắn kết protein có khung trên cơ sở fibronectin được định dạng bằng Fc

Để tạo ra ADN, các chất dự tuyển được chọn được tách dòng vào trong plasmit pDV-16 mà từ đó các tế bào *E. coli* Top10 được biến nạp. pDV-16 là phiên bản biến đổi của pTT5 (Yves Durocher, NRC Canada), trong đó trình tự mã hóa IgG1-Fc của người được đưa vào, được đứng trước là trình tự tín hiệu, và các vị trí cắt giới hạn được bao gồm để cho phép xen đoạn các trình tự mã hóa adnectin ở mỗi đầu của Fc. Các tế bào biến nạp được làm khuếch đại bằng cách gây nhiễm 1L môi trường canh Luria chứa 100µg/mL Ampicillin và ủ trong tủ ủ xoay ở 225 vòng/phút trong 18 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các hạt vi khuẩn được thu lại bằng cách ly tâm ở >10000g trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. ADN plasmit tinh chế được tách bằng cách sử dụng kit QIAGEN Plasmid Plus Mega (QIAGEN) như được mô tả trong quy trình của nhà sản xuất. ADN tinh chế được định lượng bằng cách sử dụng độ hấp thụ ở 260nm và đông lạnh ở nhiệt độ -80°C trước khi sử dụng.

Tế bào HEK 293-EBNA1 (dòng 6E) (Yves Durocher, NRC Canada) được khuếch đại đến $2x10^6$ tế bào/mL trong 2L môi trường F17 trong túi dao động GE Healthcare dung tích 10L ở nhiệt độ 37°C, 5% CO_2, và được trộn bằng cách lắc ở góc 8° ở 18 vòng/phút.

ADN được tạo ra để chuyển nhiễm như sau: Môi trường F17 được làm ấm đến 37°C. ADN và chất chuyển nhiễm PEI được làm tan trong vỏ an toàn sinh học vô trùng. ADN (2,25mg) được bổ sung vào 100mL môi trường F17 ấm trong bình nuôi cấy polypropylen vô trùng và trộn nhẹ bằng cách lắc xoáy. Trong bình riêng, 6,75mg PEI (1mg/mL) được gộp với 100mL môi trường F17 đã được làm ấm trước và trộn nhẹ bằng

cách lắc xoáy. Các bình được để yên trong 5 phút trước khi gộp các chất bằng cách bổ sung dung dịch PEI vào bình chứa ADN và trộn nhẹ bằng cách lắc xoáy.

Các chất trong bình chứa hỗn hợp DNA:PEI được bổ sung vào túi dao động chứa các tế bào HEK 293-6E sau khi ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút trong vỏ an toàn sinh học. Túi chứa các tế bào HEK 293-6E chuyển nhiễm được ủ trong hai mươi bốn giờ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO_2, và được trộn bằng cách lắc ở góc 8° ở 18 vòng/phút. Sau 24 giờ, 100mL Ttryptone N1 20% được lọc vô trùng (Organotechnie, Canada) hòa tan trong môi trường F17 được bổ sung vô trùng vào môi trường nuôi cấy. Các tế bào và môi trường được thu lại sau 72 giờ ủ nữa như đã mô tả trên đây. Theo cách khác, sự biểu hiện HEK tạm thời trong bình lắc (0,5L môi trường trong bình dung tích 2 l) có thể được thực hiện với tỷ lệ DNA:PEI bằng 1:2. Các tế bào được tách khỏi môi trường được làm thích nghi với điều kiện bằng cách ly tâm ở 6000g trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Môi trường được làm thích nghi với điều kiện được giữ, lọc qua màng lọc cỡ 0,2µM, và bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

Môi trường được làm thích nghi với điều kiện được đưa lên cột sắc ký 10mL chứa nhựa GE MabSelect Sure được làm cân bằng trước trong PBS ở tốc độ 5mLphút. Sau khi nạp môi trường được làm thích nghi với điều kiện đã lọc, cột được rửa ít nhất bằng 100mL PBS ở nhiệt độ phòng. Sản phẩm tinh chế được rửa giải khỏi cột bằng cách dùng 100mM glyxin/100mM NaCl, độ pH = 3,0. Các phần được trung hòa độ pH bằng cách gom vào các ống chứa 1M Tris pH 8 1/6 thể tích, hoặc bằng cách gộp theo độ hấp thụ A280 tiếp theo bổ sung 1M Tris pH 8 đến 100mM. khi các chất thuộc loại có khối lượng phân tử cao chiếm lớn hơn 5% sau khi rửa giải Protein A, thì mẫu còn được tinh chế tiếp bằng cột Superdex 200 (26/60) (GE Healthcare) trong PBS. Các phần SEC chứa monome được gộp lại và cô. Dịch gộp protein A hoặc SEC thu được được thẩm tách kỹ bằng PBS ở nhiệt độ 4°C, và lọc vô trùng bằng cách sử dụng màng lọc ngưỡng 0,22µm trước khi kết đông ở nhiệt độ -80°C.

Sản xuất quy mô lớn: Biểu hiện ở động vật có vú và thu hồi sơ bộ: hệ UCOE CHO

Ngân hàng tế bào nghiên cứu (Research Cell Bank - RCB) của động vật có vú được tạo ra bằng cách chuyển nạp thể dung hợp adnectin kháng myostatin-Fc được tách dòng vào trong vectơ pUCOE chứa Ubiquitous Chromatin Opening Element (UCOE) [Vectơ UCOE biến đổi của Millipore] trong các tế bào CHO-S. RCB được thiết lập bằng

cách khuếch đại tế bào trong môi trường chọn lọc (0,04% (thể tích/thể tích) L-glutamin (Invitrogen) và 0,01% (thể tích/thể tích) phần bổ sung HT (Invitrogen) trong môi trường CD CHO (Invitrogen)) chứa 12,5µg/mL puromycin. Các tế bào có số cấy truyền thấp được tách vô trùng bằng ly tâm, tạo hỗn dịch lại trong môi trường tạo ngân hàng (0,04% (thể tích/thể tích) L-glutamin (Invitrogen), 0,01% (thể tích/thể tích) phần bổ sung HT (Invitrogen) và 7,5% (thể tích/thể tích) DMSO trong môi trường CD CHO (Invitrogen)) đến nồng độ cuối bằng 1 x 10^7 tế bào/mL. Các tế bào này ban đầu được đông lạnh trong bể rượu isopropylic 70% ở nhiệt độ -80˚C qua đêm và sau đó, chuyển sang nitơ lỏng để bảo quản trong thời gian dài vào ngày tiếp theo.

Việc nuôi cấy tế bào được bắt đầu bằng cách làm tan một lọ RCB vào 25mL môi trường chọn lọc chứa 12,5µg/mL puromycin và khuếch đại việc nuôi cấy trong cùng môi trường. Các tế bào được để cho đạt được nồng độ nằm trong khoảng 1-2 x 10^6 tế bào/mL trước khi phân chia lại thành 0,2 x 10^6 tế bào/mL. Các tế bào thường được duy trì trong khoảng 2-4 tuần trước khi tạo mầm thiết bị phản ứng sinh học. Môi trường nuôi cấy khuếch đại được cấy truyền lần cuối và để cho phát triển đến điểm trong đó thiết bị phản ứng sinh học dung tích 15L chứa 8L môi trường sản xuất (Invitrogen môi trường CD CHO chứa 0,01% (thể tích/thể tích) phần bổ sung HT (Invitrogen), 0,04% (thể tích/thể tích) Glutamax (Gibco), và 0,005% (thể tích/thể tích) Pluronic F-68 (Gibco)) có thể tạo mầm được ở mật độ cuối bằng 0,2 x 10^6 tế bào/mL. Môi trường nuôi cấy trong thiết bị phản ứng sinh học được giám sát hằng ngày đối với VCD (Viable Cell Density - mật độ tế bào có thể sống được), tỷ lệ phần trăm khả năng sống, độ pH, và nồng độ glucoza. Môi trường nuôi cấy trong thiết bị phản ứng sinh học được nạp liệu vào ngày 3 và 6 bằng cách bổ sung môi trường nuôi dưỡng với lượng bằng 10% tổng thể tích môi trường. Môi trường nuôi cấy được thu vào khoảng từ ngày 7 đến ngày 9 với tỷ lệ phần trăm khả năng sống >70%. Trong khi nuôi cấy, môi trường nuôi cấy của thiết bị phản ứng sinh học được kiểm soát ở độ pH bằng 7,1, nhiệt độ bằng 37˚C, %DO2 bằng 40%, và RPM không đổi bằng 100.

Vào ngày thu hoạch, môi trường nuôi cấy của thiết bị phản ứng sinh học được cho đi trực tiếp qua màng lọc có độ dày 6,0/3,0µm tiếp theo là lọc vô trùng 0,8/0,2µm vào túi vô trùng. Môi trường nuôi cấy vô trùng đã làm trong được bảo quản qua đêm ở 2-8˚C. Sau đó, môi trường nuôi cấy đã làm trong được cô bằng cách lọc tiếp tuyến (tangential

flow filtration - TFF) bằng màng 30000 kDa. Nồng độ xấp xỉ là 6x, tuỳ thuộc vào độ chuẩn thu được. Sau đó, dịch nổi đã cô được lọc vô trùng vào các chai PETG và xử lý trực tiếp hoặc bảo quản ở nhiệt độ -80˚C.

Tinh chế thể dung hợp adnectin kháng myostatin-Fc

Dịch nổi môi trường nuôi cấy thu được (nguyên chất hoặc được cô) được nạp lên trên cột MabSelect Protein A đã được làm cân bằng trước bằng PBS. Cột được rửa bằng 5CV của 50mM Tris, độ pH = 8,0, 1M ure, 10% PG. Thể dung hợp adnectin-Fc được rửa giải bằng 100mM glyxin, độ pH = 3,3, thu pic vào vật chứa đã được nạp trước bằng 1CV của 200mM natri axetat, độ pH = 4,5. Việc rửa giải pic là dựa trên độ hấp thụ ở A280.

Dịch rửa giải Protein A được pha loãng đến độ pH=3,0 bằng cách bổ sung 2 M axit xitric và để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, để bất hoạt virut. Sau đó, mẫu được pha loãng bằng 200mM trinatri phosphat cho đến khi đạt độ pH=4,5. khi cần, dung dịch còn được pha loãng bằng nước để làm giảm độ dẫn xuống dưới 10 mili giây/cm.

Dịch rửa giải Protein A loãng được đưa qua Tosoh Q 600C AR (Tosoh Bioscience), đã được làm thích nghi trước với điều kiện bằng 50mM natri axetat, độ pH = 4,5, ở chế độ bắt giữ âm. Pic chảy qua được thu lại, dựa trên độ hấp thụ ở A280. Cột được rửa bằng 50mM natri axetat và tách bằng NaOH 0,2N.

Dòng chảy qua Q 600C AR được xử lý bằng cách lọc dòng chảy tiếp tuyến sử dụng màng sợi rỗng 30 K NMWCO (GE), với việc trộn rất nhẹ của phần trên lọc. Thể dung hợp adnectin-Fc được lọc tách vào 25mM natri phosphat 150mM trehaloza pH 7,0 cho 6 thể tích tách, và sau đó cô đến nồng độ protein đích.

Ví dụ 2 - Đánh giá sinh lý học các protein kháng myostatin

Sắc ký loại cỡ: Sắc ký loại cỡ (size exclusion chromatography - SEC) chuẩn được thực hiện trên chất dự tuyển adnectin thu được từ quy trình giữa thang. SEC của nguyên liệu giữa thang được thực hiện bằng cách sử dụng Superdex 200 10/30 hoặc trên cột Superdex 75 10/30 (GE Healthcare) trên hệ Agilent 1100 hoặc 1200 HPLC với phát hiện bằng UV ở A214 nm và A280nm và với phát hiện bằng huỳnh quang (kích thích 280nm, phát xạ 350nm). Dung dịch đệm 100mM natri sulfat/100mM natri phosphat/150mM natri clorua, độ pH = 6,8 được sử dụng ở tốc độ dòng thích hợp đối với cột SEC được sử dụng. Các tiêu chuẩn lọc gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) được sử dụng để hiệu chỉnh

khối lượng phân tử. Các kết quả SEC trên các adnectin được tinh chế giữa thang cho thấy chủ yếu là adnectin monome và rửa giải trong khoảng xấp xỉ 10 kDa với các tiêu chuẩn lọc gel hình cầu (BioRad) như được thể hiện trong các bảng 9 và 10.

Độ ổn định nhiệt: Phân tích huỳnh quang quét nhiệt (Thermal Scanning Fluorescence - TSF) của các adnectin HTPP được thực hiện để sàng lọc chúng bằng độ ổn định nhiệt tương đối. Các mẫu được chuẩn hóa đến 0,2mg/mL trong PBS. 1µL thuốc nhuộm màu cam Sypro được pha loãng 1:40 bằng PBS được bổ sung vào 25µL mỗi mẫu và đĩa được đậy kín bằng nắp dính vi đĩa 96 giếng trong. Các mẫu được quét bằng cách sử dụng máy BioRad RT-PCR bằng cách biến đổi nhiệt độ từ 25°C đến 95°C, ở tốc độ 2 độ trên mỗi phút. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm BioRad CFX manager 2.0. Các giá trị Th thu được bằng TSF đã cho thấy mối tương quan mật thiết với các giá trị Tm thu được bằng DSC trên khoảng nóng chảy từ 40°C đến 70°C. Điều này được coi là khoảng hoạt động chấp nhận được đối với kỹ thuật này. Kết quả ND ("không dữ liệu" (No data)) thu được khi phần dốc của đường cong chuyển tiếp là quá nhỏ để cho phép pic dẫn xuất của nó (mức độ thay đổi huỳnh quang theo thời gian) được phân biệt với tạp nhiễu. Kết quả "ND" không thể được hiểu là thông tin biểu thị độ ổn định nhiệt. Phân tích phép đo nhiệt lượng quét vi sai (Differential Scanning Calorimetry - DSC) của các adnectin giữa thang từ HTPP thẩm tách được thực hiện để xác định T_m tương ứng của chúng. Dung dịch 0,5mg/mL được quét trong nhiệt lượng kế quét vi sai VP-Capillary (GE Microcal) bằng cách thay đổi nhiệt độ từ 15°C đến 110°C, ở tốc độ 1 độ trên mỗi phút dưới áp suất 70 p.s.i. Dữ liệu được phân tích so với việc chạy dung dịch đệm thích hợp đối chứng bằng cách khớp cao nhất bằng cách sử dụng Origin Software (OriginLab Corp). Các kết quả của phân tích TSF và DSC được tóm tắt trong các bảng 8-10. Như được thể hiện trong các bảng 8-10, nhiều dòng thể hiện nhiệt độ duỗi mạch trên 60°C, chứng tỏ cấu trúc ổn định sinh lý cao thích hợp để bào chế thuốc. Các adnectin nhìn chung chịu được quá trình PEG hóa hoặc định dạng Fc mà không giảm rõ rệt độ ổn định. Trong một số trường hợp, các định dạng này tạo ra độ ổn định cải thiện. Ví dụ, 3116_A07 là adnectin chưa biến đổi có Tm của TSF là 60°C, nhưng khi được gắn PEG (ATI-1377) thì Tm của DSC là 68°C, và ở ðịnh dạng Fc-X (PRD-1286) thì Tm của DSC là 66°C.

Ví dụ 3 - Thử nghiệm luxiferaza trên cơ sở tế bào

Plasmit chỉ thị luxiferaza, yếu tố đáp ứng Activin (Activin-Responsive Element (ARE))-luc, được tạo ra bằng cách cài chín đoạn lặp của ARE theo bộ đôi vào chất chỉ thị luxiferaza nhấp nháy. Plasmit này được chuyển nạp tạm thời vào tế bào HepG2. Plasmit pGL4.74[hRluc/TK] được đồng chuyển nạp để bình thường hóa hiệu quả chuyển nhiễm. 10000 tế bào được đưa vào mỗi giếng trong đĩa 96 giếng. Khi protein như myostatin, activin, hoặc BMP-11, được bổ sung vào các tế bào và gắn kết với thụ thể cùng họ của nó, thì tín hiệu SMAD phía sau được kích hoạt, dẫn đến gắn kết của phức hợp SMAD được phosphoryl hóa với ARE. Lượng, ví dụ, myostatin, được tiếp xúc với các tế bào trực tiếp tỷ lệ thuận với lượng protein luxiferaza được tạo ra và, do đó, hoạt tính luxiferaza đo được. Khi chất đối kháng myostatin (ví dụ, adnectin kháng myostatin) được bổ sung đồng thời với myostatin vào các tế bào, thì mức hoạt hóa của ARE bị giảm, dẫn đến giảm sản sinh và hoạt tính luxiferaza.

Trong thử nghiệm này, (1) adnectin kháng myostatin và myostatin, (2) adnectin kháng myostatin và activin A, hoặc (3) adnectin kháng myostatin và BMP-11 được ủ trước trước khi bổ sung vào các tế bào. Myostatin (R&D Systems) được sử dụng ở 10-500pM, activin A (R&D Systems) ở 10-500pM, và BMP-11 (R&D Systems) ở 10-500 pM. Sau khi ủ qua đêm với các hỗn hợp khác nhau này, các tế bào được dung giải và hoạt tính luxiferaza (mức phát quang) được đo bằng cách sử dụng Dual-Glo Luciferase Assay System® (EnVision). IC50 được xác định là nồng độ adnectin cần thiết để đạt được mức độ ức chế hoạt tính ARE-luxiferaza cảm ứng bởi myostatin là 50%.

Như được thể hiện trong các bảng 8-10, các adnectin kháng myostatin ức chế sự tăng hoạt tính chất chỉ thị ARE-luc qua trung gian myostatin.

Ví dụ 4 -Thử nghiệm gắn kết HTRF

Thử nghiệm HTRF được sử dụng để đo ái lực gắn kết của các adnectin kháng myostatin với myostatin. Thử nghiệm này là thử nghiệm HTRF cạnh tranh sử dụng chất đánh dấu Eu-W1024 làm chất cho nhóm huỳnh quang và Alexa Fluor® 647 làm chất nhận nhóm huỳnh quang. Adnectin 1889E01 được biotin hóa và rhActRIIb-Fc được đánh dấu bằng Alexa Fluor® 647 có thể gắn kết đồng thời với myostatin ở hai vị trí gắn kết riêng biệt. Streptavidin được đánh dấu bằng Eu-W1024 được sử dụng để gắn kết 1889E01 biotin hóa. Hai nhóm huỳnh quang, Eu-W1024 và Alexa Fluor® 647, được đưa vào cùng nhau bằng cách tạo ra phức hợp 1889E01/myostatin/ActRIIb-Fc, và tín hiệu

HTRFv có thể được đọc trên máy đọc đĩa EnVision (Perkin Elmer) bằng cách sử dụng quy trình HTRF. Với sự có mặt của adnectin cạnh tranh, tín hiệu HTRF giảm. Các giá trị IC50 được thể hiện trong các bảng 8-10.

Bảng 8: Các kết quả mô tả đặc điểm sinh lý, thử nghiệm chất chỉ thị ARE-luxiferaza, và thử nghiệm gắn kết HTRF của các mono-adnectin kháng myostatin.

			Thử nghiệm ARE-luxiferaza			HTRF
ID	**Tm - TSF**	**Tm-DSC**	**Myo IC50 (nM)**	**BMP-11 IC50 (nM)**	**Activin A IC50 (nM)**	**Myo IC50 (nM)**
1979_B06		48	0,11	3,3	194	ND
2062_G02		48	205	1500	>1500	ND
2522_C09	40		0,06	1,6	1000	ND
2523_G06	49	49	4,2	46	>2000	ND
2524_C11	ND	55	0,1	0,89	765	ND
2524_D09	54	49	0,06	0,55	84	ND
2524_E10	ND		0,09	5,6	>1000	ND
2524_H05	40		0,09	7,3	>1000	ND
2524_H11	49		0,03	6,2	>1000	ND
2525_B01	ND		0,11	3,2	73	ND
2525_D02	58	55	0,05	1,1	345	ND
2525_D05	ND	69	0,11	3,9	>1000	ND
2525_F07	46		0,13	3,4	>1000	ND
2987_A06		50	0,10	23	283	ND
2987_B04		48	0,12	3,3	239	ND
2987_B09		52	0,01	0,92	172	ND
2987_C02		50	0,06	7,1	464	ND
2987_D05		49	0,11	2,4	2000	ND
2987_E03		51	0,10	2,3	224	ND
2987_E08		52	0,05	2,8	352	ND
2987_F01		49	0,05	6,5	594	ND
2987_F06		52	0,08	20	538	ND
2987_G04		49	0,09	3,3	171	ND
2987_G09		54	0,05	0,91	>2000	ND
2987_H02		51	0,05	11	794	ND
2987_H07		57	0,02	5,5	>400	ND
3006_A10	62		0,08	2,0	>2000	0,15
3007_B08	57		0,06	0,23	423	0,14
3007_C09	63		0,04	0,89	417	0,14
3007_C10	66		0,03	1,0	>2000	0,14
3008_A03	59		0,11	22,6	>2000	0,22
3008_B08	57		0,35	9,3	254	0,37
3008_D04	56		0,09	1,2	720	0,14
3008_F01	63		0,08	0,12	>2000	0,21
3008_G01	57		0,03	0,31	>2000	0,11
3008_G03	58		0,09	1,3	>2000	0,13
3115_D04	64		0,16	3,6	>1000	0,20

3115_E06	62		0,07	2,0	>1000	0,14
3116_A06	64		0,14	13	>1000	0,15
3116_A07	60		0,04	0,5	>1000	0,11
3116_C01	60		0,10	6,7	1000	0,35
3116_C06	61		0,14	8,9	>1000	0,18
3116_H06	60		0,10	1,6	>1000	0,13
3146_A08	69		0,70	48	>1000	0,26
ATI-1267		60	0,06	0,50	644	0,12
ATI-1275		53	0,03	0,14	19	0,19
ATI-1277		không chuyển tiếp	0,14	1,18	2000	0,38
ATI-1340		54	0,05	4,87	324	0,16

Bảng 9: Các kết quả mô tả đặc điểm sinh lý, thử nghiệm chất chỉ thị ARE-luxiferaza, và thử nghiệm gắn kết HTRF của các adnectin kháng myostatin được gắn PEG.

				Thử nghiệm ARE-luxiferaza			HTRF
ID	**Tm - TSF**	**Tm-DSC**	**% monome (SEC)**	**Myo IC50 (nM)**	**BMP-11 IC50 (nm)**	**Activin A IC50 (nM)**	**Myo IC50 (nM)**
ATI-1106				177	1414	>2000	
ATI-1107		63	98	19	888	>2000	ND
ATI-1266		60	97,8	0,12	0,89	2000	0,21
ATI-1276		56	94,6	0,08	0,15	110	0,28
ATI-1278		46	93,7	0,27	1,1	>2000	0,54
ATI-1338		59		0,28	5,8	>1000	0,24
ATI-1339		61		0,28	6,0	>1000	0,28
ATI-1341		53		0,03	0,14	14	0,13
ATI-1359		57	96,5	0,26	3,1	>1000	0,36
ATI-1375		67	>99	0,17	1,6	>1000	0,76
ATI-1376		70	>99	0,03	0,83	>1000	0,32
ATI-1377		68	>99	0,05	0,78	>1000	0,15
ATI-1378		74	>99	0,29	5,4	>1000	1,29
ATI-1379		69	>99	0,10	4,3	>1000	0,28

Bảng 10: Các kết quả mô tả đặc điểm sinh lý, thử nghiệm chất chỉ thị ARE-luxiferaza, và thử nghiệm gắn kết HTRF của các adnectin kháng myostatin được dung hợp Fc.

				Thử nghiệm ARE-luxiferaza			HTRF
ID	**Tm - TSF**	**Tm-DSC**	**% monome (SEC)**	**Myo IC50 (nM)**	**BMP-11 IC50 (nm)**	**Activin A IC50 (nM)**	**Myo IC50 (nM)**
PRD-932				0,24	ND	ND	ND
PRD-1171				0,08	0,20	19	0,14
PRD-1173				0,02	0,10	6	0,12

PRD-1174		Tm1 61 Tm2 67 Tm3 83		0,04	0,10	4	0,09
PRD-1175				0,10	0,28	19	0,15
PRD-1177				0,16	0,28	21	0,64
PRD-1178		Tm1 60 Tm2 69 Tm3 84		0,08	0,25	16	0,27
PRD-1180		Tm1 68 Tm2 83		0,07	0,11	14	0,13
PRD-1284				0,02	0,04	44	0,62
PRD-1285		Tm1 67 Tm2 68 Tm3 80	97	0,05	0,03	216	0,49
PRD-1286		Tm1 66 Tm2 68 Tm3 81	99	0,10	0,11	94	0,73
PRD-1287				0,30	0,80	>1000	2,70
PRD-1288		Tm1 65 Tm2 69 Tm3 81	93	0,08	0,10	>1000	0,47
PRD-1301				0,06	0,06	15	0,07
PRD-1302				0,03	0,02	14	0,12
PRD-1303				0,02	0,03	314	0,11
PRD-1304				0,05	0,07	45	0,24
PRD-1305				0,06	0,07	113	0,10
PRD-1471		Tm1 62 Tm2 68 Tm3 81	99	0,16	0,16	60	0,47
PRD-1472		Tm1 62 Tm2 69 Tm3 80	100	0,07	0,05	1000	0,41
PRD-1473		Tm1 63 Tm2 69 Tm3 81	100	0,07	0,06	125	0,73
PRD-1474		Tm1 63 Tm2 69 Tm3 81	100	0,08	0,09	>1000	0,45

Ví dụ 5- Sự ức chế phosphoryl hóa SMAD2 cảm ứng bởi Myostatin qua trung gian adnectin kháng myostatin

Các tế bào RH41 sacom cơ vân của người (DSMZ, Braunschweig, Germany) được sử dụng để phân tích đáp ứng ức chế gồm 12-, 2-, và 4-điểm được mô tả dưới đây. Các tế bào được lấy khỏi môi trường nuôi cấy và rửa để loại huyết thanh và cuối cùng đưa vào môi trường thử nghiệm chứa BSA trong 4 giờ. Các tế bào được lấy ra khỏi bình bằng cách sử dụng versene và chuyển sang đĩa polypropylen đáy chữ V, 96 giếng, ở $5x10^5$ tế

bào/giếng. Đối với đáp ứng ức chế gồm 12-điểm, 100 pM myostatin tái tổ hợp (R&D Systems), được ủ trước trong 1 giờ bằng các adnectin với khoảng nồng độ pha loãng 5 lần bắt đầu ở 1000nM (tức là 1000nM, 200nM, 40nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM, 0,064 nM, 0,0128 nM, 0,00256 nM, 0,000512 nM, 0,000102 nM, 0,0000204 nM), được bổ sung vào các tế bào. Đối với đáp ứng ức chế gồm 4-điểm, 100 pM myostatin, được ủ trước trong 1 giờ bằng các adnectin với khoảng nồng độ (30nM, 3 nM, 0,1nM hoặc 0,001nM), được bổ sung vào các tế bào. Đối với đáp ứng ức chế gồm 2-điểm, 100 pM myostatin, được ủ trước trong 1 giờ bằng các adnectin với khoảng nồng độ (10nM hoặc 0,5nM), được bổ sung vào các tế bào. Các tế bào được xử lý bằng hỗn hợp myostatin-adnectin trong 1 giờ ở 37°C để gây ra sự phosphoryl hóa SMAD2 (pSmad2). Sự kích thích được dừng lại bằng cách đặt các tế bào lên trên đá và bổ sung PBS đá lạnh. Các tế bào được tạo hạt và dung giải theo các quy trình chuẩn và sự phosphoryl hóa SMAD2 được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA (Cell Signaling Technologies). Sự ức chế đạt được bằng các adnectin với khoảng nồng độ được vẽ đồ thị bằng phần mềm GraphPad Prism và các điểm dữ liệu chuẩn hóa với đối chứng có mức độ ức chế 100% và 0%. IC50 được xác định là nồng độ adnectin cần thiết để đạt được mức độ ức chế phosphoryl hóa SMAD2 cảm ứng bởi myostatin là 50%. Dữ liệu thể hiện trong Bảng 11 chỉ ra rằng các adnectin có nguồn gốc từ sự tối ưu hóa ái lực của các dòng bố mẹ 1979_B06 và 2062_G02 đều ức chế hiệu quả và hoàn toàn sự phosphoryl hóa pSMAD cảm ứng bởi myostatin và thể hiện giá trị IC50 nằm trong khoảng từ 0,78 nM đến 0,06 nM. Giá trị IC50 này lớn hơn 16-75 lần so với của các dòng bố mẹ 1979_B06 (IC50 = 12,8 nM) và 2062_G02 (IC50 = 59,1nM).

Bảng 11. Sự ức chế phosphoryl hóa SMAD2 (pSMAD2) bởi các adnectin kháng myostatin

Thử nghiệm pSmad2			
ID	Myo IC50 (nM) 12-điểm	Myo IC50 (nM) 4-điểm	% ức chế Myo ở 10nM
1979_B06 (aka ATI-1133)	12,8±2,4		
2062_G02 (aka ATI-1134)	59,1±16,2		
2522_C09	0,13		
2523_G06	0,78		
2524_C11	0,14		
2524_D09	0,11		

2524_E10	0,13		
2524_H05	0,13		
2524_H11	0,11		
2525_B01	0,14		
2525_D02	0,36		
2525_D05	0,20		
2525_F07	0,27		
3006_A10			51
3007_B08			97
3007_C09			80
3007_C10			76
3008_A03			87
3008_B08			90
3008_D04			92
3008_F01			86
3008_G01			98
3008_G03			91
3115_D04		0,06	
3115_E06		0,06	
3116_A06		0,27	
3116_A07		0,06	
3116_C01		0,26	
3116_C06		0,73	
3116_H06		0,06	
3146_A08		0,78	

Ví dụ 6 - Đo ái lực SPR của các adnectin kháng myostatin Động học gắn kết adnectin bằng cách sử dụng SPR định dạng A

Kháng thể kháng Fc của người (Biacore/GE) được giữ cố định trên chip Biacore CM5 thông qua ghép cặp NHS/EDC theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ActRIIb-Fc (R&D Systems) được bắt giữ trên cả hai tế bào đối chiếu và tế bào dòng hoạt tính, tiếp theo là bắt giữ myostatin của người (R&D Systems), BMP-11 của người (GDF-11; R&D Systems), hoặc Activin A của người (R&D Systems) chỉ trên các tế bào dòng hoạt tính (mỗi tế bào được hoà tan theo quy trình được đề nghị của nhà sản xuất và được pha loãng trong dung dịch đệm chạy HBSP). Khoảng nồng độ của adnectin kháng myostatin được áp dụng qua tất cả các tế bào dòng trong dung dịch đệm chạy HBSP. Việc tái sinh bề mặt chip giữa các chu kỳ được thực hiện bằng hai xung 30 giây của $MgCl_2$ 3M. Các đường động học của đồ thị đáp ứng theo thời gian trừ đi đối chiếu được làm khớp với mô hình gắn kết 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm Biaevaluation. Tóm tắt dữ liệu động học Biacore được thể hiện trong Bảng 12.

Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 12 chỉ ra rằng các adnectin con cháu được tối ưu hóa gắn kết chặt chẽ với myostatin, với K_Ds nằm trong khoảng 0,06-1,47 nM, so với các adnectin bố mẹ 1979_B06 và 2062_G02, lần lượt có K_Ds bằng 29 và 49 nM.

Khi PEG hóa, có một số tổn thất ái lực myostatin, với K_Ds nằm trong khoảng từ 0,76 đến 14,4 nM, mặc dù không có tác dụng PEG hóa đối với hiệu lực trong thử nghiệm ARE-luxiferaza (xem các bảng 8 và 9).

Tính chọn lọc của adnectin so với BMP-11 nằm trong khoảng từ không chọn lọc hoàn toàn lên đến 17 lần, trong khi gắn kết với activin là cực kỳ yếu hoặc không tồn tại, gợi ý tính chọn lọc cao so với activin.

Động học gắn kết adnectin bằng cách sử dụng SPR định dạng B (hữu ích đối với các adnectin được định dạng bằng Fc)

Myostatin của người (R&D Systems), BMP-11 của người (GDF-11; R&D Systems), hoặc Activin A của người (R&D Systems) được hoà tan theo quy trình được đề nghị của nhà sản xuất và được giữ cố định trên chip Biacore CM5 ở 1-10µg/mL trong dung dịch đệm axetat (độ pH = 4,0 hoặc 4,5) bằng cách ghép cặp NHS/EDC chuẩn. Khoảng nồng độ của adnectin kháng myostatin được áp dụng trong dung dịch đệm chạy HBSP. Việc tái sinh bề mặt chip giữa các chu kỳ được thực hiện bằng 60 giây của 10-50mM NaOH. Các đường động học của đồ thị đáp ứng theo thời gian trừ đi đối chiếu được làm khớp với mô hình gắn kết 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm Biaevaluation. Đối với các adnectin được định dạng bằng Fc, động học tương tác được điều khiển bằng ái tính của Fc có hóa trị hai và myostatin dime ngay cả ở mật độ bất động thấp. Tóm tắt dữ liệu động học Biacore được thể hiện trong Bảng 12. Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 12 cho thấy rằng một số adnectin chạy trong định dạng SPR này gắn kết với myostatin và BMP-11 và cả activin với các ái lực tương tự. Tính chọn lọc cơ bản so với activin trong thử nghiệm ARE-luxiferaza, tuy nhiên, gợi ý ái lực của activin có thể được nêu bật giả trong định dạng thử nghiệm SPR này.

Bảng 12. Tóm tắt dữ liệu động học SPR của các adnectin kháng myostatin. Các định dạng A và B được mô tả trong ví dụ 6.

ID	Myo KD (nM)	BMP-11 KD (nM)	Activin A KD (nM)	Định dạng
1979_B06 (aka ATI-1133)	29	489	không gắn kết	A, 25C
2062_G02 (aka ATI-1134)	48,8	697	không gắn kết	A, 25C
2522_C09	0,51	0,45	không/gắn kết yếu	A, 25C
2523_G06	1,465	10,65	không gắn kết	A, 25C
2524_C11	0,62	0,67	không gắn kết	A, 25C
2524_D09	0,64	0,81	gắn kết yếu	A, 25C
2524_E10	1,34	1,42	không gắn kết	A, 25C
2524_H05	0,88	0,87	gắn kết yếu	A, 25C
2524_H11	1,12	1,22	không gắn kết	A, 25C
2525_B01	1,29	1,58	gắn kết yếu	A, 25C
2525_D02	0,24	0,30	không/gắn kết yếu	A, 25C
2525_D05	1,28	1,99	không gắn kết	A, 25C
2525_F07	0,79	0,97	không/gắn kết yếu	A, 25C
2987_H07	0,99	2,25	gắn kết yếu	A, 25C
ATI-1267	0,057	0,065	gắn kết yếu	A, 25C
ATI-1275	0,15	0,15	gắn kết yếu	A, 25C
ATI-1277	0,16	0,14	gắn kết yếu	A, 25C
ATI-1107	128	~300	không gắn kết	A, 25C
ATI-1266	0,76	2,57	gắn kết yếu	A, 25C
ATI-1276	4,18	8,8	không gắn kết	A, 25C
ATI-1278	6,04	3,3	không gắn kết	A, 25C
ATI-1338	1,9	3,8	4,6	B, 37C
ATI-1339	3,6	6,9	6,5	B, 37C
ATI-1359	7,9	35,45	gắn kết yếu	A, 25C
ATI-1375	12,6	33,2	gắn kết yếu	A, 25C
ATI-1376	8,21	13,4	gắn kết yếu	A, 25C
ATI-1377	8,21	14,2	gắn kết yếu	A, 25C
ATI-1378	14,4	59,6	gắn kết yếu	A, 25C
ATI-1379	9,5	21,6	gắn kết yếu	A, 25C
PRD-932	1,43	ND	ND	B, 25C
PRD-1474 (aka ATI-1465)	0,59	ND	ND	B, 37C

Ví dụ 7- Ái lực pha dung dịch của các adnectin kháng myostatin

Ái lực dung dịch của PRD-1474, một adnectin kháng myostatin được dung hợp Fc, đối với myostatin được đo bằng thử nghiệm loại trừ động học (KinExA). Việc chuẩn độ PRD-1474 bốn lần được thực hiện bằng myostatin ở nồng độ monome bằng 2 nM (n=2), 1nM (n=1), và 0,7nM (n=1). Nồng độ myostatin không gắn kết tương đối được đo bằng cách bắt giữ trên chất nền rắn ATI-1310 (được ghép cặp với các hạt polyacrylamit

qua xystein không được xử lý kỹ thuật) tiếp theo phát hiện cấu trúc được đánh dấu huỳnh quang của đồng thụ thể myostatin, ActRIIB-Ig có thể gắn kết myostatin đồng thời với adnectin. ATI-13101 là adnectin liên quan cạnh tranh với PRD-1474 để gắn kết với myostatin và cho phép bắt giữ myostatin không gắn kết. Phân tích Kd toàn bộ được thể hiện trong Bảng 13 cho thấy Kd bằng 170 pM với khoảng tin cậy 95% là 330-60 pM. Các ái lực của PRD-1177 và ATI-1338 cũng được đo bằng cách sử dụng cùng định dạng thử nghiệm. Việc chuẩn độ PRD-1177 ba lần được thực hiện bằng myostatin ở nồng độ monome bằng 1nM (n=2) và 0,8 nM (n=1). Việc chuẩn độ ATI-1338 ba lần được thực hiện bằng myostatin ở nồng độ monome bằng 5 nM (n=1), 1,6 nM (n=1), và 1,4 nM (n=1). Các phân tích này chỉ ra rằng PRD-1177 gắn kết myostatin với giá trị Kd toàn bộ bằng 250 pM và khoảng tin cậy 95% bằng 340-130 pM (Bảng 13). ATI-1338 gắn kết myostatin với giá trị Kd toàn bộ bằng 850 pM và khoảng tin cậy 95% bằng 1400-330 pM.

Bảng 13. Đo ái lực pha dung dịch KinExA để gắn kết myostatin.

Adnectin	**Kd**	**Khoảng tin cậy 95%:**	
		Kd cao	**Kd thấp**
PRD-1474	170 pM	330 pM	60 pM
PRD-1177	250 pM	340 pM	130 pM
ATI-1338	850 pM	1400 pM	330 pM

Ví dụ 8 - Phân tích đột biến của 3116_A06

Để hiểu mức cho phép tương đối của các vị trí vòng đối với đột biến, hai nghiên cứu tương tự nhưng riêng biệt được tiến hành. Nghiên cứu thứ nhất là quét alanin truyền thống, trong đó việc gắn kết và hiệu lực của các đột biến alanin riêng biệt trong các vòng adnectin 3116_A06 (SEQ ID NO.118) được đánh giá trong các thử nghiệm sinh hóa và trên cơ sở tế bào. Nghiên cứu thứ hai bao gồm quét đột biến sâu trong đó các tác giả sáng chế đã tạo ra thư viện các đột biến một vị trí trong cùng các vị trí của 3116_A06 (SEQ ID 118), nhưng mỗi vị trí được thế bằng 20 trong số các axit amin có thể. Sau đó, các thành phần thư viện này được biểu hiện dưới dạng thể dung hợp protein-ARN thông tin và đưa vào một chu kỳ hiển thị ARN thông tin (như được mô tả trong Phần IV), tách các thành phần thư viện được kết hợp với myostatin được biotin hóa khỏi các thành phần còn lại không gắn kết bằng cách sử dụng các hạt từ streptavidin. Trong phương pháp này, việc giải trình tự thế hệ kế tiếp của quần thể nhập vào và gắn kết cho phép xác định mức độ làm giàu/làm nghèo tương đối của mỗi trình tự, phản ánh ái lực bên trong của nó đối với myostatin.

Quét Alanin: Việc gây đột biến định hướng vị trí PCR được sử dụng để tạo ra đột biến alanin một vị trí trong 3116_A06 (SEQ ID NO.118) trong vòng BC (các gốc 25-33), vòng DE (các gốc 55-58), và vòng FG (các gốc 80-89). Các dòng được biểu hiện trong *E. coli* và được tinh chế bằng HTPP như được mô tả trong ví dụ 1. Sắc ký loại cỡ (SEC, như được mô tả trong ví dụ 2) xác nhận rằng tất cả các protein được thế alanin chủ yếu là monome (Bảng 14). Cả hai thử nghiệm ARE-luxiferaza (ví dụ 3) và HTRF (ví dụ 4) được thực hiện. Trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh HTRF, hiệu lực nằm trong khoảng từ IC50 = 1,5 nM đến >100nM (Bảng 14). Hầu hết các vị trí cho phép thay thế alanin trong thử nghiệm HTRF đến mức độ nào đó, ngoại trừ Gly55, Arg56, và Gly57 của vòng DE, mà gắn kết với nó bị giảm mạnh (IC50s >100nM). Tác dụng kém hơn xảy ra ở các vị trí Gly30 của vòng BC, và Val80, Thr81, và Tyr88 của vòng FG, vẫn cho thấy gắn kết nhưng với IC50 tăng >10Lần so với trình tự gốc ("WT"). Trong thử nghiệm trên cơ sở tế bào ARE-luxiferaza, hiệu lực của thể đột biến nằm trong khoảng từ IC50 = 0,6 nM đến >100nM (Bảng 14). Ảnh hưởng của các đột biến alanin thường lớn hơn trong thử nghiệm trên cơ sở tế bào so với thử nghiệm HTRF. Gly55, Arg56, và Gly57 của vòng DE và Val80 và Tyr88 của vòng FG tất cả đều thể hiện sự giảm mạnh hiệu lực trong thử nghiệm này, với IC50 >100nM. Tác dụng vừa phải hơn được quan sát thấy đối với các vị trí trên BC Leu26, Pro27, His28, Gly30, và Asn33, và các vị trí trên FG Thr81, Tyr85, và Leu86, tất cả đều có IC50 >10Lần so với trình tự gốc.

Bảng 14: Mô tả đặc điểm sinh hóa và hiệu lực trên cơ sở tế bào của các thể đột biến alanin của 3116_A06

	Đột biến	**SEC***	**Myostatin HTRF IC50 (nM)**	**Myostatin ARE-luc IC50 (nM)**
	WT gốc	1	0,3	0,6
BC	S25A	1	0,8	2,9
	L26A	1	2,3	16
	P27A	1	1,0	10
	H28A	1	0,8	6,2
	Q29A	1	0,7	1,5
	G30A	2	5,1	40
	K31A	1	0,6	2,2
	N33A	1	2,0	9,8
DE	G55A	2	>100	>100
	R56A	1	55	>100
	G57A	1	>100	>100

	V58A	2	1,6	3,3
FG	V80A	1	4,0	>100
	T81A	1	4,9	32
	D82A	1	0,8	1,8
	T83A	1	1,3	1,8
	G84A	1	2,0	3,6
	Y85A	1	2,0	5,5
	L86A	2	1,4	12
	K87A	1	0,8	2,0
	Y88A	1	11	>100
	K89A	1	0,7	1,6

*SEC 1: monome cao; SEC 2: chủ yếu là monome

Quét đột biến sâu: Giải trình tự hiệu suất cao được kết hợp với hiển thị protein cho phép đo đồng thời sự phù hợp tương đối của mọi thể đột biến vòng một vị trí có thể, trên thang mà sẽ khó khăn đối với phương pháp truyền thống như phương pháp được mô tả trên đây (để xem xét các phương pháp "quét đột biến sâu", xem Araya et al., *Trends in Biotechnology* 29: 435-442, 2011; phương pháp tương tự được minh họa thêm trong Forsyth et al., *mAbs 5*: 523-532, 2013).

Cấu trúc thư viện và chọn lọc: Ba thư viện riêng biệt được tạo ra chứa mọi đột biến một vị trí có thể trong mỗi trong số ba vòng của 3116_A06 (SEQ ID NO.118): vòng BC (các vị trí 25-33), vòng DE (các vị trí 55-58), và vòng FG (các vị trí 80-89). Đối với mỗi vòng, nhiều oligonucleotit được thiết kế được phối hợp riêng biệt cođon NNK ở mỗi vị trí, trong đó N=A, C, G, T và K=G, T. Việc sử dụng các cođon thoái hóa này cho phép mã hóa tất cả 20 axit amin (cộng với cođon kết thúc) ở vị trí trong đó NNK được phối hợp. Các oligonucleotit được lắp ráp thông qua PCR kéo dài chồng chéo để tạo ra thư viện adnectin có chiều dài đầy đủ, trong đó Lib-BC chứa mọi đột biến một axit amin trên vòng BC của 3116_A06, Lib-DE chứa mọi đột biến một axit amin trên vòng DE của 3116_A06, và Lib-FG chứa mọi đột biến một axit amin trên vòng FG của 3116_A06. Ba thư viện được biểu hiện dưới dạng phân tử dung hợp ARN thông tin-protein bằng cách dung hợp protein theo Xu et al., *Chemistry & Biology* 9: 933-942, 2002. Các phân tử dung hợp protein Lib-BC, Lib-DE, và Lib-FG được chọn riêng biệt bằng 3 nM myostatin được biotin hóa, và tiếp theo, các phân tử gắn kết được bắt giữ trên các hạt từ streptavidin. Chất gắn kết được rửa giải khỏi hạt bằng cách sử dụng 100mM KOH. Các phân tử được rửa giải khỏi hạt là các biến thể của 3116_A06 có thể vẫn gắn kết với

myostatin, trong khi các phân tử có mặt trong thư viện ban đầu nhưng không được tìm thấy trong dịch rửa giải là các biến thể của 3116_A06 không gắn kết với myostatin.

Tạo mã vạch NGS và trộn: Hai quần thể, đầu vào (trước khi gắn kết myostatin) và chất gắn kết (được rửa giải từ hạt sau khi chọn lọc), có nguồn gốc từ một trong số ba thư viện (Lib-BC, Lib-DE, và Lib-FG) được thu và khuếch đại riêng biệt. Mỗi quần thể được chỉ thị bằng 5'- TruSeq Universal Adaptor, 3'- Truseq Adaptor II, và mã vạch 6-nucleotit duy nhất bởi PCR. Tổng số sáu quần thể được tạo mã vạch, sau đó, được định lượng riêng biệt và trộn (Lib-BC: Lib-DE: Lib-FG = 9:4:10) dựa trên số lượng các gốc ngẫu nhiên trong mỗi vòng, để thu được số trình tự tương tự trên mỗi vị trí ngẫu nhiên về mặt thống kê. Mẫu gộp được giải trình tự bằng cách giải trình tự thế hệ kế tiếp đầu được tạo cặp 150bp MiSeq (Illumina).

Phân tích dữ liệu NGS: Các trình tự được đọc ngược từ việc giải trình tự thế hệ kế tiếp được xác định theo quần thể, vị trí đột biến, và việc xác định axit amin đột biến. Tất cả các trình tự chất lượng kém và các trình tự chứa nhiều vị trí đột biến bị loại bỏ khỏi phân tích. Tiếp theo, tần suất của mỗi trình tự trong quần thể sau chọn lọc được chia cho tần suất của nó trong quần thể đầu vào để thu được tỷ lệ giàu (ER). So sánh các ER của các trình tự gốc (WT, làm đối chứng dương) và các trình tự chứa codon kết thúc (làm đối chứng âm tính, biểu thị độ nhiễu nền của sự sống theo xác suất) cho thấy rằng tỷ lệ của tín hiệu so với nền (S/B) thay đổi giữa ba vòng, có lẽ do mỗi thư viện vòng được đặt thông qua việc chọn lọc riêng biệt. Vì lý do này, mọi trình tự được chuẩn hóa đến kết thúc trung bình và ER_{wt} trung bình đối với vòng cụ thể của chính nó, thu được ER^{norm}.

$$\mathbf{ER^{norm}} = \frac{\mathbf{ER} - \mathbf{ER}_{kết\ thúc}}{\mathbf{ER}_{wt} - \mathbf{ER}_{kết\ thúc}}$$

Việc quét đột biến sâu được kiểm duyệt bằng cách so sánh sự phù hợp tương đối giữa các thể đột biến alanin một vị trí và dữ liệu sinh hóa từ việc quét alanin truyền thống. Nhìn chung, mức độ tương quan là khá lớn (Fig.8). ER NGS xác định kiểu làm giàu và làm nghèo các thể đột biến alanin qua các vòng liên quan mật thiết với ảnh hưởng quan sát được trong các thử nghiệm HTRF và ARE-luxiferaza.

HTRF IC_{50} sinh hóa cũng được vẽ đồ thị trực tiếp so với NGS ER^{norm} đối với mỗi thể đột biến alanin, như được thể hiện trên Fig.9.

Dựa trên mối tương quan alanin, ba loại được thiết lập trong đó tất cả các đột biến axit amin một vị trí có thể được xác định thông qua các tỷ lệ làm giàu NGS của chúng: Các đột biến được ưu tiên nhất ($ER^{norm} > 0,8$), các đột biến được ưu tiên hơn ($ER^{norm} > 0,5$), và các đột biến được ưu tiên ($ER^{norm} > 3$ độ lệch chuẩn so với $ER_{kết\ thúc}$ trung bình vòng). Giới hạn dưới của ER^{norm} xác định loại sau cùng khác biệt đối với ba vòng: BC = 0,25; DE = 0,15; FG = 0,35. Tất cả các thể đột biến một vị trí trong các vòng của 3116_A06 được xác định theo các tỷ lệ làm giàu được chuẩn hóa của chúng để xác định mức cho phép tương đối của mỗi vị trí với đột biến (Bảng 15).

Bảng 15: Các đột biến một vị trí trong các trình tự vòng của 3116_A06 duy trì gắn kết với myostatin

Vị trí		Đột biến được ưu tiên	Đột biến được ưu tiên hơn	Đột biến được ưu tiên nhất
25	X_{51}	ACDFHIKLNQRSTVWY	CFISVWY	FSW
26	X_{52}	LMV	L	L
27	X_{53}	ACDEIKLMNPQRSTVY	P	P
28	X_{54}	ACDEFGHIKLMNQRSTVWY	CDEFGHIKLMNQRSTVWY	CFGIKLMNRSTVWY
29	X_{55}	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACEFHIKLMPQRSTVY
30	X_{56}	GS	G	G
31	X_{57}	ACDEFGHIKLMNQRSTVWY	ACGHIKLMNQRSVWY	ACHKLMNRVWY
32	X_{58}	ACGLMST	AGLMS	AGL
33	X_{59}	ACFHNPQRSY	CHNQSY	HNQ
55		G	G	G
56		R	R	R
57		G	G	G
58	X_{60}	ACDEFIKLMNQSTV	CEILMQTV	CEILMV
80	X_{61}	ACFILMQTVWY	ACILMV	IV
81	X_{62}	ACFGHIKLMNQRSTVWY	CFHILMQRSTVWY	CFILMTVWY
82	X_{63}	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACDEFGHILMNPQSTVWY	ACDEFGHILMNQSTV
83	X_{64}	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACDEFGHIKLMNQRSTVWY	ACDFGILMNQSTVWY
84	X_{65}	ACDEFGHIKLMNQRSTVWY	ADEFGHILMNQSTVWY	AGSTW
85	X_{66}	ACFHILMNPSTVWY	CFILMPTVWY	FIVWY
86	X_{67}	ACEFHIKLMNQRSTVWY	CFHIKLMNQRTVWY	FHILMVWY
87	X_{68}	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACEFGIKLMNPQRSTVWY	ACFGIKLMTVW
88	X_{69}	FWY	WY	WY
89	X_{70}	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	ACDEGHKLMNPQRSTV	AGKLMPQR

Bằng cách sử dụng dữ liệu quét đột biến sâu đầy đủ, các vị trí vòng BC 25, 26, 27, 30, 32, và 33, các vị trí vòng DE 55, 56, và 57, và các vị trí vòng FG 80 và 88 có vẻ được bảo thủ nhất, trong đó chỉ một hoặc vài loại axit amin ở các vị trí này duy trì gắn kết với myostatin. Mặt khác, các vị trí khác có mức cho phép đột biến cao, bao gồm các vị trí vòng BC 28, 29, và 31, và các vị trí vòng FG 82, 83, và 87.

Ví dụ 9 - Đánh giá dược động học của adnectin kháng myostatin

Để khảo sát kiểu dược động học của các adnectin với các định dạng được gắn PEG khác nhau, adnectin kháng myostatin 2987_H07 được định dạng bằng PEG 40 KD 2-nhánh (ATI-1338), PEG 40 KD 4-nhánh (ATI-1339), và Bis 20 KD PEG (ATI-1341). Các nghiên cứu dùng dưới da một liều bằng ba adnectin được gắn PEG này được thực hiện ở chuột nhắt C57BL6. Tổng số nồng độ thuốc được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Thử nghiệm miễn dịch PK phân tích sinh học để định lượng ATI-1338 sử dụng thử nghiệm ELISA định dạng kẹp chuẩn, trong đó 1338 được bắt giữ bởi kháng thể đơn dòng vào protein HIS-TAG, sau đó, phát hiện bằng kháng thể kháng PEG đa dòng. Như được thể hiện trong bảng 16, hai định dạng được gắn PEG 40 KD, ATI-1338 và ATI-1339, tạo ra mức tăng dược động học nổi trội hơn (tức là, thời gian bán thải ($t_{1/2}$) dài hơn và mức tiếp xúc chuẩn hóa theo liều cao hơn) so với định dạng được gắn PEG Bis-20 KD, ATI-1341.

Bảng 16. So sánh dược động học của ba định dạng được gắn PEG của adnectin 2987_H07

Thông số PK	ATI-1338	ATI-1339	ATI-1341
Liều (mg/kg)	5	3,9	4
Cmax/liều (nM/(mg/kg))	547	370	113
Tmax (giờ)	24	24	4
AUC/liều (nM*giờ/(mg/kg))	32	23	2,1
$t_{1/2}$ (giờ)	25	31	16

Các nghiên cứu liều đơn sau khi dùng trong tĩnh mạch và dưới da các adnectin kháng myostatin được dung hợp Fc (PRD-1177, PRD-1286, và PRD-1474) được tiến hành ở chuột nhắt C57BL6 để đánh giá tác dụng của thể dung hợp Fc đối với các thông số dược động học. Tổng số nồng độ thuốc được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Thử nghiệm miễn dịch PK phân tích sinh học để định lượng các thể tiếp hợp Fc đối với PRD1177, 1474, và 1286, tất cả sử dụng thử nghiệm ELISA định dạng kẹp chuẩn bằng kỹ thuật ECL, trong đó 1177 được bắt giữ bằng kháng thể đa dòng vào adnectin khung, sau đó, phát hiện bằng kháng thể kháng IgG của người. Như được thể hiện trong bảng 17, tất cả ba adnectin được dung hợp Fc có thời gian bán thải dài hơn (58 -172 giờ) so với adnectin được gắn PEG ATI-1338 (25 giờ). Sinh khả dụng SC thấp hơn có thể phản ánh sự phân giải protein trong quá trình chuyển tiếp kẽ và mạch bạch huyết của phân tử sinh

vật học. Sinh khả dụng SC của các adnectin được dung hợp Fc là nằm trong khoảng hợp lý dựa trên các tài liệu đã công bố (ví dụ, Richter et al., *AAPS J.* 2012;14:559-70).

Bảng 17. So sánh dược động học của ba adnectin kháng myostatin được dung hợp Fc

Thông số PK	PRD-1177	PRD-1286	PRD-1474
Liều (mg/kg)	2	2	2
Độ thanh thải (mLphút/kg)	0,017	0,016	0,014
Vdss (l/kg)	0,093	0,190	0,054
$t_{1/2}$ (giờ)	68	172	58
Sinh khả dụng SC	60%	100%	94%

Ví dụ 10 - Cơ chế ức chế adnectin kháng myostatin

ELISA cạnh tranh: Thử nghiệm gắn kết cạnh tranh để đánh giá khả năng của các adnectin kháng myostatin để cạnh tranh với thụ thể ActRIIB trong việc gắn kết với myostatin được thực hiện bằng cách sử dụng ELISA cạnh tranh. Các đĩa Nunc Maxisorp được phủ 2µg/mL ActRIIb-Fc (R&D Systems) trong dung dịch đệm natri cacbonat 0,2M pH 9,6 qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau khi rửa bằng PBS-T (PBS chứa 0,05% Tween-20), các giếng được phong bế bằng dung dịch đệm OptEIA (BD Biosciences) trong 1 giờ ở nhiệt độ 25°C kết hợp lắc. Myostatin (10nM; R&D Systems) được ủ trước bằng adnectin hoặc chất cạnh tranh ActRIIb-Fc ở một khoảng nồng độ (0,2 pM đến 1µM) trong dung dịch đệm OptEIA trong 1 giờ ở nhiệt độ 25°C kết hợp lắc. Đĩa thử nghiệm đã phủ và phong bế được rửa bằng PBS-T, và sau đó, hỗn hợp myostatin/chất cạnh tranh được bổ sung và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 25°C kết hợp lắc. Đĩa thử nghiệm này được rửa bằng PBS-T, sau đó, myostatin gắn kết được phát hiện bằng kháng myostatin đa dòng dê được biotin hóa 1:1000 (R&D các hệ thống) được pha loãng trong OptEIA, trong 1 giờ ở nhiệt độ 25°C kết hợp lắc. Sau khi rửa bằng PBS-T, Streptavidin-HRP 1:5000 (Thermo/Pierce) được pha loãng trong OptEIA được bổ sung, tiếp theo ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 25°C kết hợp lắc. Đĩa thử nghiệm được phát triển bằng TMB (BD Biosciences), làm ngừng bằng axit sulfuric 2N, và đọc độ hấp thụ ở A450. Như được thể hiện trên Fig.10, ActRIIb-Fc trong dung dịch phong bế hoàn toàn myostatin gắn kết với ActRIIb-Fc được phủ trên đĩa, như được mong đợi. Ngược lại, tuy nhiên, PRD-1288 (khác với PRD-1474

chỉ ở trình tự gốc liên kết), PRD-1285, và PRD-1286 ở các nồng độ lên đến 1μM không phong bế myostatin khỏi gắn kết với ActRIIb.

SPR cạnh tranh: Thử nghiệm gắn kết cạnh tranh đánh giá khả năng của các adnectin kháng myostatin để cạnh tranh với các thụ thể typ I và typ II trong việc gắn kết với myostatin hoặc BMP11, dưới dạng chất thay thế cho myostatin, cũng được tiến hành bằng cách sử dụng SPR trên thiết bị Biacore T100, ở hai định dạng thử nghiệm khác nhau. Ở "SPR định dạng A", bề mặt chip cảm biến được tạo ra bằng cách làm bất động 100 ug/mL protein A (Pierce) trong 10mM axetat, độ pH = 4,5 đến mật độ 4500 RU trên chip cảm biến CM5 (Biacore/GE Healthcare) bằng cách sử dụng hóa học etyl(dimetylaminopropyl) carbođiimit (EDC) / N-hyđroxysucxinimit (NHS) chuẩn, kết hợp với phong bế etanolamin. ALK4-Fc (R&D Systems), ALK5-Fc (R&D Systems), ActRIIB-Fc (được sản xuất nội bộ), kháng thể đơn dòng kháng myostatin/BMP11 (mAb-A) cạnh tranh để gắn kết với myostatin với ActRIIB nhưng không cạnh tranh với 3116A06 để gắn kết với mysotatin (được sản xuất nội bộ), hoặc adnectin-Fc PRD-1474 ở các nồng độ bằng 7-13μg/mL được bắt giữ thông qua đuôi Fc đến mật độ bề mặt nằm trong khoảng 1600 - 4300 RU bằng cách tiêm 60 giây ở tốc độ 10μLphút. Thử nghiệm cạnh tranh được thực hiện bằng cách cho chạy 100nM myostatin (R&D Systems) hoặc BMP11 (R&D Systems) trên bề mặt khi không có hoặc có 200nM adnectin ATI-1523 ở tốc độ dòng bằng 30μLphút với thời gian liên kết và phân ly là 180 giây . Dung dịch đệm chạy cho thử nghiệm bất động và cạnh tranh là 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, và 0,05% thể tích/thể tích chất diện hoạt P20, độ pH = 7,4, và các bề mặt được tái sinh giữa các chu kỳ bằng hai lần tiêm 10mM glyxin pH 1,5 trong 30 giây ở tốc độ 30μLphút.

Ở SPR định dạng A, BMP11 gắn kết đặc hiệu với các bề mặt ALK4-Fc, ALK5-Fc, ActRIIB-Fc, mAb-A, và PRD-1474, còn myostatin gắn kết đặc hiệu, với ActRIIB-Fc, mAb-A, và PRD-1474, nhưng không gắn kết với ALK4-Fc hoặc ALK5-Fc. Để đánh giá tác dụng của ATI-1523 đối với việc gắn kết myostatin hoặc BMP11, các đáp ứng gắn kết của mỗi protein ở cuối pha liên kết 180 giây được chuẩn hóa đến 100%, và so sánh với các đáp ứng gắn kết với myostatin hoặc BMP11 với sự có mặt của ATI-1523 (Bảng 18). ATI-1523 phong bế hoàn toàn gắn kết của myostatin hoặc BMP11 với bề mặt PRD-1474 đối chứng, như được mong đợi. Trong thử nghiệm đánh giá khả năng của ATI-1523 để

phong bế tương tác của myostatin với ALK4-Fc hoặc ALK5-Fc, BMP-11, cũng gắn kết với ALK4-Fc và ALK5-Fc, được sử dụng làm chất thay thế cho myostatin, do myostatin đơn lẻ không gắn kết đáng kể với ALK4-Fc và ALK5-Fc dưới định dạng thử nghiệm này. ATI-1523 làm giảm đáng kể tín hiệu gắn kết của BMP11 đối với ALK4-Fc (mức giảm 98%) và ALK5-Fc (mức giảm 69%), gợi ý rằng adnectin cạnh tranh để gắn kết với myostatin với các thụ thể typ I. Ngược lại, đáp ứng gắn kết tăng quan sát thấy đối với các phức hợp myostatin/ATI-1523 hoặc BMP11/ATI-1523 trên bề mặt ActRIIB-Fc hoặc mAb-A, gợi ý rằng các phức hợp myostatin/ATI-1523 hoặc BMP11/ATI-1523 có thể gắn kết với các bề mặt này, tức là adnectin không cạnh tranh với ActRIIB-Fc hoặc mAb-A. Mức tăng lớn trong đáp ứng gắn kết (mức tăng >1000%) của phức hợp myostatin/ATI-1523 trên các bề mặt ActRIIB-Fc và mAb-A là phù hợp với adnectin có tác dụng hoà tan trên myostatin.

Bảng 18: Đáp ứng gắn kết SPR của 100nM myostatin hoặc 100nM BMP11 khi không có hoặc có mặt 200nM ATI-1523 trên các bề mặt ALK4-Fc, ALK5-Fc, ActRIIB-Fc, mAb-A, hoặc PRD-1474.

Chất phân tích	**ALK4-Fc**	**ALK5-Fc**	**ActRIIB-Fc**	**mAb-A**	**PRD-1474**
Myostatin			100%	100%	100%
Myostatin + ATI-1523			1313%	1544%	-2%
BMP11	100%	100%	100%	100%	100%
BMP11 + ATI-1523	2%	31%	189%	258%	-1%

Sự cạnh tranh của adnectin bằng cách sử dụng "SPR định dạng B": Cơ chế tác dụng đối với các adnectin kháng myostatin còn được đánh giá trong "SPR định dạng B", trong đó myostatin hoặc BMP11 (10µg/mL trong 10mM axetat, độ pH = 4,5) được giữ cố định trực tiếp trên bề mặt chip cảm biến CM5 bằng cách sử dụng hóa học ghép cặp EDC/NHS đến mật độ 985 RU (myostatin) hoặc 530 RU (BMP11). Theo sáng chế, đáp ứng gắn kết của các thụ thể ALK4-Fc (R&D Systems), ALK5-Fc (R&D Systems), hoặc ActRIIB-monome (được sản xuất nội bộ) được tiêm đơn lẻ (2µM trong 180 giây ở 30µLphút), được so sánh với đáp ứng gắn kết của các thụ thể này sau khi gắn kết trước thể dung hợp adnectin-Fc PRD-1474 vào bề mặt (1µM trong 480 giây ở 30µLphút). Dung dịch đệm chạy cho thử nghiệm bất động và cạnh tranh là 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, và 0,05% thể tích/thể tích chất diện hoạt P20, độ pH = 7,4, và các bề mặt được tái sinh giữa các chu kỳ bằng 4 lần tiêm 50mM NaOH trong 15 giây ở tốc độ 30µLphút.

Khi không có PRD-1474, mỗi thụ thể được gắn kết đặc hiệu với BMP11 được giữ cố định, trong khi chỉ ALK5-Fc và ActRIIB-monome, nhưng không phải ALK4-Fc, gắn kết với myostatin được giữ cố định. Việc gắn kết trước PRD-1474 làm giảm đáng kể tín hiệu gắn kết của ALK4-Fc đối với BMP11 (mức giảm 70%) và cũng làm giảm việc gắn kết của ALK5-Fc đối với myostatin hoặc BMP11 (mức giảm 35-41%), nhưng có ảnh hưởng tối thiểu trên việc gắn kết ActRIIB-monome với bề mặt myostatin hoặc BMP11, Bảng 19. Dữ liệu này, được lấy cùng với dữ liệu cạnh tranh SPR từ "SPR định dạng A" (Bảng 18), dữ liệu ELISA cạnh tranh (Fig.10), và sự ức chế hoàn toàn tín hiệu myostatin quan sát được trong thử nghiệm ARE-luxiferaza (Fig.11), chứng tỏ rằng cơ chế tác động của adnectin là phong bế tuyển chọn các thụ thể tín hiệu typ I (ALK4/5), và các adnectin không cạnh tranh gắn kết với thụ thể typ II (ActRIIB).

Bảng 19: Đáp ứng gắn kết SPR của 1μM ALK4-Fc, ALK5-Fc, hoặc ActRIIB-monome trên các bề mặt myostatin hoặc BMP11 được giữ cố định có hoặc không có PRD-1474 được gắn kết trước.

Bề mặt	**PRD-1474 gắn kết trước**	**ALK4-Fc**	**ALK5-Fc**	**ActRIIB-monome**
Myostatin	không		100%	100%
	có		55%	111%
BMP11	không	100%	100%	100%
	có	30%	65%	92%

Do các adnectin này thể hiện họ trình tự theo sáng chế trong sáng chế này, và các dòng riêng trong họ trình tự đã được xác định duy trì cùng vị trí gắn kết, các trình tự được bao hàm tác động của sáng chế này bằng cách phong bế sự tuyển chọn ALK4/5 vào phức hợp myostatin-ActRIIb.

Dữ liệu dược động học còn chỉ ra rằng các mức phức hợp myostatin-adnectin tích luỹ theo thời gian và các phức hợp này gắn kết với ActRIIb, do đó, tác động như chất ức chế tín hiệu âm nổi trội không phụ thuộc vào thuốc tự do. Cơ chế duy nhất này phân biệt các adnectin kháng myostatin theo sáng chế và các kháng thể kháng myostatin được mô tả trong các tài liệu (ví dụ, US 7632499), và cho thấy rằng các adnectin kháng myostatin theo sáng chế có hoạt tính tăng.

Ví dụ 11: Lập bản đồ vị trí gắn kết adnectin trên myostatin bằng cách sử dụng HDX-MS:

Vị trí gắn kết adnectin trên myostatin cũng được đánh giá bằng cách sử dụng phổ khối trao đổi hyđro-đoteri (hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry - HDX-MS).

Phương pháp phổ khối trao đổi hyđro/đoteri (HDX-MS) dò cấu hình protein và động lực học cấu hình trong dung dịch bằng cách giám sát mức độ trao đổi đoteri và mức độ trong amit hyđro xương sống. Mức HDX phụ thuộc vào khả năng tiếp cận dung môi của amit hyđro xương sống và cấu hình của protein. Mức tăng khối lượng của protein khi HDX có thể được đo chính xác bằng MS. Khi kỹ thuật này được ghép với sự phân cắt bằng enzym, thì các đặc điểm cấu trúc ở mức peptit có thể thu được, cho phép biệt hóa peptit được tiếp xúc bề mặt so với peptid được gấp cuộn bên trong, hoặc so với peptit được tạo phức ở bề mặt chung của phức hợp protein-protein. Thông thường, các thử nghiệm đánh dấu đoteri và sau đó làm ngừng được thực hiện, tiếp theo phân cắt pepsin trực tuyến, tách peptit, và phân tích MS.

Do myostatin đơn lẻ được thấy là có độ tan thấp không thích hợp để HDX-MS dưới các điều kiện độ pH liên quan về sinh lý học (< 10µg/mL), các tác giả sáng chế đã sử dụng chiến thuật thay thế làm tăng độ tan myostatin bằng cách tạo phức protein với mảnh Fab từ mAb-A (Fab-A), đã thể hiện là không cạnh tranh với adnectin bằng cách sử dụng thử nghiệm SPR được mô tả trong ví dụ 10. Trạng thái oligome của các mẫu HDX-MS được đặc trưng bởi sắc ký loại cỡ được ghép với đetectơ tán xạ ánh sáng bằng laze đa góc (size-exclusion chromatography coupled to a multi-angle laser light scattering detector - SEC-MALS), trong đó khối lượng được xác định bằng MALS của phức hợp myostatin/Fab-A (~120 kDa) là phù hợp với hệ số tỷ lượng được mong đợi của một myostatin homođime gắn kết với hai phân tử Fab-A, và khối lượng được xác định bằng MALS của phức hợp myostatin/Fab-A/3116_A06 (142 kDa) là phù hợp với hệ số tỷ lượng được mong đợi của một myostatin homođime gắn kết với hai phân tử Fab-A cộng với hai phân tử 3116_A06.

Trước khi lập bản đồ vị trí gắn kết adnectin trên myostatin được nhận diện bởi adnectin 3116_A06 bằng HDX-MS, thử nghiệm không được đoteri hóa được thực hiện để tạo ra danh sách các peptit tiêu hóa thông thường của myostatin từ các mẫu myostatin/Fab-A (tỷ lệ mol 1:1 ở mỗi 30µM) và myostatin/Fab-A/3116_A06 (tỷ lệ mol 1:1:1 ở mỗi 30µM), đạt được độ bao phủ trình tự là 83,5% đối với myostatin. Trong thực

nghiệm này, 10mM dung dịch đệm phosphat (pH 7,0) được sử dụng trong bước đánh dấu, tiếp theo bổ sung dung dịch đệm làm ngừng (200mM dung dịch đệm phosphat với 4M GdnCl và 0,5M TCEP, pH 2,5, 1:1, thể tích/thể tích). Đối với thử nghiệm lập bản đồ vị trí gắn kết adnectin, 5µL mỗi mẫu (myostatin/Fab-A hoặc myostatin/Fab-A/3116_A06) được trộn với 65µL dung dịch đệm đánh dấu HDX (10mM dung dịch đệm phosphat trong D2O, pD 7,0) để khơi mào phản ứng đánh dấu ở nhiệt độ phòng (~25°C). Các phản ứng được thực hiện trong các khoảng thời gian khác nhau: 20 giây, 1 phút, 10 phút, 60 phút, và 240 phút. Vào cuối mỗi giai đoạn phản ứng đánh dấu, phản ứng được làm ngừng bằng cách bổ sung dung dịch đệm làm ngừng (1:1, thể tích/thể tích) và mẫu đã làm ngừng được bơm vào hệ Waters HDX-MS để phân tích. Các peptit tiêu hóa thông thường quan sát được được giám sát mức độ hấp thụ đoteri của chúng khi không có/có mặt 3116_A06.

Dữ liệu thực nghiệm thu được từ phép đo HDX-MS chứng tỏ rằng adnectin 3116_A06 nhận diện vị trí gắn kết adnectin không liên tục bao gồm hai vùng peptit trong myostatin:

Vùng 1: LYFNGKEQIIYGKIPAM (85-101); SEQ ID NO.329

Vùng 2: PHTHLVHQANP (56-66); SEQ ID NO.330

Dựa trên mức độ hấp thụ đoteri tương đối, hai vùng peptit có thể được xếp hạng là vùng 1 > 2, với vùng 1 có mức độ thay đổi đáng kể nhất trong việc hấp thụ đoteri.

Ví dụ 12 - Nối *in silico* adnectin 3116_A06 trên myostatin

Phương pháp máy tính được sử dụng để tạo ra mô hình cấu trúc của phức hợp 3116_A06-myostatin phù hợp với dữ liệu HDX-MS (**Fig.13**). Việc nối protein của 3116_A06 vào cấu trúc của myostatin của người (PDB 3HH2 được lấy từ Ngân hàng dữ liệu protein, www.rcsb.org; Cash et al., *EMBO J.* 28:2662-2676, 2009) được thực hiện bằng cách sử dụng ZDOCK (Chen and Wang, *Proteins* 47:281-294, 2002) như được thực hiện trong phần mềm Accelrys Discovery Studio v3.5 (Accelrys). Quy trình ZDOCK sử dụng việc nối thể bền vững của hai cấu trúc protein (phối tử = 3116_A06 và thụ thể = myostatin). Kiểu nối được lọc đối với các phức hợp chứa các cấu hình của 3116_A06 các vòng FG (các gốc Thr79 đến Tyr88) và BC (các gốc Ser25 đến N33). Phức hợp ưu tiên được chọn dựa trên tính bổ trợ của các gốc bề mặt chung cùng với mối tương quan của

thay thế có lợi trên vòng được nhận diện bằng cách gây đột biến adnectin. Fig.13A thể hiện vị trí gắn kết ALK4 và vị trí gắn kết ActRIIB được lập bản đồ trên cấu trúc myostatin (màu xám). Vùng 1 và vùng 2, được xác định bằng thử nghiệm HDX-MS như được mô tả trong ví dụ 11, được thể hiện bằng màu đen. Fig.13B thể hiện phức hợp ưu tiên từ việc nối, với vòng BC, DE và FG của 3116_A06 (màu đen) được vẽ ở dạng que, và các vùng 1 và 2 của myostatin (màu xám) được biểu diễn ở dạng mô hình đặc. Một số gốc được nhận diện dưới dạng đột biến có lợi cho vòng thể hiện sự đóng góp quan trọng. Ví dụ, trong vòng BC của 3116_A06, các gốc Ser25, Leu26, và Pro27 là quan trọng làm các liên kết cấu trúc để duy trì toàn bộ cấu hình vòng. Ngược lại, Ala32 khớp vào trong khe hở nhỏ kỵ nước được tạo ra ở bề mặt chung của phức hợp và xương sống của gốc tạo ra liên kết hyđro với myostatin. Các thay thế được ưu tiên sử dụng nhất ở vị trí 32 là Gly hoặc Leu, và chúng được dự đoán là khớp tốt thay cho alanin. Tương tự, Asn33 tham gia vào liên kết hyđro với các gốc tryptophan lân cận của myostatin. Các thay thế được ưu tiên sử dụng nhất ở vị trí 33 là His và Gln, cũng chứa các mạch bên có thể góp phần làm người cho liên kết hyđro. Các gốc trong vòng DE có tính quyết định: các thay thế có lợi nhất được giới hạn ở Gly55, Arg56, và Gly 57, và chỉ các thay thế bảo thủ được ưu tiên sử dụng đối với Val58. Trong cấu trúc mô hình, Arg56 là gốc có tính quyết định góp phần vào tương tác cation pi với Y86 của myostatin trong vùng 1 cũng như các liên kết hyđro bổ sung với xương sống và chuỗi bên của các gốc vùng 1 khác. Đối với nhiều gốc vòng FG, các thay thế được ưu tiên sử dụng nhất là các thay thế bảo thủ. Một vị trí có tính quyết định được nhận diện là Tyr88, có tương tác cation pi và tương tác pi-pi vớig Y55 và các gốc khác từ vùng 2 của myostatin. Vòng FG cũng tham gia vào một số tương tác kỵ nước với cả vùng 1 và 2 được nhận diện từ các thử nghiệm gây đột biến. Các tính toàn này thể hiện sự phù hợp tốt với dữ liệu thử nghiệm HDX-MS và SPR.

Ví dụ 13 - Mô hình hiệu lực cơ xương *in vivo* của chuột

Chuột nhắt đực B6.SCID (9-13 tuần tuổi, Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) được nhốt trong lồng được điều chỉnh nhiệt độ với chu kỳ sáng/tối 12 giờ đảo ngược. Nước và thức ăn tiêu chuẩn là có sẵn *tùy thích*. Chuột nhắt được ngẫu nhiên hóa và được phân phối giữa các nhóm điều trị để nhận các hợp chất đối chứng hoặc thử nghiệm theo sáng chế dựa trên thể trọng (khoảng 20-22 g). Để chứng minh hiệu lực *in vivo* của hợp chất theo sáng chế, các hợp chất được sử dụng hằng tuần (các adnectin

kháng myostatin dung hợp Fc) hoặc hai lần một tuần (các adnectin kháng myostatin được gắn PEG) bằng cách tiêm dưới da. Các hợp chất thử nghiệm được sử dụng cho động vật trong dung dịch đệm phosphat (PBS). Các đối chứng chỉ được điều trị bằng dung dịch đệm hoàn nguyên. Các động vật thử nghiệm (n=8-10 con/nhóm) được sử dụng liều trong khung thời gian 14 ngày dưới da, bằng, ví dụ, hợp chất theo sáng chế với lượng 5, 6 hoặc 10mg/kg/tuần. Các phép đo thể trọng được ghi lại trước khi ngẫu nhiên hóa, vào ngày ngẫu nhiên hóa, và hai đến ba lần mỗi tuần trong giai đoạn điều trị và cuối nghiên cứu. Khối lượng cơ cẳng chân dưới được ghi lại từ xác con chuột ở cuối nghiên cứu bằng cách phân tích chụp ảnh cộng hưởng từ định lượng (MRI, Echo Medical Systems, Tex). Các nhóm thử nghiệm được so sánh với nhóm đối chứng. Các kết quả thể hiện rằng các adnectin kháng myostatin theo sáng chế làm tăng tỷ lệ phần trăm thể trọng so với thời điểm ban đầu (Fig.14) và có tác dụng đồng hóa đáng kể đối với thể tích cơ xương (Fig.15), so với chuột nhắt đối chứng (ví dụ, mức tăng khoảng 7-10% thể tích cơ so với đối chứng.

Chụp ảnh cộng hưởng từ (Magnetic resonance imaging - MRI)

MRI để đo thể tích cơ cẳng chân được thực hiện trên Bruker PharmaScan 4.7 Tesla với đường kính lỗ 16cm (Bruker Biospin, Billerica, Ma. USA). Cuộn thể tích 62mm được sử dụng cho thiết bị phát và thiết bị thu. Sau khi thu ảnh cẳng chân dưới của máy dò, ảnh T2 điều chỉnh được thu bằng cách sử dụng sơ đồ lát cắt quanh trục. Trình tự spin-echo nhanh (RARE) gồm xung Hermite 90° tiếp theo là xung Hermite 180° với TR/TE = 2000/23 mili giây. Mười một lát cắt quanh trục được thu từ trên cùng của đầu gối đến mắt cá chân với kích thước ma trận là 256 x 128 điểm dữ liệu. Trường quan sát là 5 cm x 2,5cm, với độ dày lát cắt là 1,25mm và yếu tố RARE gồm 4 và 8 trung bình tín hiệu. Thể tích cơ cẳng chân được tính bởi tổng của tất cả diện tích lát cắt quanh trục nhân với độ dày lát cắt là 1,25mm đối với tổng thể tích cơ ở mỗi cẳng chân. Hình ảnh được phân tích dưới dạng trung bình diện tích của vùng quan tâm (region-of-interests - ROI) bằng cách phân tích trình tự hình ảnh (ISA, Bruker Biospin, Billerica, Ma.). Các ROI thủ công được vẽ quanh cơ cẳng chân ngoại trừ vùng chất béo ở da và dưới da. Tổng thể tích cơ trung bình đối với cả hai cẳng chân được thể hiện trên Fig.15.

MRI đối với thể tích tim là chỉ tiêu lâm sàng an toàn cũng được thực hiện bằng cùng máy quét MRI. Sau khi thu ảnh ban đầu của máy dò của vùng ngực, 9 ảnh quanh

trục được thu từ các mạch máu lớn đến chỏm tim. Tương tự như phân tích của cơ cẳng chân, các diện tích quanh trục được bổ sung và nhân với độ dày lát cắt là 1,25mm để thu được tổng thể tích tim đối với mỗi con chuột. Không có sự thay đổi đáng kể về thể tích tim quan sát được bằng MRI.

Số liệu thống kê

Sự khác biệt giữa các nhóm được đánh giá bằng cách sử dụng phân tích phép kiểm định t student ghép cặp 2 đuôi.

Ví dụ 14 - Hiệu lực của PRD-1474 đối với sự sinh trưởng cơ in vivo

Chuột nhắt đực B6.SCID (n=10/nhóm) được duy trì và được điều trị như được mô tả trong ví dụ 10, ngoại trừ PRD-1474 được sử dụng ở các liều khác nhau như được thể hiện trên Fig.16, và thời gian điều trị là 28 ngày. PRD-1474 ở 1mg/kg cho thấy mức tăng thể tích cơ cẳng chân dưới đáng kể 11,1% so với nhóm đối chứng PBS ($p<0,0001$). Mức tăng đáng kể thể tích cơ cẳng chân dưới là 27,7%, 29,7%, và 32,8% cũng quan sát được lần lượt với PRD-1474 ở 10mg/kg, 30mg/kg, và 100mg/kg. Không có sự thay đổi về thể tích tim quan sát được trong tất cả các nhóm liều điều trị so với đối chứng. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn. Các nhóm liều khác nhau được so sánh bằng cách sử dụng ANOVA. (*$p< 0,0001$; $^{\#}$không có ý nghĩa giữa các nhóm).

Dữ liệu này chứng tỏ rằng các adnectin kháng myostatin theo sáng chế có hiệu quả ở các liều thấp đáng kể so với các chất ức chế myostatin đã được mô tả trước đây (ví dụ, US 7632499, *J. Clin. Onclo*. 30(Suppl):Abstr. 2516, 2012). Do đó, các adnectin kháng myostatin theo sáng chế có hiệu lực tăng ở các liều thấp hơn kết hợp với tác dụng phụ không mong muốn giảm, khi được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp với các chất ức chế myostatin khác hoặc các thuốc khác, để điều trị hao mòn cơ và các bệnh chuyển hóa được mô tả trong bản mô tả này.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
<120> POLYPEPTIT CHỨA MIỀN FIBRONECTIN TYP III, DƯỢC PHẨM, AXIT NUCLEIC, TẾ BÀO VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN MYOSTATIN TRONG MẪU
<130> MXI-514PC
<150> US 61/780,005
<151> 2013-03-13
<150> US 61/700,697
<151> 2012-09-13
<160> 331
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 375
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

```
Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile
1               5                  10                  15
Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn
            20                  25                  30
Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr
        35                  40                  45
Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu
    50                  55                  60
Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu
65                  70                  75                  80
Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val
                85                  90                  95
Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His
            100                 105                 110
Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu
        115                 120                 125
Met Gln Val Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser
    130                 135                 140
Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu
145                 150                 155                 160
Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu
                165                 170                 175
Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu
            180                 185                 190
Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val
        195                 200                 205
Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly
    210                 215                 220
Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr
225                 230                 235                 240
Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys
                245                 250                 255
Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys
            260                 265                 270
Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val
        275                 280                 285
Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr
    290                 295                 300
Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys
305                 310                 315                 320
Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala
                325                 330                 335
Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr
            340                 345                 350
Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val
        355                 360                 365
Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
    370                 375
```

<210> 2
<211> 352
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

```
Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys
1               5                  10                  15
Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala
            20                  25                  30
Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn
        35                  40                  45
Ile Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu
    50                  55                  60
```

```
Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp
65                  70                  75                  80
Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile
                85                  90                  95
Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu Met Gln Val Asp Gly Lys Pro
            100                 105                 110
Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val
        115                 120                 125
Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr
    130                 135                 140
Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly
145                 150                 155                 160
Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly
                165                 170                 175
Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp
            180                 185                 190
Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp
        195                 200                 205
Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp
    210                 215                 220
Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg
225                 230                 235                 240
Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser
                245                 250                 255
Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp
            260                 265                 270
Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly
        275                 280                 285
Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val
    290                 295                 300
His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr
305                 310                 315                 320
Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile
                325                 330                 335
Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
            340                 345                 350
<210>  3
<211>  109
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<400>  3
Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
1               5                   10                  15
Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile
            20                  25                  30
Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu
        35                  40                  45
Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala
    50                  55                  60
Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser
65                  70                  75                  80
Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly
                85                  90                  95
Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
            100                 105
<210>  4
<211>  94
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<400>  4
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1               5                   10                  15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
            20                  25                  30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
        35                  40                  45
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
    50                  55                  60
Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65                  70                  75                  80
Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
                85                  90
<210>  5
<211>  157
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (7)..(21)
<223> Xaa, nếu có mặt, có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (26)..(45)
<223> Xaa, nếu có mặt, có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (54)..(73)
<223> Xaa, nếu có mặt, có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (79)..(98)
<223> Xaa, nếu có mặt, có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (102)..(121)
<223> Xaa, nếu có mặt, có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (131)..(150)
<223> Xaa, nếu có mặt, có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<400> 5
Glu Val Val Ala Ala Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Leu Leu Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Arg
35 40 45
Ile Thr Tyr Gly Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Glu Phe Thr Val Xaa Xaa
65 70 75 80
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95
Xaa Xaa Ala Thr Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr
115 120 125
Ala Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
130 135 140
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
145 150 155
<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (13)..(32)
<223> Xaa, nếu có mặt, có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (53)..(72)
<223> Xaa, nếu có mặt, có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (92)..(111)
<223> Xaa, nếu có mặt, có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<400> 6
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
65 70 75 80
Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile
100 105 110
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
115
<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 7
Ser Trp Ser Leu Pro His Ala Gly His Val Asn
1 5 10
<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 8
Ser Trp Val Ser Pro Arg Gly Arg Ala Arg
1 5 10
<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 9
Ser Trp Glu Val Pro Arg Gly Leu Ala Arg
1 5 10
<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 10
Ser Trp Trp Ala Pro Leu Gly Leu Ala Arg
1 5 10
<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 11
Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Leu Ala His
1 5 10
<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 12
Ser Trp Tyr Leu Pro Tyr Pro Ala His Met Asn
1 5 10
<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 13
Ser Trp Ser Leu Pro Phe Ala Gly His Leu Asn
1 5 10
<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 14
Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Ser Gly Leu Ala Asn
1 5 10
<210> 15
<211> 11

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 15
Ser Trp Ser Leu Pro His Ala Gly His Ala His
1 5 10
<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 16
Ser Trp Thr Leu Pro Asn Phe Gly Leu Ile Asn
1 5 10
<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 17
Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala His
1 5 10
<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 18
Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Ala Gly His Leu Asn
1 5 10
<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 19
Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Ala Ala His Met Asn
1 5 10
<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 20
Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Pro Gly His Leu Asn
1 5 10
<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 21
Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Ala Gly His Ala His
1 5 10
<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 22
Ser Trp Asp Ala Pro Gly Gly Leu Ala Arg
1 5 10
<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 23
Ser Trp Ser Leu Pro Thr Pro Gly Leu Ala His
1 5 10

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 24
Ser Trp Ser Leu Pro His Arg Gly Val Ala Asn
1 5 10
<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 25
Ser Trp Ser Leu Pro Ser Ser Gly Val Ala His
1 5 10
<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 26
Ser Trp Ser Leu Pro His His Gly Phe Gly His
1 5 10
<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 27
Ser Trp Ser Leu Pro His Ala Gly Asp Ala His
1 5 10
<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 28
Ser Trp Ser Leu Pro His Asn Gly Val Ala His
1 5 10
<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 29
Ser Trp Ser Leu Pro Arg Gln Gly Leu Ala Asn
1 5 10
<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 30
Ser Trp Ser Leu Pro Gly Pro Gly His Phe His
1 5 10
<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 31
Ser Trp Ser Leu Pro His Pro Gly Leu Gly His
1 5 10
<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 32

Ser Trp Asp Ala Pro Arg Gly Leu Ala Arg
1 5 10
<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 33
Ser Trp Asp Ala Pro Ala Gly Leu Ala Arg
1 5 10
<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 34
Ser Trp Ser Leu Pro His Gln Gly Lys Ala Asn
1 5 10
<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 35
Ser Trp Asp Ala Pro Lys Gly Leu Ala Arg
1 5 10
<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 36
Ser Trp Ser Leu Pro Asn Pro Gly Ile Ala His
1 5 10
<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 37
Ser Trp Ser Leu Pro Arg Pro Gly Asn Ala His
1 5 10
<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 38
Ser Trp Ser Leu Pro Asn Pro Gly Asn Ala His
1 5 10
<210> 39
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 39
Pro Gly Arg Gly Val Thr
1 5
<210> 40
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 40
Pro Gly Arg Gly Ser Thr
1 5
<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 41
Leu Gly Arg Gly Ser Thr
1 5
<210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 42
Pro Gly Arg Gly Leu Thr
1 5
<210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 43
Ile Gly Arg Gly Ser Thr
1 5
<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 44
Phe Gly Arg Gly Thr Thr
1 5
<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 45
Val Gly Arg Gly Asn Thr
1 5
<210> 46
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 46
Thr Leu Thr Lys Ser Gln Met Ile His Tyr Met Pro
1 5 10
<210> 47
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 47
Thr Ile Tyr Arg Asp Gly Met Ser His His Asp Pro
1 5 10
<210> 48
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 48
Thr Val Tyr Arg Asp Gly Pro Leu Leu Leu Ala Pro
1 5 10
<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 49
Thr Ile Phe Arg Thr Gly Met Val Gln Tyr Asp Pro
1 5 10
<210> 50
<211> 12

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 50
Thr Leu Thr Asn Ser Glu Ile Ile Leu Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 51
Thr Leu Thr Lys Ser Gln Ile Leu His His Arg Pro
1 5 10
<210> 52
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 52
Thr Leu Thr Arg Ser Lys Ile Ile His Tyr Met Pro
1 5 10
<210> 53
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 53
Thr Leu Thr His Ser Asn Ile Ile Arg Tyr Val Pro
1 5 10
<210> 54
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 54
Thr Val Ser Ser Thr Lys Val Ile Val Tyr Leu Pro
1 5 10
<210> 55
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 55
Thr Ile Thr Lys Ser Thr Ile Ile Ile Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 56
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 56
Thr Val Thr Thr Thr Ser Val Ile Leu Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 57
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 57
Thr Leu Thr Lys Ser Gln Leu Ile His Tyr Met Pro
1 5 10
<210> 58
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 58
Thr Leu Thr Arg Ser Gln Val Ile His Tyr Met Pro
1 5 10

<210> 59
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 59
Thr Leu Thr Lys Ser Lys Ile Ile His Tyr Met Pro
1 5 10
<210> 60
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 60
Thr Val Ser Ser Thr Lys Val Ile His Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 61
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 61
Thr Leu Thr Lys Ser Lys Val Ile His Tyr Met Pro
1 5 10
<210> 62
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 62
Thr Val Thr Thr Thr Lys Val Ile His Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 63
Thr Ile Asp Arg Asp Gly Val Asn His Phe Ala Pro
1 5 10
<210> 64
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 64
Thr Val Thr His His Gly Val Ile Gly Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 65
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 65
Thr Leu Thr Gly Ala Asn Val Ile Ile Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 66
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 66
Thr Val Thr Asn Thr Gly Val Ile Ile Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 67
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 67

Thr Val Thr Ala Thr Gly Ile Ile Ile Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 68
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 68
Thr Val Thr Arg Ala Gly Phe Tyr Arg Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 69
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 69
Thr Val Thr Arg Glu Glu Val Ile Ser Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 70
Thr Val Thr Ala Ala Gly Val Ile Ile Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 71
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 71
Thr Val Thr Ala Asn Gln Pro Ile Ile Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 72
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 72
Thr Ile Thr Pro Glu Thr Ile Ile Val Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 73
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 73
Thr Ile Asp Arg Asp Gly Thr Arg Ser Phe Asp Pro
1 5 10
<210> 74
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 74
Thr Ile Phe Arg Asp Gly Pro Val Thr Trp Asp Pro
1 5 10
<210> 75
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 75
Thr Val Thr Asp Thr Gly Tyr Leu Lys Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 76
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Trình tự tổng hợp
<400> 76

Thr Leu Thr Gly Ser Asp Thr Ile Phe Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 77
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 77
Thr Val Thr Gly Lys Asp Val Ile Lys Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 78
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 78
Thr Ile Phe Arg Asp Gly Val Val Asn Tyr Gly Pro
1 5 10
<210> 79
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 79
Thr Val Thr Asp Thr Gly Phe Ile Thr Tyr Lys Pro
1 5 10
<210> 80
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 80
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His Ala Gly His Val
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Lys Ser Gln Met Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110
<210> 81
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 81
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Val Ser Pro Arg Gly Arg Ala Arg
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Tyr
65 70 75 80
Arg Asp Gly Met Ser His His Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105
<210> 82
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 82
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Glu Val Pro Arg Gly Leu Ala Arg
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Leu Gly Arg Gly Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Tyr
65 70 75 80
Arg Asp Gly Pro Leu Leu Leu Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105

<210> 83
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 83
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Trp Ala Pro Leu Gly Leu Ala Arg
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Phe
65 70 75 80
Arg Thr Gly Met Val Gln Tyr Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105

<210> 84
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 84
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Leu Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Asn Ser Glu Ile Ile Leu Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 85
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 85
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Leu Pro Tyr Pro Ala His Met
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Leu Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Lys Ser Gln Ile Leu His His Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His

100 105 110

<210> 86
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 86

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Phe Ala Gly His Leu
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Arg Ser Lys Ile Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 87
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 87

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Ser Gly Leu Ala
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr His Ser Asn Ile Ile Arg Tyr Val Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 88
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 88

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His Ala Gly His Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Ser Ser Thr Lys Val Ile Val Tyr Leu Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 89
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 89

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro Asn Phe Gly Leu Ile
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45

Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile
65 70 75 80
Thr Lys Ser Thr Ile Ile Ile Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 90
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 90

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr Thr Thr Ser Val Ile Leu Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 91
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 91

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Ala Gly His Leu
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Lys Ser Gln Leu Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 92
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 92

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Ala Ala His Met
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Arg Ser Gln Val Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 93
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 93

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His Ala Gly His Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Lys Ser Lys Ile Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 94
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 94

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Pro Gly His Leu
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Lys Ser Lys Ile Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 95
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp

<400> 95

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Arg Ser Lys Ile Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 96
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 96

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

Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 97
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 97
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His Ala Gly His Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Arg Ser Lys Ile Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 98
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 98
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Pro Gly His Leu
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Arg Ser Lys Ile Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 99
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 99
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Ser Ser Thr Lys Val Ile His Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 100
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 100
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Ala Gly His Ala
20 25 30

His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Arg Ser Lys Ile Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 101
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 101

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His Ala Gly His Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Lys Ser Lys Val Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 102
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 102

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Pro Gly His Leu
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Lys Ser Lys Val Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 103
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 103

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Ser Ser Thr Lys Val Ile Val Tyr Leu Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 104
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Trình tự tổng hợp
<400> 104
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Ala Gly His Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Lys Ser Lys Val Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110
<210> 105
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 105
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr Thr Thr Lys Val Ile His Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110
<210> 106
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 106
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Gly Gly Leu Ala Arg
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Ile Gly Arg Gly Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Asp
65 70 75 80
Arg Asp Gly Val Asn His Phe Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105
<210> 107
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 107
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Thr Pro Gly Leu Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr His His Gly Val Ile Gly Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 108
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 108

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His Arg Gly Val Ala
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Gly Ala Asn Val Ile Ile Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 109
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 109

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Ser Ser Gly Val Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr Asn Thr Gly Val Ile Ile Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 110
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 110

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His His Gly Phe Gly
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr Ala Thr Gly Ile Ile Ile Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 111
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 111

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

Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr Arg Ala Gly Phe Tyr Arg Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

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

<210> 113
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 113
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Arg Gln Gly Leu Ala
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr Ala Ala Gly Val Ile Ile Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 114
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 114
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Gly Pro Gly His Phe
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr Ala Asn Gln Pro Ile Ile Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 115
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 115
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15

```
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His Pro Gly Leu Gly
            20                  25                  30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
        35                  40                  45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
    50                  55                  60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile
65                  70                  75                  80
Thr Pro Glu Thr Ile Ile Val Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
                85                  90                  95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
            100                 105                 110
<210>  116
<211>  109
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  116
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1               5                   10                  15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Arg Gly Leu Ala Arg
            20                  25                  30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
        35                  40                  45
Glu Phe Thr Val Phe Gly Arg Gly Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
    50                  55                  60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Asp
65                  70                  75                  80
Arg Asp Gly Thr Arg Ser Phe Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
                85                  90                  95
Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
            100                 105
<210>  117
<211>  109
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  117
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1               5                   10                  15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Gly Leu Ala Arg
            20                  25                  30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
        35                  40                  45
Glu Phe Thr Val Val Gly Arg Gly Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
    50                  55                  60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Phe
65                  70                  75                  80
Arg Asp Gly Pro Val Thr Trp Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
                85                  90                  95
Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
            100                 105
<210>  118
<211>  110
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  118
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1               5                   10                  15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His Gln Gly Lys Ala
            20                  25                  30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
        35                  40                  45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
    50                  55                  60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65                  70                  75                  80
Thr Asp Thr Gly Tyr Leu Lys Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
                85                  90                  95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
            100                 105                 110
<210>  119
<211>  109
```

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 119
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Lys Gly Leu Ala Arg
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Val Gly Arg Gly Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Phe
65 70 75 80
Arg Asp Gly Pro Val Thr Trp Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105
<210> 120
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 120
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Asn Pro Gly Ile Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Gly Ser Asp Thr Ile Phe Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110
<210> 121
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 121
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Arg Pro Gly Asn Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr Gly Lys Asp Val Ile Lys Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110
<210> 122
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 122
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Gly Leu Ala Arg
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Val Gly Arg Gly Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Phe
65 70 75 80

Arg Asp Gly Val Val Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105

<210> 123
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 123

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Asn Pro Gly Asn Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr Asp Thr Gly Phe Ile Thr Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
100 105 110

<210> 124
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 124

atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gcatgctggt catgtgaact attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat ataccatca ctgtgtatgc tgtcactctg 240
actaaatctc agatgatcca ttacatgcca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330

<210> 125
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 125

atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct gggtttctcc gcgtggtcgt gctcgatatt accgcatcac ttacggcgaa 120
acaggaggca atagccctgt ccaggagttc actgtgcctg gtcgtggttc tacagctacc 180
atcagcggcc ttaaacctgg cgttgattat accatcactg tgtatgctgt cactatctac 240
cgtgacggta tgtctcatca tgacccaatt tccattaatt accgcacaga aattgacaaa 300
ccatcccagc accatcacca ccaccac 327

<210> 126
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 126

atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct gggaagtgcc gcgtggccta gctcgatatt accgcatcac ttacggcgaa 120
acaggaggca atagccctgt ccaggagttc actgtgcttg gtcgtggttc tacagctacc 180
atcagcggcc ttaaacctgg cgttgattat accatcactg tgtatgctgt cactgtgtac 240
cgtgacgggc cgttgcttct tgccccaatt tccattaatt accgcacaga aattgacaaa 300
ccatcccagc accatcacca ccaccac 327

<210> 127
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 127

atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtgggcccc gctgggtctt gctcgatatt accgcatcac ttacggcgaa 120
acaggaggca atagccctgt ccaggagttc actgtgcctg gtcggggctc tacagctacc 180
atcagcggcc ttaaacctgg cgttgattat accatcactg tgtatgctgt cactatcttc 240
cgtacgggca tggttcaata tgacccaatt tccattaatt accgcacaga aattgacaaa 300
ccatcccagc accatcacca ccaccac 327

<210> 128

<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 128
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggactctgcc gcatgctggt cttgcgcact attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat ataccatca ctgtgtatgc tgtcactctg 240
actaattctg agattatcct ttacaagcca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 129
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 129
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtacctccc gtatcctgcg catatgaact attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctgggcgggg tctgacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat ataccatca ctgtgtatgc tgtcactctg 240
acaaaatctc agattctcca tcataggcca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 130
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 130
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtcattgcc gtttgctggt catttgaact attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat ataccatca ctgtgtatgc tgtcactctg 240
actcgctcta agattattca ttatatgcca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 131
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 131
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc ttattctggc cttgcgaact attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg ggttacagct 180
actatcagcg gccttaaacc tggcgttgat ataccatca ctgtgtatgc tgtcactctg 240
actcactcta atataattcg atacgtgcca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 132
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 132
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtccctacc gcatgcgggt catgcgcact attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg agttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat ataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtg 240
tctagtacaa aggtgatagt ttacctgcca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 133
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 133
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggactttgcc gaatttcggt cttattaatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat ataccatca ctgtgtatgc tgtcactatc 240
accaaatcta ctatcatcat ttacaagcca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 134
<211> 330

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 134
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggactttgcc gcatgctggt cgtgcgcact attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctgggcgggg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtg 240
acgacaactt cggtgatcct ttacaagcca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 135
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 135
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctcttcc ttatgctggt catctaaact attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgtgacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactctg 240
actaagtctc agctgataca ttacatgcca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 136
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 136
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gtatgctgct cacatgaact attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactttg 240
actagatcac aggtgattca ttacatgcca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 137
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 137
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggtcactgcc gcatgcaggt catgcacatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccctg 240
accaaaagca aaattattca ttatatgccg attagcatta attatcgcac cgaaattgat 300
aaaccgagcc agcatcatca tcaccatcat 330
<210> 138
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 138
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggtcactgcc gtatccgggt catctgaatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccctg 240
accaaaagca aaattattca ttatatgccg attagcatta attatcgcac cgaaattgat 300
aaaccgagcc agcatcatca tcaccatcat 330
<210> 139
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 139
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggaccctgcc gcatgcaggt cgtgcacatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccctg 240
acccgcagca aaattattca ttatatgccg attagcatta attatcgcac cgaaattgat 300
aaaccgagcc agcatcatca tcaccatcat 330
<210> 140
<211> 330
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 140
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggtcactgcc gtatgcaggt catgcacatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccctg 240
accaaaagca aaattattca ttatatgccg attagcatta attatcgcac cgaaattgat 300
aaaccgagcc agcatcatca tcaccatcat 330
<210> 141
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 141
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggtcactgcc gcatgcaggt catgcacatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccctg 240
acccgcagca aaattattca ttatatgccg attagcatta attatcgcac cgaaattgat 300
aaaccgagcc agcatcatca tcaccatcat 330
<210> 142
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 142
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggtcactgcc gtatccgggt catctgaatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccctg 240
acccgcagca aaattattca ttatatgccg attagcatta attatcgcac cgaaattgat 300
aaaccgagcc agcatcatca tcaccatcat 330
<210> 143
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 143
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggaccctgcc gcatgcaggt cgtgcacatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccgtt 240
agcagcacca aagtgattca ttataaaccg attagcatta attatcgcac cgaaattgat 300
aaaccgagcc agcatcatca tcaccatcat 330
<210> 144
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 144
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggtcactgcc gtatgcaggt catgcacatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccctg 240
acccgcagca aaattattca ttatatgccg attagcatta attatcgcac cgaaattgat 300
aaaccgagcc agcatcatca tcaccatcat 330
<210> 145
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 145
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggtcactgcc gcatgcaggt catgcacatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccctg 240
accaaaagca aagtgattca ttatatgccg attagcatta attatcgcac cgaaattgat 300
aaaccgagcc agcatcatca tcaccatcat 330
<210> 146
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 146
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggtcactgcc gtatccgggt catctgaatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccctg 240
accaaaagca aagtgattca ttatatgccg attagcatta attatcgcac cgaaattgat 300
aaaccgagcc agcatcatca tcaccatcat 330
<210> 147
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 147
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggaccctgcc gcatgcaggt cgtgcacatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccgtt 240
agcagcacca aagttattgt ttatctgccg attagcatta attatcgcac cgaaattgat 300
aaaccgagcc agcatcatca tcaccatcat 330
<210> 148
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 148
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggtcactgcc gtatgcaggt catgcacatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccctg 240
accaaaagca aagtgattca ttatatgccg attagcatta attatcgcac cgaaattgat 300
aaaccgagcc agcatcatca tcaccatcat 330
<210> 149
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 149
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggaccctgcc gcatgcaggt cgtgcacatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccgtt 240
accaccacca aagtgattca ttataaaccg attagcatta attatcgcac cgaaattgat 300
aaaccgagcc agcatcatca tcaccatcat 330
<210> 150
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 150
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct gggacgctcc gggtggtctg gctcgatatt accgcatcac ttacggcgaa 120
acaggaggca atagccctgt ccaggagttc actgtgatcg gtcgtggtag cacagctacc 180
atcagcggcc ttaaacctgg cgttgattat accatcactg tgtatgctgt cactatcgac 240
cgtgacggtg tcaaccactt cgccccaatt tccattaatt accgcacaga aattgacaaa 300
ccatcccagc accatcacca ccaccac 327
<210> 151
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 151
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gactccaggt ctcgcccatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtc 240
actcatcacg gcgtcatcgg ctacaaacca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 152
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Trình tự tổng hợp
<400> 152
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gcaccgtggt gtcgccaatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat ataccatca ctgtgtatgc tgtcactctc 240
actggagcga acgtcatcat ctacaaacca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 153
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 153
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gagcagcggt gtcgcccatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat ataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtc 240
actaacactg gtgtcatcat ctacaaacca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 154
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 154
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gcatcacggt ttcggccatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat ataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtc 240
actgctacgg ggatcatcat ctacaaacca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 155
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 155
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gcacgccggt gacgcccatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat ataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtt 240
actagagcgg gtttctaccg ctacaaacca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 156
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 156
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gcataatggt gtcgcccatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat ataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtc 240
actcgggagg aagtcatcag ctacaaacca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 157
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 157
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gcgtcagggt ctcgccaatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat ataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtc 240
actgctgctg gggtcatcat ctacaaacca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 158
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp

<400> 158
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gggaccgggt cacttccatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtc 240
actgctaacc agcccatcat ctacaaacca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 159
<211> 330
<212> AND
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 159
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gcaccccggt ctcggccatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactatc 240
actccggaaa cgatcatcgt ctacaaacca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 160
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 160
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct gggacgctcc gagaggtctg gctcgatatt accgcatcac ttacggcgaa 120
acaggaggca atagccctgt ccaggagttc actgtgttcg gtcgtggtac cacagctacc 180
atcagcggcc ttaaacctgg cgttgattat accatcactg tgtatgctgt cactatcgac 240
cgtgacggta cccgcagctt cgacccaatt tccattaatt accgcacaga aattgacaaa 300
ccatcccagc accatcacca ccaccac 327
<210> 161
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 161
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct gggacgctcc ggctggtctg gctcgatatt accgcatcac ttacggcgaa 120
acaggaggca atagccctgt ccaggagttc actgtggtcg gtcgtggtaa cacagctacc 180
atcagcggcc ttaaacctgg cgttgattat accatcactg tgtatgctgt cactatcttc 240
cgtgacggtc ccgtcacctg ggacccaatt tccattaatt accgcacaga aattgacaaa 300
ccatcccagc accatcacca ccaccac 327
<210> 162
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 162
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gcaccaaggt aaagccaatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtt 240
actgatacag ggtacctcaa gtacaaacca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330
<210> 163
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 163
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct gggacgctcc gaagggtctg gctcgatatt accgcatcac ttacggcgaa 120
acaggaggca atagccctgt ccaggagttc actgtggtcg gtcgtggtaa cacagctacc 180
atcagcggcc ttaaacctgg cgttgattat accatcactg tgtatgctgt cactatcttc 240
cgtgacggtc ccgtcacctg ggacccaatt tccattaatt accgcacaga aattgacaaa 300
ccatcccagc accatcacca ccaccac 327
<210> 164
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 164

atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gaatcccggt atcgcccatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactctc 240
actggcagtg acaccatctt ctacaaacca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330

<210> 165
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 165

atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gcggccgggt aacgcccatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtt 240
actggcaaag atgtcatcaa gtacaaacca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330

<210> 166
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 166

atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct gggacgctcc ggctggtctg gctcgatatt accgcatcac ttacggcgaa 120
acaggaggca atagccctgt ccaggagttc actgtggtcg gtcgtggtaa cacagctacc 180
atcagcggcc ttaaacctgg cgttgattat accatcactg tgtatgctgt cactatcttc 240
cgtgacggtg tcgtcaacta cggcccaatt tccattaatt accgcacaga aattgacaaa 300
ccatcccagc accatcacca ccaccac 327

<210> 167
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 167

atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gaatccgggt aacgcccatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtt 240
actgacacag gtttcatcac gtacaaacca atttccatta attaccgcac agaaattgac 300
aaaccatccc agcaccatca ccaccaccac 330

<210> 168
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 168

Ile Asn Tyr Arg Thr
1 5

<210> 169
<211> 227
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 169

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>  170
<211>  16
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  170
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                   10                  15
<210>  171
<211>  24
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  171
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                   10                  15
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
            20
<210>  172
<211>  24
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  172
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                   10                  15
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser
            20
<210>  173
<211>  24
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  173
Glu Pro Lys Ser Ser Gly Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                   10                  15
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser
            20
<210>  174
<211>  19
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  174
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                   10                  15
Gly Pro Ser

<210>  175
<211>  19
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  175
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                   10                  15
Gly Ser Ser
```

<210> 176
<211> 330
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 176

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                  10                  15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225                 230                 235                 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 177
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 177

```
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                  10                  15
Gly Ser Thr Gly
            20
```

<210> 178
<211> 208
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 178

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

85 90 95

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

<210> 179
<211> 206
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 179

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

<210> 180
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 180

Gly Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

<210> 181
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 181

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 182
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 182

Glu Pro Lys Ser Ser Asp
1 5

<210> 183
<211> 21

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 183
Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala Gln Pro Gln
1 5 10 15
Ala Glu Gly Leu Ala
20
<210> 184
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 184
Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu
1 5 10 15
Asp
<210> 185
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 185
Gly Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser
1 5
<210> 186
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 186
Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10
<210> 187
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 187
Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Glu Gly Glu Leu
1 5 10 15
Glu
<210> 188
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 188
Gly Ser Gly Ser Gly
1 5
<210> 189
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 189
Gly Ser Gly Cys
1
<210> 190
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 190
Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5
<210> 191
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Trình tự tổng hợp
<400> 191
Gly Ser Gly Ser
1
<210> 192
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 192
Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser
1 5
<210> 193
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 193
Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5
<210> 194
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 194
Thr Val Ala Ala Pro Ser
1 5
<210> 195
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 195
Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5
<210> 196
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 196
Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10
<210> 197
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 197
Lys Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser
1 5
<210> 198
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 198
Lys Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu
1 5 10 15
Leu Asp
<210> 199
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 199
Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser
1 5
<210> 200
<211> 9

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 200
Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5
<210> 201
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 201
Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10
<210> 202
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 202
Lys Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser Gly
1 5 10
<210> 203
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 203
Lys Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu
1 5 10 15
Leu Asp Gly

<210> 204
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 204
Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser Gly
1 5
<210> 205
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 205
Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5
<210> 206
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 206
Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5
<210> 207
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 207
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10
<210> 208
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 208

Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser Gly
1 5
<210> 209
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 209
Thr Val Ala Ala Pro Ser Gly
1 5
<210> 210
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 210
Pro Ser Thr Ser Thr Ser Thr
1 5
<210> 211
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 211
Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln
1 5
<210> 212
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 212
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5
<210> 213
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 213
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10
<210> 214
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 214
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10
<210> 215
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 215
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10
<210> 216
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 216
Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10
<210> 217
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Trình tự tổng hợp
<400> 217
Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
<210> 218
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 218
Gly Ser Glu Gly Ser Glu Gly Ser Glu Gly Ser Glu Gly Ser Glu
1 5 10 15
<210> 219
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 219
Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Glu
1 5
<210> 220
<211> 35
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 220
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser
35
<210> 221
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 221
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25
<210> 222
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 222
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
<210> 223
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 223
Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly
1 5
<210> 224
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 224
Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly
1 5 10
<210> 225
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp

<400> 225
Pro Ala Pro Ala Pro Ala
1 5
<210> 226
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 226
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala
1 5 10
<210> 227
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 227
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala
1 5 10 15
Pro Ala
<210> 228
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 228
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Val Ser Pro Arg Gly Arg Ala Arg
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Tyr
65 70 75 80
Arg Asp Gly Met Ser His His Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
Gly Ser Gly Cys His His His His His His
100 105
<210> 229
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 229
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His Ala Gly His Val
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Lys Ser Gln Met Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Gly Ser Gly Cys His His His His His His
100 105
<210> 230
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 230
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60

Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr Thr Thr Ser Val Ile Leu Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Gly Ser Gly Cys His His His His His His
100 105

<210> 231
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 231
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Leu Pro Tyr Pro Ala His Met
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Leu Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Lys Ser Gln Ile Leu His His Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Gly Ser Gly Cys His His His His His His
100 105

<210> 232
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 232
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Ala Gly His Leu
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu
65 70 75 80
Thr Lys Ser Gln Leu Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Gly Ser Gly Cys His His His His His His
100 105

<210> 233
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 233
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr Thr Thr Lys Val Ile His Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Gly Ser Gly Cys His His His His His His
100 105

<210> 234
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 234
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr

1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr Thr Thr Lys Val Ile His Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Gly Ser Gly Cys His His His His His His
100 105

<210> 235
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 235
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Arg Gly Leu Ala Arg
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Phe Gly Arg Gly Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Asp
65 70 75 80
Arg Asp Gly Thr Arg Ser Phe Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
Glu Gly Ser Gly Cys His His His His His His
100 105

<210> 236
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 236
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Gly Leu Ala Arg
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Val Gly Arg Gly Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Phe
65 70 75 80
Arg Asp Gly Pro Val Thr Trp Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
Glu Gly Ser Gly Cys His His His His His His
100 105

<210> 237
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 237
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Lys Gly Leu Ala Arg
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Val Gly Arg Gly Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Phe
65 70 75 80
Arg Asp Gly Pro Val Thr Trp Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
Glu Gly Ser Gly Cys His His His His His His
100 105

<210> 238
<211> 108
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 238
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Asn Pro Gly Asn Ala
20 25 30
His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr Asp Thr Gly Phe Ile Thr Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Gly Ser Gly Cys His His His His His His
100 105
<210> 239
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 239
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His Gln Gly Lys Ala
20 25 30
Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly
50 55 60
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val
65 70 75 80
Thr Asp Thr Gly Tyr Leu Lys Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
85 90 95
Thr Glu Gly Ser Gly Cys His His His His His His
100 105
<210> 240
<211> 318
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 240
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct gggtttctcc gcgtggtcgt gctcgatatt accgcatcac ttacggcgaa 120
acaggaggca atagccctgt ccaggagttc actgtgcctg gtcgtggttc tacagctacc 180
atcagcggcc ttaaacctgg cgttgattat accatcactg tgtatgctgt cactatctac 240
cgtgacggta tgtctcatca tgacccaatt tccattaatt accgcacagg tagcggttgc 300
caccatcacc accatcac 318
<210> 241
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 241
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gcatgctggt catgtgaact attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactctg 240
actaaatctc agatgatcca ttacatgcca atttccatta attaccgcac aggtagcggt 300
tgccaccatc accaccatca c 321
<210> 242
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 242
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggactttgcc gcatgctggt cgtgcgcact attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctgggcgggg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtg 240
acgacaactt cggtgatcct ttacaagcca atttccatta attaccgcac agaaggtagc 300
ggttgccacc atcaccacca tcac 324
<210> 243

<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 243
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtacctccc gtatcctgcg catatgaact attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctgggcgggg tctgacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactctg 240
acaaaatctc agattctcca tcataggcca atttccatta attaccgcac agaaggtagc 300
ggttgccacc atcaccacca tcac 324
<210> 244
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 244
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctcttcc ttatgctggt catctaaact attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgtgacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactctg 240
actaagtctc agctgataca ttacatgcca atttccatta attaccgcac agaaggtagc 300
ggttgccacc atcaccacca tcac 324
<210> 245
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 245
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggaccctgcc gcatgcaggt cgtgcacatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccgtt 240
accaccacca aagtgattca ttataaaccg atttccatta attaccgcac agaaggtagc 300
ggttgccacc atcaccacca tcac 324
<210> 246
<211> 306
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 246
atgggtgtta gtgatgttcc gcgtgatctg gaagttgttg cagcaacccc gaccagcctg 60
ctgattagct ggaccctgcc gcatgcaggt cgtgcacatt attatcgtat tacctatggt 120
gaaaccggtg gtaatagtcc ggttcaggaa ttcaccgttc cgggtcgtgg tgttaccgca 180
accattagcg gtctgaaacc gggtgttgat tacaccatta ccgtttatgc agttaccgtt 240
accaccacca aagtgattca ttataaaccg atttccatta attaccgaac agaaggtagc 300
ggttgc 306
<210> 247
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 247
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct gggacgctcc gagaggtctg gctcgatatt accgcatcac ttacggcgaa 120
acaggaggca atagccctgt ccaggagttc actgtgttcg gtcgtggtac cacagctacc 180
atcagcggcc ttaaacctgg cgttgattat accatcactg tgtatgctgt cactatcgac 240
cgtgacggta cccgcagctt cgacccaatt tccattaatt accgcacaga aggtagcggt 300
tgccaccatc accaccatca c 321
<210> 248
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 248
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct gggacgctcc ggctggtctg gctcgatatt accgcatcac ttacggcgaa 120
acaggaggca atagccctgt ccaggagttc actgtggtcg gtcgtggtaa cacagctacc 180
atcagcggcc ttaaacctgg cgttgattat accatcactg tgtatgctgt cactatcttc 240
cgtgacggtc ccgtcacctg ggacccaatt tccattaatt accgcacaga aggtagcggt 300
tgccaccatc accaccatca c 321
<210> 249
<211> 321

<212> AND
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 249
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct gggacgctcc gaagggtctg gctcgatatt accgcatcac ttacggcgaa 120
acaggaggca atagccctgt ccaggagttc actgtggtcg gtcgtggtaa cacagctacc 180
atcagcggcc ttaaacctgg cgttgattat accatcactg tgtatgctgt cactatcttc 240
cgtgacggtc ccgtcacctg ggacccaatt tccattaatt accgcacaga aggtagcggt 300
tgccaccatc accaccatca c 321
<210> 250
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 250
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gaatccgggt aacgcccatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtt 240
actgacacag gtttcatcac gtacaaacca atttccatta attaccgcac agaaggtagc 300
ggttgccacc atcaccacca tcac 324
<210> 251
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 251
atgggagttt ctgatgtgcc gcgcgacctg gaagtggttg ctgccacccc caccagcctg 60
ctgatcagct ggtctctgcc gcaccaaggt aaagccaatt attaccgcat cacttacggc 120
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgc ctggtcgtgg tgttacagct 180
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactgtt 240
actgatacag ggtacctcaa gtacaaacca atttccatta attaccgcac agaaggtagc 300
ggttgccacc atcaccacca tcac 324
<210> 252
<211> 336
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 252
Glu Pro Lys Ser Ser Gly Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Val
225 230 235 240
Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser
245 250 255
Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Ala Gly His Leu Asn Tyr Tyr
260 265 270
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

```
        275                 280                 285
Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
    290                 295                 300

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Thr Lys Ser
305                 310                 315                 320
Gln Leu Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile
                325                 330                 335
<210>  253
<211>  330
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  253
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1               5                   10                  15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala His
            20                  25                  30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
        35                  40                  45
Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
    50                  55                  60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Thr
65                  70                  75                  80
Thr Thr Lys Val Ile His Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
                85                  90                  95
Glu Ile Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225                 230                 235                 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
<210>  254
<211>  325
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  254
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1               5                   10                  15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala His
            20                  25                  30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
        35                  40                  45
Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
    50                  55                  60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Thr
65                  70                  75                  80
Thr Thr Lys Val Ile His Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
                85                  90                  95
Glu Ile Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
            100                 105                 110
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
```

```
        115                 120                 125
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
    130                 135                 140
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
145                 150                 155                 160
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
                165                 170                 175
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
            180                 185                 190
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
        195                 200                 205
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
    210                 215                 220
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
225                 230                 235                 240
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
                245                 250                 255
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
            260                 265                 270
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
        275                 280                 285
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
    290                 295                 300
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
305                 310                 315                 320
Leu Ser Pro Gly Lys
                325
<210>  255
<211>  345
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  255
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1               5                   10                  15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala His
            20                  25                  30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
        35                  40                  45
Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
    50                  55                  60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Thr
65                  70                  75                  80
Thr Thr Lys Val Ile His Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
                85                  90                  95
Glu Ile Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala Gln
            100                 105                 110
Pro Gln Ala Glu Gly Leu Ala Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
        115                 120                 125
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
    130                 135                 140
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
145                 150                 155                 160
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
                165                 170                 175
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
            180                 185                 190
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
        195                 200                 205
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
    210                 215                 220
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
225                 230                 235                 240
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
                245                 250                 255
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
            260                 265                 270
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
        275                 280                 285
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
    290                 295                 300
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
305                 310                 315                 320
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
                325                 330                 335
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345
<210>  256
```

<211> 331
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 256

```
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 Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Val Ser Asp Val Pro Arg
225                 230                 235                 240
Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp
                245                 250                 255
Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly
            260                 265                 270
Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg
        275                 280                 285
Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr
    290                 295                 300
Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Thr Thr Thr Lys Val Ile His Tyr
305                 310                 315                 320
Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile
                325                 330
```

<210> 257
<211> 340
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 257

```
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 Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu
225 230 235 240
Leu Asp Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
245 250 255
Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg
260 265 270
Ala His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro
275 280 285
Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser
290 295 300
Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr
305 310 315 320
Val Thr Thr Thr Lys Val Ile His Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
325 330 335
Arg Thr Glu Ile
340

<210> 258
<211> 332
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 258

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 Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser Gly Val Ser Asp Val Pro
225 230 235 240
Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser
245 250 255
Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr
260 265 270
Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly
275 280 285
Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr
290 295 300
Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Thr Thr Thr Lys Val Ile His
305 310 315 320
Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile
325 330

<210> 259
<211> 336
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 259

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 Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Val
225                 230                 235                 240
Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser
                245                 250                 255
Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala His Tyr Tyr
            260                 265                 270
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
        275                 280                 285
Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
    290                 295                 300
Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Thr Thr Thr
305                 310                 315                 320
Lys Val Ile His Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile
                325                 330                 335
<210>  260
<211>  339
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  260
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 Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu
225                 230                 235                 240
Leu Asp Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
                245                 250                 255
Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Arg Gly Leu Ala
```

260 265 270
Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
275 280 285
Gln Glu Phe Thr Val Phe Gly Arg Gly Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly
290 295 300
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile
305 310 315 320
Asp Arg Asp Gly Thr Arg Ser Phe Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
325 330 335
Thr Glu Ile
<210> 261
<211> 339
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 261
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 Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu
225 230 235 240
Leu Asp Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
245 250 255
Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Gly Leu Ala
260 265 270
Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
275 280 285
Gln Glu Phe Thr Val Val Gly Arg Gly Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly
290 295 300
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile
305 310 315 320
Phe Arg Asp Gly Pro Val Thr Trp Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
325 330 335
Thr Glu Ile
<210> 262
<211> 339
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 262
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 Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu
225                 230                 235                 240
Leu Asp Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
                245                 250                 255
Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Lys Gly Leu Ala
            260                 265                 270
Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
        275                 280                 285
Gln Glu Phe Thr Val Val Gly Arg Gly Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly
    290                 295                 300
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile
305                 310                 315                 320
Phe Arg Asp Gly Pro Val Thr Trp Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
                325                 330                 335
Thr Glu Ile
<210>  263
<211>  340
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  263
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 Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu
225                 230                 235                 240
Leu Asp Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
                245                 250                 255
Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Asn Pro Gly Asn
            260                 265                 270
Ala His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro
        275                 280                 285
Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser
    290                 295                 300
Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr
305                 310                 315                 320
```

Val Thr Asp Thr Gly Phe Ile Thr Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
325 330 335
Arg Thr Glu Ile
340
<210> 264
<211> 340
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 264
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 Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu
225 230 235 240
Leu Asp Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
245 250 255
Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His Gln Gly Lys
260 265 270
Ala Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro
275 280 285
Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser
290 295 300
Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr
305 310 315 320
Val Thr Asp Thr Gly Tyr Leu Lys Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
325 330 335
Arg Thr Glu Ile
340
<210> 265
<211> 329
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 265
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Arg Gly Leu Ala Arg Tyr
20 25 30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
35 40 45
Phe Thr Val Phe Gly Arg Gly Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
50 55 60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Asp Arg
65 70 75 80
Asp Gly Thr Arg Ser Phe Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
85 90 95
Ile Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
100 105 110
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
115 120 125
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

```
    130                 135                 140
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145                 150                 155                 160
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
                165                 170                 175
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
            180                 185                 190
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
        195                 200                 205
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
    210                 215                 220
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225                 230                 235                 240
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
                245                 250                 255
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
            260                 265                 270
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
        275                 280                 285
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
    290                 295                 300
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305                 310                 315                 320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325
<210>  266
<211>  329
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  266
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1                   5                   10                  15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Gly Leu Ala Arg Tyr
            20                  25                  30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
        35                  40                  45
Phe Thr Val Val Gly Arg Gly Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
    50                  55                  60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Phe Arg
65                  70                  75                  80
Asp Gly Pro Val Thr Trp Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
                85                  90                  95
Ile Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            100                 105                 110
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        115                 120                 125
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
    130                 135                 140
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145                 150                 155                 160
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
                165                 170                 175
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
            180                 185                 190
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
        195                 200                 205
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
    210                 215                 220
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225                 230                 235                 240
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
                245                 250                 255
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
            260                 265                 270
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
        275                 280                 285
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
    290                 295                 300
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305                 310                 315                 320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325
<210>  267
<211>  329
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
```

<223> Trình tự tổng hợp
<400> 267
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Lys Gly Leu Ala Arg Tyr
20 25 30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
35 40 45
Phe Thr Val Val Gly Arg Gly Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
50 55 60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Phe Arg
65 70 75 80
Asp Gly Pro Val Thr Trp Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
85 90 95
Ile Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
100 105 110
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
115 120 125
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225 230 235 240
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 268
<211> 330
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 268
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Asn Pro Gly Asn Ala His
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Thr
65 70 75 80
Asp Thr Gly Phe Ile Thr Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
Glu Ile Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 269
<211> 330
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 269
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His Gln Gly Lys Ala Asn
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Thr
65 70 75 80
Asp Thr Gly Tyr Leu Lys Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
Glu Ile Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 270
<211> 340
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 270
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 Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Glu Gly Glu
225 230 235 240
Leu Glu Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
245 250 255
Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg
260 265 270
Ala His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro
275 280 285
Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser
290 295 300
Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr
305 310 315 320
Val Thr Thr Thr Lys Val Ile His Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
325 330 335
Arg Thr Glu Ile
340

<210> 271
<211> 339
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 271

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 Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Glu Gly Glu
225 230 235 240
Leu Glu Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
245 250 255
Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Gly Leu Ala

260 265 270
Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
275 280 285
Gln Glu Phe Thr Val Val Gly Arg Gly Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly
290 295 300
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile
305 310 315 320
Phe Arg Asp Gly Pro Val Thr Trp Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
325 330 335
Thr Glu Ile
<210> 272
<211> 339
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 272
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 Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Glu Gly Glu
225 230 235 240
Leu Glu Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
245 250 255
Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Lys Gly Leu Ala
260 265 270
Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
275 280 285
Gln Glu Phe Thr Val Val Gly Arg Gly Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly
290 295 300
Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile
305 310 315 320
Phe Arg Asp Gly Pro Val Thr Trp Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
325 330 335
Thr Glu Ile
<210> 273
<211> 340
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 273
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 Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Glu Gly Glu
225 230 235 240
Leu Glu Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
245 250 255
Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His Gln Gly Lys
260 265 270
Ala Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro
275 280 285
Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser
290 295 300
Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr
305 310 315 320
Val Thr Asp Thr Gly Tyr Leu Lys Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
325 330 335
Arg Thr Glu Ile
340

<210> 274
<211> 230
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 274

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

<210> 275
<211> 98
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 275

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Leu Pro His Ala Gly Arg Ala His
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Thr
65 70 75 80
Thr Thr Lys Val Ile His Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
Glu Ile
<210> 276
<211> 225
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 276
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
225
<210> 277
<211> 97
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 277
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Arg Gly Leu Ala Arg Tyr
20 25 30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
35 40 45
Phe Thr Val Phe Gly Arg Gly Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
50 55 60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Asp Arg
65 70 75 80
Asp Gly Thr Arg Ser Phe Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
85 90 95
Ile
<210> 278
<211> 97
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 278
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Gly Leu Ala Arg Tyr

```
            20                  25                  30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
        35                  40                  45
Phe Thr Val Val Gly Arg Gly Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
    50                  55                  60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Phe Arg
65                  70                  75                  80
Asp Gly Pro Val Thr Trp Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
                85                  90                  95
Ile
<210>  279
<211>  97
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp

<400>  279

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1               5                   10                  15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Lys Gly Leu Ala Arg Tyr
            20                  25                  30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
        35                  40                  45
Phe Thr Val Val Gly Arg Gly Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
    50                  55                  60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Phe Arg
65                  70                  75                  80
Asp Gly Pro Val Thr Trp Asp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
                85                  90                  95
Ile
<210>  280
<211>  98
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  280
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1               5                   10                  15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Asn Pro Gly Asn Ala His
            20                  25                  30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
        35                  40                  45
Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
    50                  55                  60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Thr
65                  70                  75                  80
Asp Thr Gly Phe Ile Thr Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
                85                  90                  95
Glu Ile
<210>  281
<211>  98
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400>  281
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1               5                   10                  15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro His Gln Gly Lys Ala Asn
            20                  25                  30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
        35                  40                  45
Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
    50                  55                  60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Thr
65                  70                  75                  80
Asp Thr Gly Tyr Leu Lys Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
                85                  90                  95
Glu Ile
<210>  282
<211>  98
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
```

<400> 282
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Pro Tyr Ala Gly His Leu Asn
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45
Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Thr
65 70 75 80
Lys Ser Gln Leu Ile His Tyr Met Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95
Glu Ile
<210> 283
<211> 226
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 283
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
1 5 10 15
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
20 25 30
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
35 40 45
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
50 55 60
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
65 70 75 80
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
85 90 95
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
100 105 110
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
115 120 125
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
130 135 140
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
145 150 155 160
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
165 170 175
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
180 185 190
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
195 200 205
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
210 215 220
Gly Lys
225
<210> 284
<211> 1008
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 284
gagcccaaat ctagcgggtc gactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 60
gggggaagct cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 120
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 300
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 360
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 420
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 540
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 600
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccc ggcgccggag gcggcggatc cggtggagtt 720
tctgatgtgc cgcgcgacct ggaagtggtt gctgccaccc ccaccagcct gctgatcagc 780
tggtctcttc cttatgctgg tcatctaaac tattaccgca tcacttacgg cgaaacagga 840
ggcaatagcc ctgtccagga gttcactgtg cctggtcgtg gtgtgacagc taccatcagc 900
ggccttaaac ctggcgttga ttataccatc actgtgtatg ctgtcactct gactaagtct 960
cagctgatac attacatgcc aatttccatt aattaccgga ccgaaatc 1008
<210> 285
<211> 990
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 285
ggcgtgagcg acgtgccccg ggatctagaa gtggtggctg ctacccccac aagcttgctg 60
atctcctgga cactgcctca cgctggccgg gctcattact atagaattac ctacggggag 120
acaggcggga actctcccgt gcaggaattc accgtgcctg gaaggggcgt gactgccacc 180
atcagtgggc tgaagccagg agtggactac acaattaccg tgtacgctgt gactgtgacc 240
acaactaaag tgatccacta caaacccatc tctattaatt atcggaccga aattgagcct 300
aagagctccg acaaaaccca cacatgccca ccttgtccag cccccgaact gctgggcggc 360
ccttcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ttggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tcccgggaaa 990
<210> 286
<211> 975
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 286
ggcgtgagcg acgtgccccg ggatctagaa gtggtggctg ctacccccac aagcttgctg 60
atctcctgga cactgcctca cgctggccgg gctcattact atagaattac ctacggggag 120
acaggcggga actctcccgt gcaggaattc accgtgcctg gaaggggcgt gactgccacc 180
atcagtgggc tgaagccagg agtggactac acaattaccg tgtacgctgt gactgtgacc 240
acaactaaag tgatccacta caaacccatc tctattaatt atcggaccga aattgacaag 300
acccacacat gcccaccttg tccagccccc gagctgctgg gcggcccttc agtcttcctc 360
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 420
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 480
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 540
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 600
gtctccaaca aagccctccc agccccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 660
ccccgagaac cacaggtgta cacccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 720
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 780
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgttgga ctccgacggc 840
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 900
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 960
ctgtctcccg ggaaa 975
<210> 287
<211> 1035
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 287
ggcgtgagcg acgtgccccg ggatctagaa gtggtggctg ctacccccac aagcttgctg 60
atctcctgga cactgcctca cgctggccgg gctcattact atagaattac ctacggggag 120
acaggcggga actctcccgt gcaggaattc accgtgcctg gaaggggcgt gactgccacc 180
atcagtgggc tgaagccagg agtggactac acaattaccg tgtacgctgt gactgtgacc 240
acaactaaag tgatccacta caaacccatc tctattaatt atcggaccga aattgagtct 300
ccaaaggctc aggccagctc cgtgcctacc gctcagccac aggctgaggg cctggctaag 360
acccacacat gccccccttg tccagctccc gaactgctgg gcgggccttc agtcttcctc 420
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 480
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 540
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 600
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 660
gtctccaaca aagccctccc agccccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 720
ccccgagaac cacaggtgta cacccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 780
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 840
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 900
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 960
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1020
ctgtctcccg ggaaa 1035
<210> 288
<211> 993
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 288
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc 540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctcccggcgc cggaggcggc ggatccggtg gcgtgtccga cgtgccccgg 720
gatctagaag tggtggctgc tacccccaca agcttgctga tctcctggac actgcctcac 780
gctggccggg ctcattacta tagaattacc tacggggaga caggcgggaa ctctcccgtg 840
caggaattca ccgtgcctgg aaggggcgtg actgccacca tcagtgggct gaagccagga 900
gtggactaca caattaccgt gtacgctgtg actgtgacca caactaaagt gatccactac 960
aaacccatct ctattaatta tcggaccgaa atc 993

<210> 289
<211> 1020
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 289
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctcccgagct gcagctggag gaaagcgccg ctgaggctca ggacggagaa 720
ctggatggcg tgagcgacgt gccacgggat ctagaagtgg tggctgctac ccccacaagc 780
ttgctgatct cctggacact gcctcacgct ggccgggctc attactatag aattacctac 840
ggggagacag gcgggaactc tcccgtgcag gaattcaccg tgcctggaag gggcgtgact 900
gccaccatca gtgggctgaa gccaggagtg gactacacaa ttaccgtgta cgctgtgact 960
gtgaccacaa ctaaagtgat ccactacaaa cccatctcta ttaattatcg gaccgaaatt 1020

<210> 290
<211> 996
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 290
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctcccggcca gcccgacgag cctggcggga gcggcgtgag cgacgtgcca 720
cgggatctag aagtggtggc tgctaccccc acaagcttgc tgatctcctg gacactgcct 780
cacgctggcc gggctcatta ctatagaatt acctacgggg agacaggcgg gaactctccc 840
gtgcaggaat tcaccgtgcc tggaaggggc gtgactgcca ccatcagtgg gctgaagcca 900
ggagtggact acacaattac cgtgtacgct gtgactgtga ccacaactaa agtgatccac 960
tacaaaccca tctctattaa ttatcggacc gaaatt 996

<210> 291
<211> 1008
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 291
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctcccggcgg cagcgggtct ggatctggca gtgggagcgg ctctggcgtg 720
agcgacgtgc cacgggatct agaagtggtg gctgctaccc ccacaagctt gctgatctcc 780
tggacactgc ctcacgctgg ccgggctcat tactatagaa ttacctacgg ggagacaggc 840
gggaactctc ccgtgcagga attcaccgtg cctggaaggg gcgtgactgc caccatcagt 900
gggctgaagc caggagtgga ctacacaatt accgtgtacg ctgtgactgt gaccacaact 960
aaagtgatcc actacaaacc catctctatt aattatcgga ccgaaatt 1008

<210> 292
<211> 917
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 292

cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca 60
agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg 120
agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc 180
tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga 240
aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat 300
cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc 360
ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca 420
cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca 480
agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca 540
accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctcccgagct gcagctggag gaaagcgccg 600
ctgaggctca ggacggagaa ctggatggcg tgagcgacgt gccacgggat ctagaagtgg 660
tggctgctac ccccacaagc ttgctgatca gctgggacgc tccgagaggt ctggctcgat 720
attaccgcat cacttacggc gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgt 780
tcggtcgtgg taccacagct accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca 840
ctgtgtatgc tgtcactatc gaccgtgacg gtacccgcag cttcgaccca atttccatta 900
attaccggac cgaaatt 917

<210> 293
<211> 1017
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 293

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctcccgagct gcagctggag gaaagcgccg ctgaggctca ggacggagaa 720
ctggatggcg tgagcgacgt gccacgggat ctagaagtgg tggctgctac ccccacaagc 780
ttgctgatca gctgggacgc tccggctggt ctggctcgat attaccgcat cacttacggc 840
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgg tcggtcgtgg taacacagct 900
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactatc 960
ttccgtgacg gtcccgtcac ctgggaccca atttccatta attaccggac cgaaatt 1017

<210> 294
<211> 1017
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 294

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctcccgagct gcagctggag gaaagcgccg ctgaggctca ggacggagaa 720
ctggatggcg tgagcgacgt gccacgggat ctagaagtgg tggctgctac ccccacaagc 780
ttgctgatca gctgggacgc tccgaagggt ctggctcgat attaccgcat cacttacggc 840
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgg tcggtcgtgg taacacagct 900
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactatc 960
ttccgtgacg gtcccgtcac ctgggaccca atttccatta attaccggac cgaaatt 1017

<210> 295

<211> 1020
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 295
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctcccgagct gcagctggag gaaagcgccg ctgaggctca ggacggagaa 720
ctggatggcg tgagcgacgt gccacgggat ctagaagtgg tggctgctac ccccacaagc 780
ttgctgatca gctggtctct gccgaatccg ggtaacgccc attattaccg catcacttac 840
ggcgaaacag gaggcaatag ccctgtccag gagttcactg tgcctggtcg tggtgttaca 900
gctaccatca gcggccttaa acctggcgtt gattatacca tcactgtgta tgctgtcact 960
gttactgaca caggtttcat cacgtacaaa ccaatttcca ttaattaccg gaccgaaatt 1020

<210> 296
<211> 1020
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 296
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctcccgagct gcagctggag gaaagcgccg ctgaggctca ggacggagaa 720
ctggatggcg tgagcgacgt gccacgggat ctagaagtgg tggctgctac ccccacaagc 780
ttgctgatca gctggtctct gccgcaccaa ggtaaagcca attattaccg catcacttac 840
ggcgaaacag gaggcaatag ccctgtccag gagttcactg tgcctggtcg tggtgttaca 900
gctaccatca gcggccttaa acctggcgtt gattatacca tcactgtgta tgctgtcact 960
gttactgata cagggtacct caagtacaaa ccaatttcca ttaattaccg gaccgaaatt 1020
<210> 297
<211> 987
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 297
ggcgtgagcg acgtgccccg ggatctagaa gtggtggctg ctacccccac aagcttgctg 60
atcagctggg acgctccgag aggtctggct cgatattacc gcatcactta cggcgaaaca 120
ggaggcaata gccctgtcca ggagttcact gtgttcggtc gtggtaccac agctaccatc 180
agcggcctta aacctggcgt tgattatacc atcactgtgt atgctgtcac tatcgaccgt 240
gacggtaccc gcagcttcga cccaatttcc attaattacc ggaccgaaat tgagcctaag 300
agctccgaca aaacccacac atgcccacct tgtccagccc ccgaactgct gggcggccct 360
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 420
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 480
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 540
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 600
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 660
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 720
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 780
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgttg 840
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 900
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 960
aagagcctct ccctgtctcc cgggaaa 987

<210> 298
<211> 987
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp

<400> 298
ggcgtgagcg acgtgccccg ggatctagaa gtggtggctg ctacccccac aagcttgctg 60
atcagctggg acgctccggc tggtctggct cgatattacc gcatcactta cggcgaaaca 120
ggaggcaata gccctgtcca ggagttcact gtggtcggtc gtggtaacac agctaccatc 180
agcggcctta aacctggcgt tgattatacc atcactgtgt atgctgtcac tatcttccgt 240
gacggtcccg tcacctggga cccaatttcc attaattacc ggaccgaaat tgagcctaag 300
agctccgaca aaacccacac atgcccacct tgtccagccc ccgaactgct gggcggccct 360
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 420
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 480
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 540
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 600
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 660
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 720
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 780
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgttg 840
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 900
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 960
aagagcctct ccctgtctcc cgggaaa 987
<210> 299
<211> 987
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 299
ggcgtgagcg acgtgccccg ggatctagaa gtggtggctg ctacccccac aagcttgctg 60
atcagctggg acgctccgaa gggtctggct cgatattacc gcatcactta cggcgaaaca 120
ggaggcaata gccctgtcca ggagttcact gtggtcggtc gtggtaacac agctaccatc 180
agcggcctta aacctggcgt tgattatacc atcactgtgt atgctgtcac tatcttccgt 240
gacggtcccg tcacctggga cccaatttcc attaattacc ggaccgaaat tgagcctaag 300
agctccgaca aaacccacac atgcccacct tgtccagccc ccgaactgct gggcggccct 360
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 420
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 480
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 540
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 600
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 660
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 720
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 780
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgttg 840
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 900
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 960
aagagcctct ccctgtctcc cgggaaa 987
<210> 300
<211> 990
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 300
ggcgtgagcg acgtgccccg ggatctagaa gtggtggctg ctacccccac aagcttgctg 60
atcagctggt ctctgccgaa tccgggtaac gcccattatt accgcatcac ttacggcgaa 120
acaggaggca atagccctgt ccaggagttc actgtgcctg gtcgtggtgt tacagctacc 180
atcagcggcc ttaaacctgg cgttgattat accatcactg tgtatgctgt cactgttact 240
gacacaggtt tcatcacgta caaaccaatt tccattaatt accggaccga aattgagcct 300
aagagctccg acaaaaccca cacatgccca ccttgtccag cccccgaact gctgggcggc 360
ccttcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ttggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tcccgggaaa 990
<210> 301
<211> 990
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 301
ggcgtgagcg acgtgccccg ggatctagaa gtggtggctg ctacccccac aagcttgctg 60
atcagctggt ctctgccgca ccaaggtaaa gccaattatt accgcatcac ttacggcgaa 120
acaggaggca atagccctgt ccaggagttc actgtgcctg gtcgtggtgt tacagctacc 180
atcagcggcc ttaaacctgg cgttgattat accatcactg tgtatgctgt cactgttact 240
gatacagggt acctcaagta caaaccaatt tccattaatt accggaccga aattgagcct 300
aagagctccg acaaaaccca cacatgccca ccttgtccag cccccgaact gctgggcggc 360

ccttcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ttggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tcccgggaaa 990
<210> 302
<211> 1020
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 302
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctcccgagct gcagctggag gaaagcgccg ctgaggctca ggaaggagaa 720
ctggaaggcg tgagcgacgt gccacgggat ctagaagtgg tggctgctac ccccacaagc 780
ttgctgatct cctggacact gcctcacgct ggccgggctc attactatag aattacctac 840
ggggagacag gcgggaactc tcccgtgcag gaattcaccg tgcctggaag gggcgtgact 900
gccaccatca gtgggctgaa gccaggagtg gactacacaa ttaccgtgta cgctgtgact 960
gtgaccacaa ctaaagtgat ccactacaaa cccatctcta ttaattatcg gaccgaaatt 1020
<210> 303
<211> 1017
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 303
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctcccgagct gcagctggag gaaagcgccg ctgaggctca ggaaggagaa 720
ctggaaggcg tgagcgacgt gccacgggat ctagaagtgg tggctgctac ccccacaagc 780
ttgctgatca gctgggacgc tccggctggt ctggctcgat attaccgcat cacttacggc 840
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgg tcggtcgtgg taacacagct 900
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactatc 960
ttccgtgacg gtcccgtcac ctgggaccca atttccatta attaccggac cgaaatt 1017
<210> 304
<211> 1017
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 304
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctcccgagct gcagctggag gaaagcgccg ctgaggctca ggaaggagaa 720
ctggaaggcg tgagcgacgt gccacgggat ctagaagtgg tggctgctac ccccacaagc 780

ttgctgatca gctgggacgc tccgaagggt ctggctcgat attaccgcat cacttacggc 840
gaaacaggag gcaatagccc tgtccaggag ttcactgtgg tcggtcgtgg taacacagct 900
accatcagcg gccttaaacc tggcgttgat tataccatca ctgtgtatgc tgtcactatc 960
ttccgtgacg gtcccgtcac ctgggaccca atttccatta attaccggac cgaaatt 1017
<210> 305
<211> 1020
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 305
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctcccgagct gcagctggag gaaagcgccg ctgaggctca ggaaggagaa 720
ctggaaggcg tgagcgacgt gccacgggat ctagaagtgg tggctgctac ccccacaagc 780
ttgctgatca gctggtctct gccgcaccaa ggtaaagcca attattaccg catcacttac 840
ggcgaaacag gaggcaatag ccctgtccag gagttcactg tgcctggtcg tggtgttaca 900
gctaccatca gcggccttaa acctggcgtt gattatacca tcactgtgta tgctgtcact 960
gttactgata cagggtacct caagtacaaa ccaatttcca ttaattaccg gaccgaaatt 1020
<210> 306
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 306
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu
1 5 10
<210> 307
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 307
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu
1 5
<210> 308
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 308
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu
1 5
<210> 309
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 309
Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu
1 5
<210> 310
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 310
Asp Val Pro Arg Asp Leu
1 5
<210> 311
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp

<400> 311
Val Pro Arg Asp Leu
1 5
<210> 312
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 312
Pro Arg Asp Leu
1
<210> 313
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 313
Glu Ile Glu Pro Lys Ser Ser
1 5
<210> 314
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 314
Glu Ile Asp Lys Pro Cys
1 5
<210> 315
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 315
Glu Ile Asp Lys Pro
1 5
<210> 316
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 316
Glu Ile Asp Lys
1
<210> 317
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp

<400> 317

Glu Ile Asp Lys Pro Ser
1 5
<210> 318
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 318
Glu Ile Glu Lys Pro Ser Gln
1 5
<210> 319
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 319
Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Leu Glu
1 5
<210> 320

<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 320
Glu Ile Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp
1 5 10
<210> 321
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 321
Glu Gly Ser Gly Ser
1 5
<210> 322
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 322
Glu Ile Asp Lys Pro Cys Gln
1 5
<210> 323
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 323
Glu Gly Ser Gly Cys
1 5
<210> 324
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 324
Glu Ile Asp Lys Pro Cys Gln Leu Glu
1 5
<210> 325
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 325
Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln His His His His His His
1 5 10
<210> 326
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 326
Gly Ser Gly Cys His His His His His His
1 5 10
<210> 327
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 327
Glu Gly Ser Gly Cys His His His His His His
1 5 10
<210> 328
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 328
His His His His His His

1 5
<210> 329
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 329
Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala
1 5 10 15
Met
<210> 330
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 330
Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro
1 5 10
<210> 331
<211> 87
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 331
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu
1 5 10 15
Pro His Gln Gly Lys Ala Asn Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr
20 25 30
Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Arg Gly Val
35 40 45
Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr
50 55 60
Val Tyr Ala Val Thr Val Thr Asp Thr Gly Tyr Leu Lys Tyr Lys Pro
65 70 75 80
Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit chứa miền fibronectin typ III thứ mười (^{10}Fn3-fibronectin type III tenth domain), trong đó (i) polypeptit này gắn kết với myostatin với hằng số K_D nhỏ hơn 500nM; và (ii) trình tự axit amin của vòng BC, vòng DE, và vòng FG của miền ^{10}Fn3 này tương ứng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.75, và một vòng trong số các vòng BC, vòng DE, và vòng FG của miền ^{10}Fn3 này tùy ý có một gốc axit amin thay thế so với vòng BC, vòng DE, và vòng FG tương ứng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.75.

2. Polypeptit theo điểm 1, trong đó

(i) serin ở vị trí số 3 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, T, V, W, và Y;

(ii) leucin ở vị trí số 4 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm M và V;

(iii) prolin ở vị trí số 5 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, và Y;

(iv) histidin ở vị trí số 6 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y;

(v) glutamin ở vị trí số 7 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, và Y;

(vi) glycin ở vị trí số 8 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin S;

(vii) lysin ở vị trí số 9 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y;

(viii) alanin ở vị trí số 10 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm C, G, L, M, S, và T; hoặc

(ix) asparagin ở vị trí số 11 của vòng BC (SEQ ID NO.34) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, H, P, Q, R, S, và Y.

3. Polypeptit theo điểm 1, trong đó valin ở vị trí số 5 của vòng DE (SEQ ID NO.39) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, và T.

4. Polypeptit theo điểm 1, trong đó:

(i) valin ở vị trí số 2 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, I, L, M, Q, T, W, và Y;

(ii) threonin ở vị trí số 3 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, và Y;

(iii) axit aspartic ở vị trí số 4 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y;

(iv) threonin ở vị trí số 5 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, và Y;

(v) glycin ở vị trí số 6 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y;

(vi) tyrosin ở vị trí số 7 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, và W;

(vii) leucin ở vị trí số 8 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, E, F, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W, và Y;

(viii) lysin ở vị trí số 9 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, và Y;

(ix) tyrosin ở vị trí số 10 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm F hoặc W; hoặc

(x) tyrosin ở vị trí số 11 của vòng FG (SEQ ID NO.75) được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, hoặc W.

5. Polypeptit theo điểm 1, trong đó vòng BC, vòng DE, và vòng FG tương ứng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.75.

6. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% so với vùng vòng không BC, vùng vòng không DE, và vùng vòng không FG của trình tự SEQ ID NO.331, SEQ ID NO.273, SEQ ID NO.281, hoặc SEQ ID NO.118.

7. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc

trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO.331, SEQ ID NO.273, SEQ ID NO.281, hoặc SEQ ID NO.118.

8. Polypeptit theo điểm 7, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.331

9. Polypeptit theo điểm 7, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.273.

10. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polypeptit này gắn kết với vùng nằm trong các axit amin 56-66 của trình tự SEQ ID NO.3.

11. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polypeptit này gắn kết với vùng nằm trong các axit amin 85-101 và 56-66 của trình tự SEQ ID NO.3.

12. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polypeptit này không cạnh tranh để gắn kết với myostatin với ActRIIB và/hoặc polypeptit này cạnh tranh để gắn kết với myostatin với ALK4 và/hoặc ALK5.

13. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polypeptit này còn chứa một hoặc nhiều gốc dược động học được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, axit sialic, vùng Fc, mảnh Fc, transferrin, albumin huyết thanh, protein gắn kết albumin huyết thanh, và protein gắn kết globulin miễn dịch huyết thanh.

14. Dược phẩm chứa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, và chất mang.

15. Axit nucleic phân lập mã hóa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13.

16. Tế bào chứa axit nucleic theo điểm 15.

17. Phương pháp phát hiện hoặc đo myostatin trong mẫu, bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc với polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, và phát hiện hoặc đo gắn kết của polypeptit này với myostatin.

```
1979_B06 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPHAGHVNYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSQMIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 80)
2062_G02 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVSPRGRAR-YYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGSTATISGLKPGVDYTITVYAVTIYRDGMSHHDPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 81)
2522_C09 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWEVPRGLAR-YYRITYGETGGNSPVQEFTVLGRGSTATISGLKPGVDYTITVYAVTVYRDGPLLLAPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 82)
2523_G06 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWWAPLGLAR-YYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGSTATISGLKPGVDYTITVYAVTIFRTGMVQYDPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 83)
2524_C11 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTLPHAGLAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTNSEIILYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 84)
2524_D09 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWYLPYPAHMNYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGLTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSQILHHRPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 85)
2524_E10 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPFAGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTRSKIIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 86)
2524_H05 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPYSGLANYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTHSNIIRYVPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 87)
2524_H11 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPHAGHAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVSSTKVIVYLPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 88)
2525_B01 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTLPNFGLINYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTITKSTIIIYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 89)
2525_D02 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTLPHAGRAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTTTSVILYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 90)
2525_D05 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPYAGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSQLIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 91)
2525_F07 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPYAAHMNYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTRSQVIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 92)
2987_A06 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPHAGHAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSKIIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 93)
2987_B04 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPYPGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSKIIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 94)
2987_B09 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTLPHAGRAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTRSKIIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 95)
2987_C02 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPYAGHAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSKIIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 96)
2987_D05 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPHAGHAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTRSKIIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 97)
2987_E03 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPYPGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTRSKIIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 98)
2987_E08 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTLPHAGRAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVSSTKVIHYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 99)
2987_F01 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPYAGHAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTRSKIIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 100)
2987_F06 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPHAGHAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSKVIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 101)
2987_G04 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPYPGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSKVIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 102)
2987_G09 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTLPHAGRAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVSSTKVIVYLPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 103)
2987_H02 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPYAGHAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSKVIHYMPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 104)
2987_H07 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTLPHAGRAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTTTKVIHYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 105)
3006_A10 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPGGLAR-YYRITYGETGGNSPVQEFTVIGRGSTATISGLKPGVDYTITVYAVTIDRDGVNHFAPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 106)
3007_B08 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPTPGLAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTHHGVIGYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 107)
3007_C09 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPHRGVANYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTGANVIIYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 108)
3007_C10 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPSSGYAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTNTGVIIYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 109)
3008_A03 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPHHGFGHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTATGIIIYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 110)
3008_B08 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPHAGDAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTRAGFYRYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 111)
3008_D04 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPHNGVAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTREEVISYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 112)
3008_F01 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPRQGLANYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTAAGVIIYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 113)
3008_G01 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPGPGHFHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTANQPIIYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 114)
3008_G03 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPHPGLGHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTITETIIVYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 115)
3115_D04 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPRGLAR-YYRITYGETGGNSPVQEFTVFGRGTTATISGLKPGVDYTITVYAVTIDRDGTRSFDPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 116)
3115_E06 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAGLAR-YYRITYGETGGNSPVQEFTVVGRGNTATISGLKPGVDYTITVYAVTIFRDGPVTWDPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 117)
3116_A06 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPHQGKANYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTDTGYLKYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 118)
3116_A07 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPKGLAR-YYRITYGETGGNSPVQEFTVVGRGNTATISGLKPGVDYTITVYAVTIFRDGPVTWDPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 119)
3116_C01 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPNPGIAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTGSDTIFYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 120)
3116_C06 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPRPGNAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTGKDVIKYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 121)
3116_H06 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAGLAR-YYRITYGETGGNSPVQEFTVVGRGNTATISGLKPGVDYTITVYAVTIFRDGVVNYGPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 122)
3146_A08 MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPNPGNAHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTDTGFITYKPISINYRTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 123)
```

Fig.1

Fig.2

Fig.3

Fig.4

Fig.5

Fig.6

Fig.7

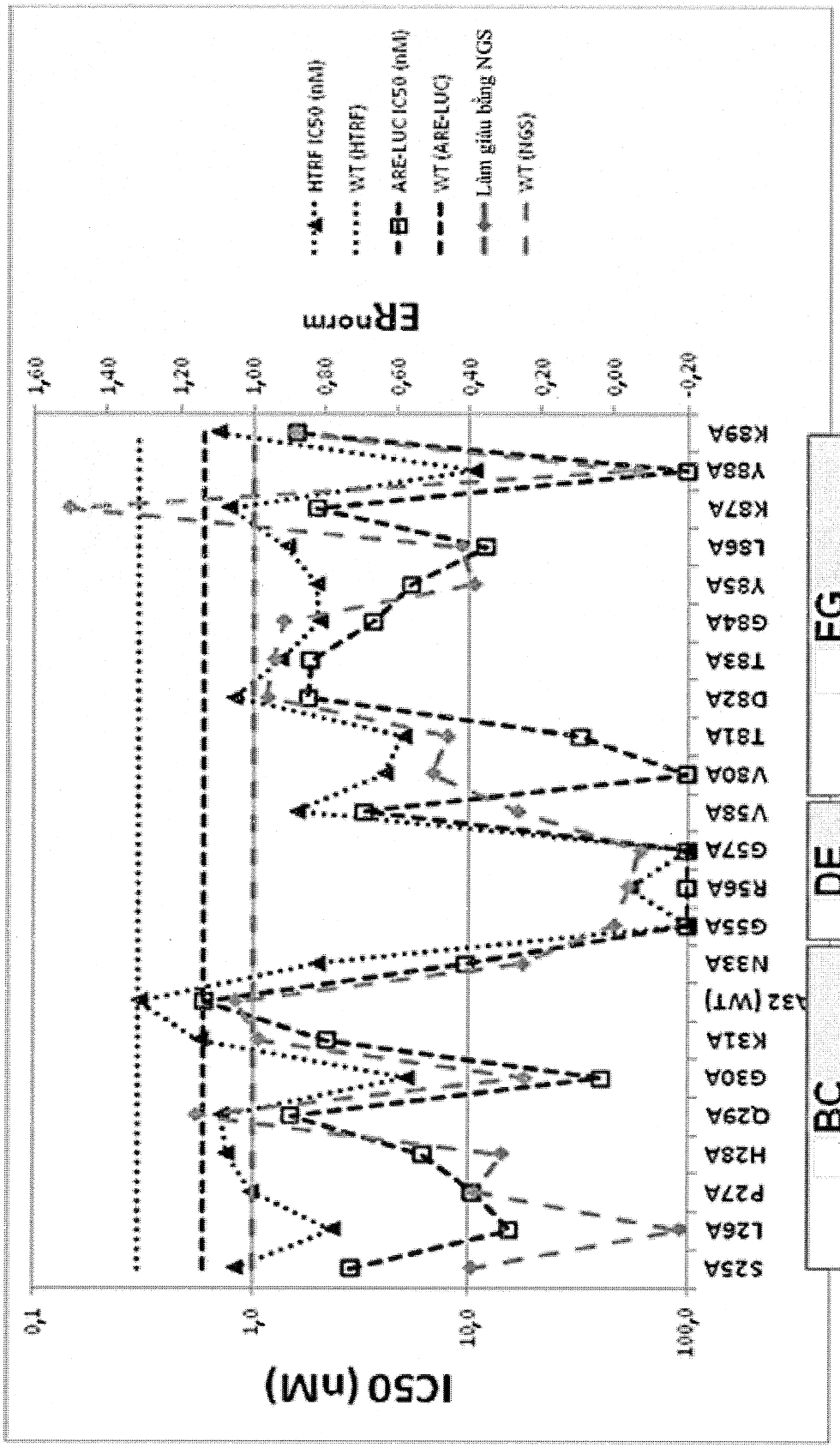

HTRF IC50 (nM)
WT (HTRF)
ARE-LUC IC50 (nM)
WT (ARE-LUC)
Làm giàu bằng NGS
WT (NGS)
ERnorm
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
-0,20
K39A
Y38A
K37A
L36A
Y35A
G34A
T33A
D32A
T31A
V30A
V58A
G57A
R56A
G55A
N33A
(WT)
K31A
G30A
Q29A
H28A
P27A
L26A
S25A
BC
DE
FG
IC50 (nM)
0,1
1,0
10,0
100,0

Fig.8

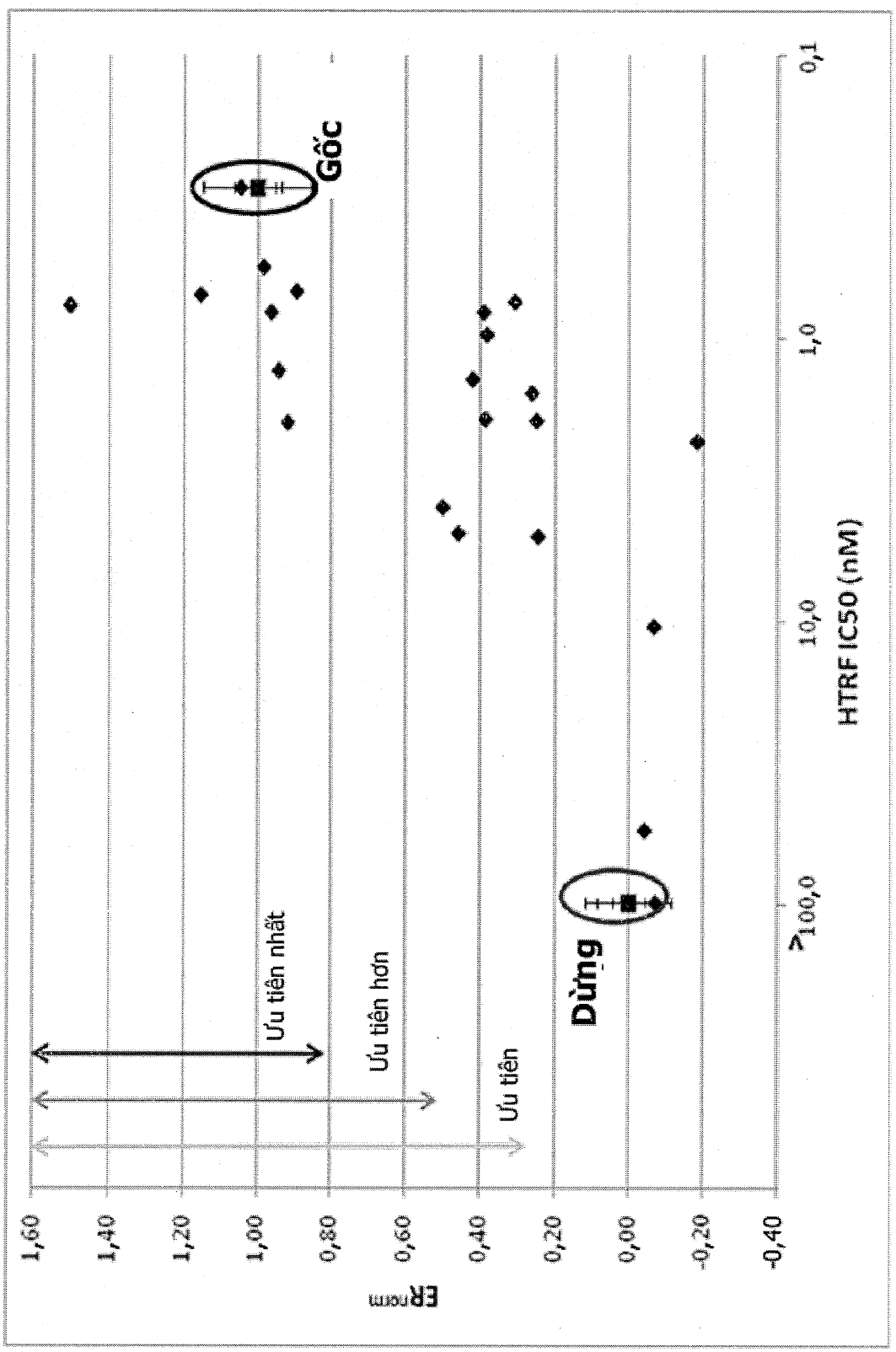

ERnorm
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
-0,20
-0,40
Gốc
Ưu tiên nhất
Ưu tiên hơn
Ưu tiên
Dừng
>100,0
10,0
1,0
0,1
HTRF IC50 (nM)

Fig.9

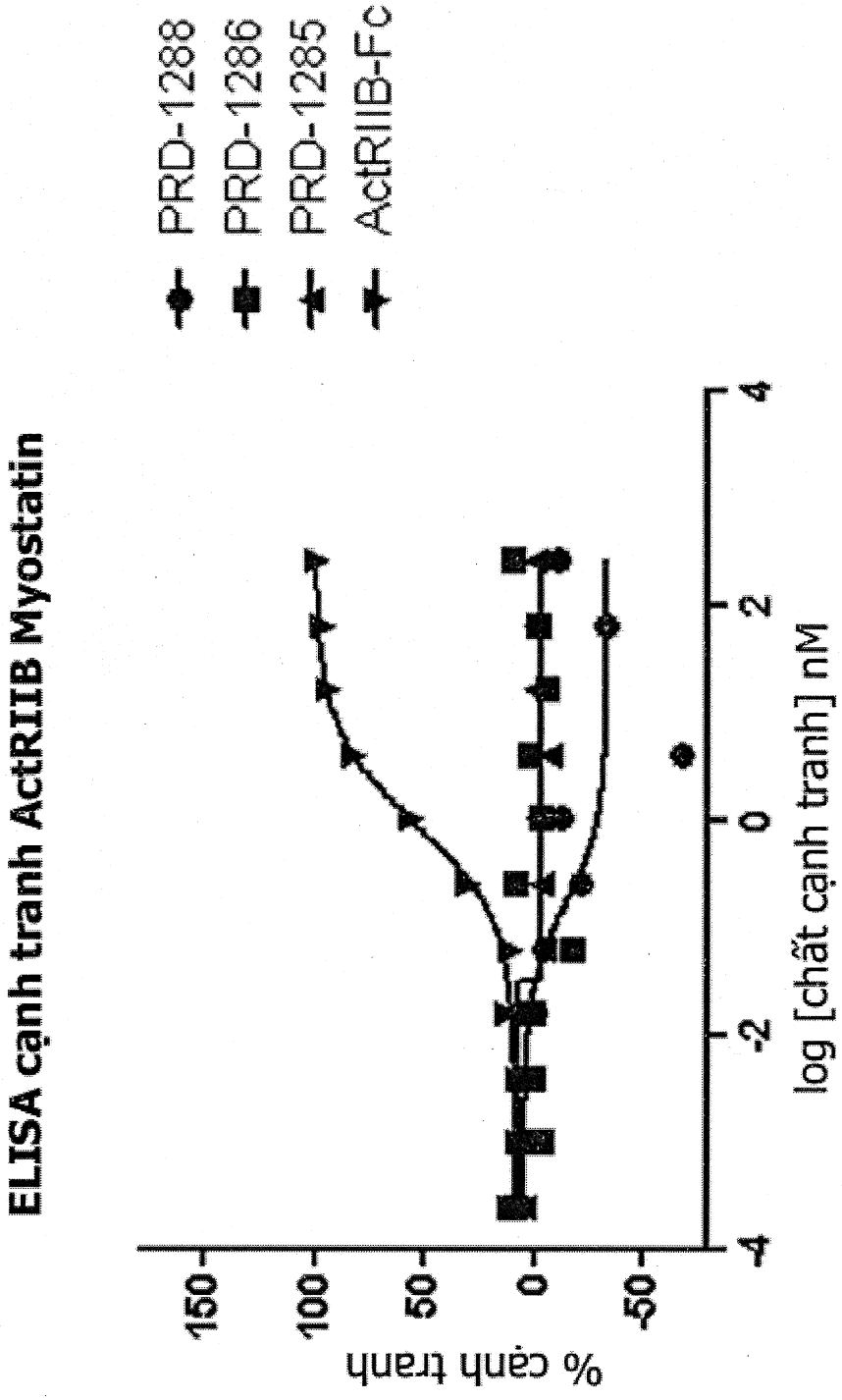

ELISA cạnh tranh ActRIIB Myostatin
PRD-1288
PRD-1286
PRD-1285
ActRIIB-Fc
% cạnh tranh
150
100
50
0
-50
-4
-2
0
2
4
log [chất cạnh tranh] nM

Fig. 10

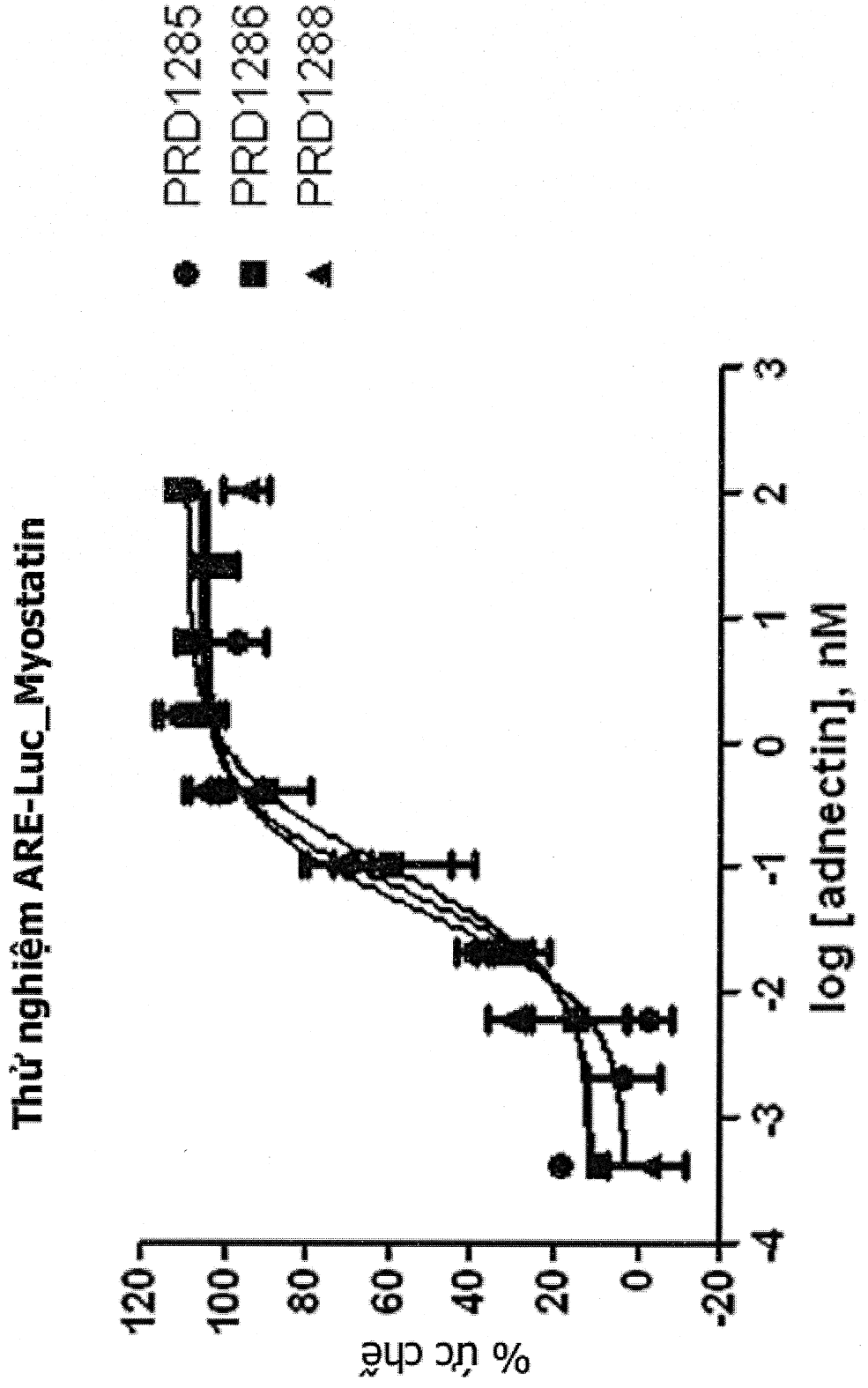
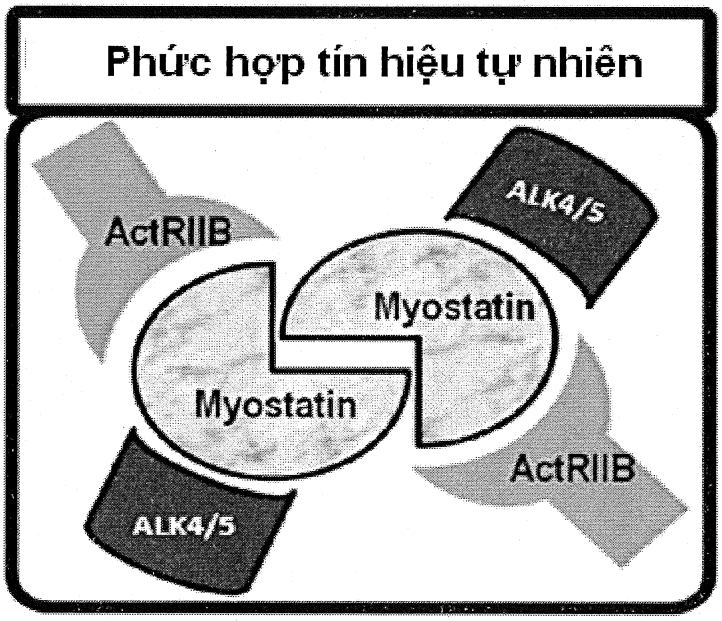

Thử nghiệm ARE-Luc_Myostatin
PRD1285
PRD1286
PRD1288
% ức chế
120
100
80
60
40
20
0
-20
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
log [adnectin], nM

Fig. 11

A.


Phức hợp tín hiệu tự nhiên
ActRIIB
ALK4/5
Myostatin
Myostatin
ActRIIB
ALK4/5

B.

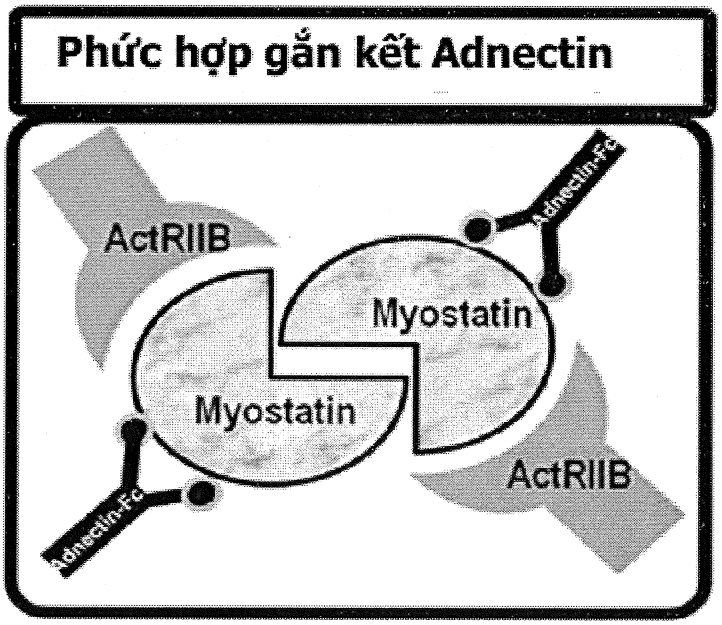

Phức hợp gắn kết Adnectin
ActRIIB
Adnectin-Fc
Myostatin
Myostatin
ActRIIB
Adnectin-Fc

Fig.12

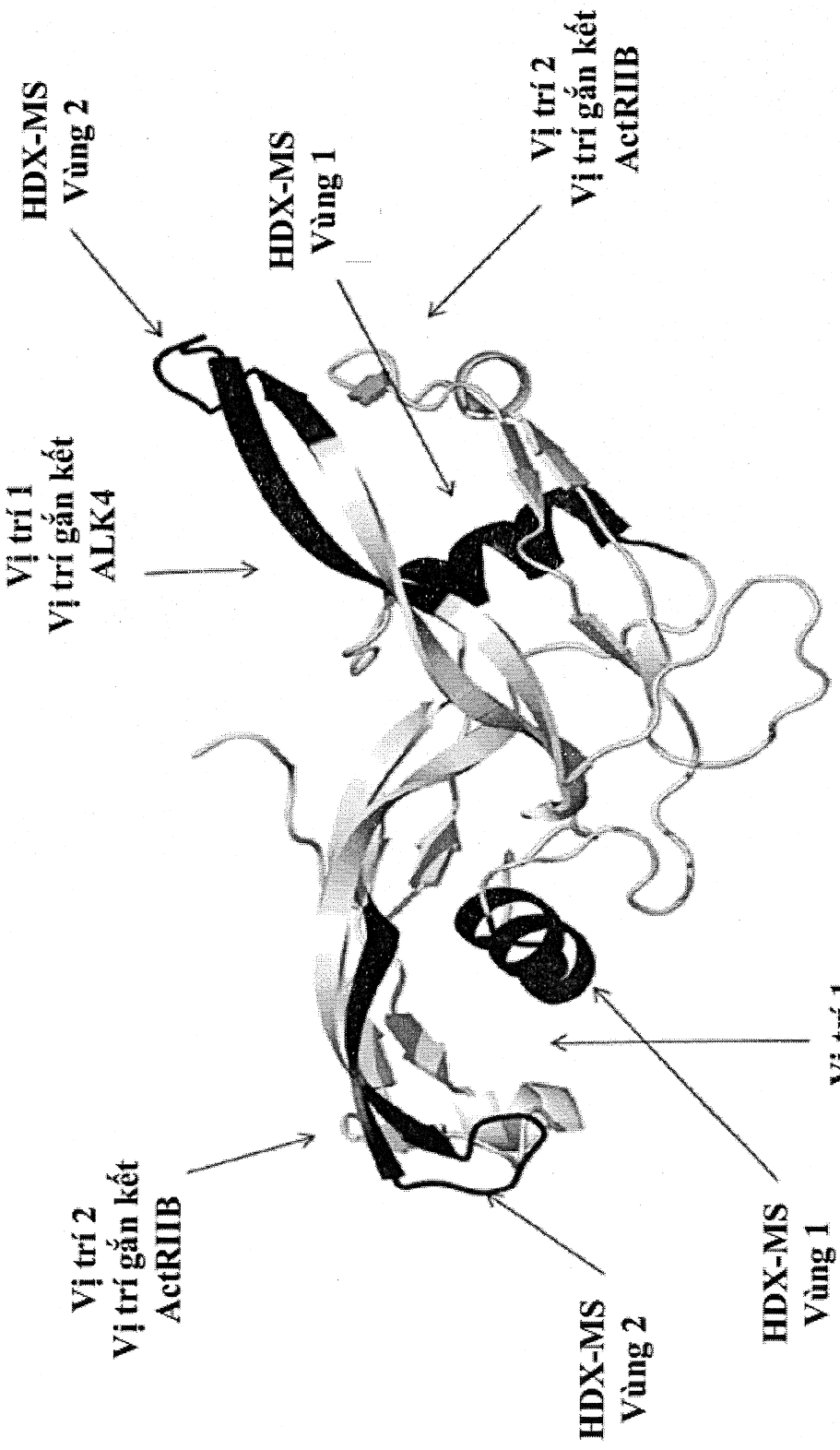

HDX-MS
Vùng 2
HDX-MS
Vùng 1
Vị trí 2
Vị trí gắn kết
ActRIIB
Vị trí 1
Vị trí gắn kết
ALK4
Vị trí 2
Vị trí gắn kết
ActRIIB
Vị trí 1
Vị trí gắn kết
ALK4
HDX-MS
Vùng 2
HDX-MS
Vùng 1

Fig.13A

Fig. 13B

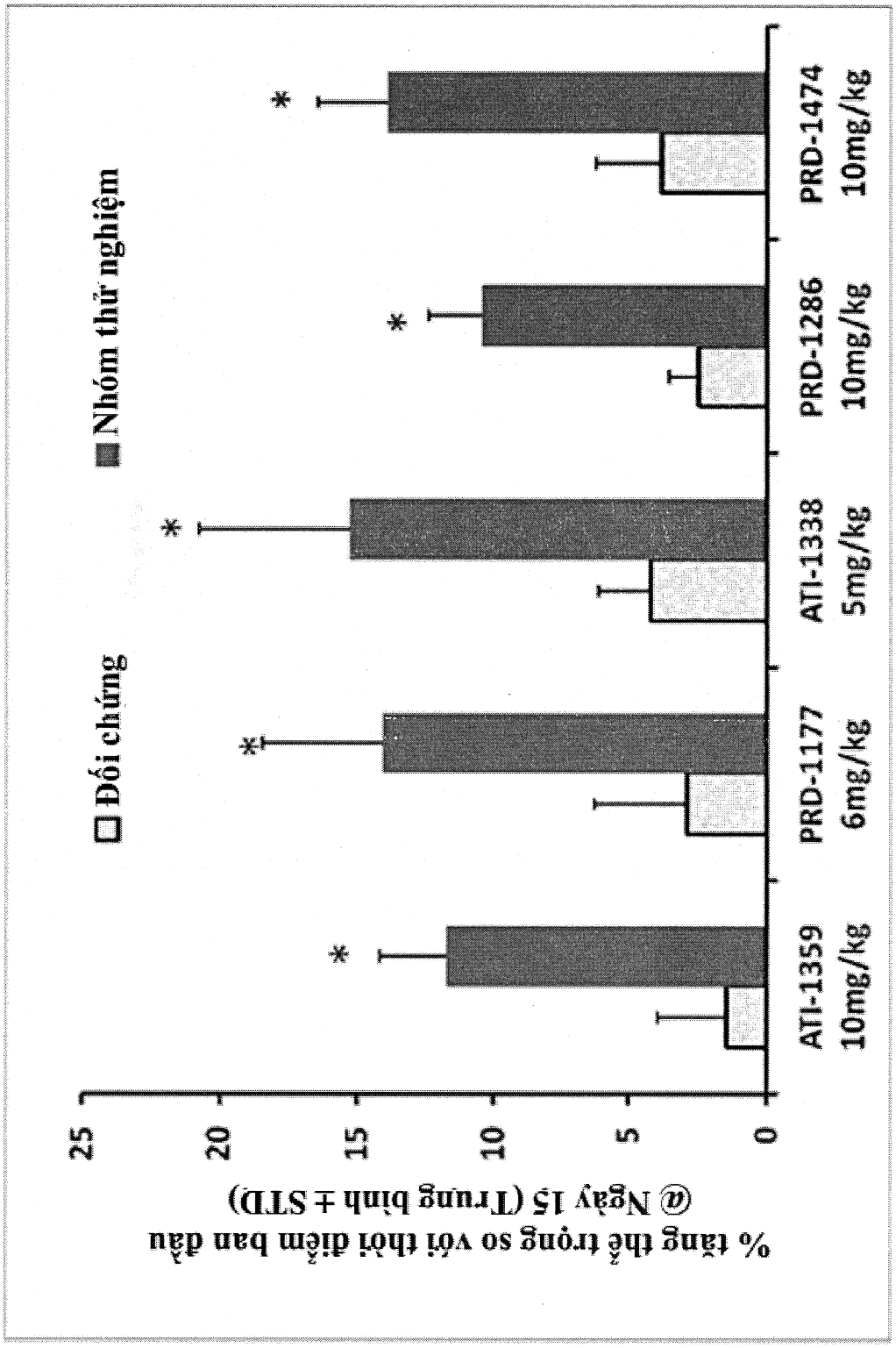

% tăng thể trọng so với thời điểm ban đầu
@ Ngày 15 (Trung bình ± STD)
25
20
15
10
5
0
Đối chứng
Nhóm thử nghiệm
ATI-1359 10mg/kg
PRD-1177 6mg/kg
ATI-1338 5mg/kg
PRD-1286 10mg/kg
PRD-1474 10mg/kg
*

Fig.14

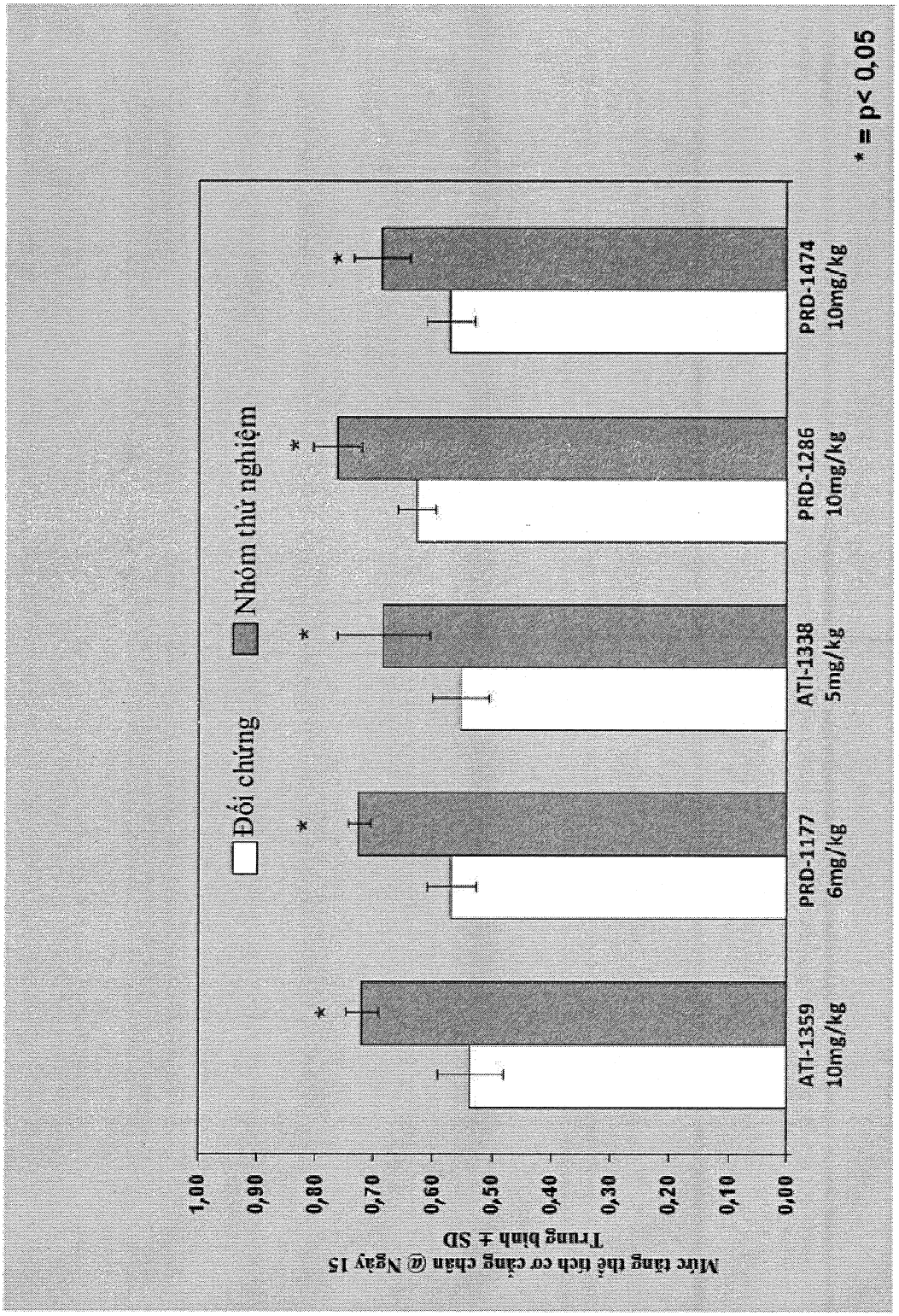

Mức tăng thể tích cơ căng chân @ Ngày 15
Trung bình ± SD
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
Đối chứng
Nhóm thử nghiệm
ATI-1359 10mg/kg
PRD-1177 6mg/kg
ATI-1338 5mg/kg
PRD-1286 10mg/kg
PRD-1474 10mg/kg
* = p< 0,05

Fig.15

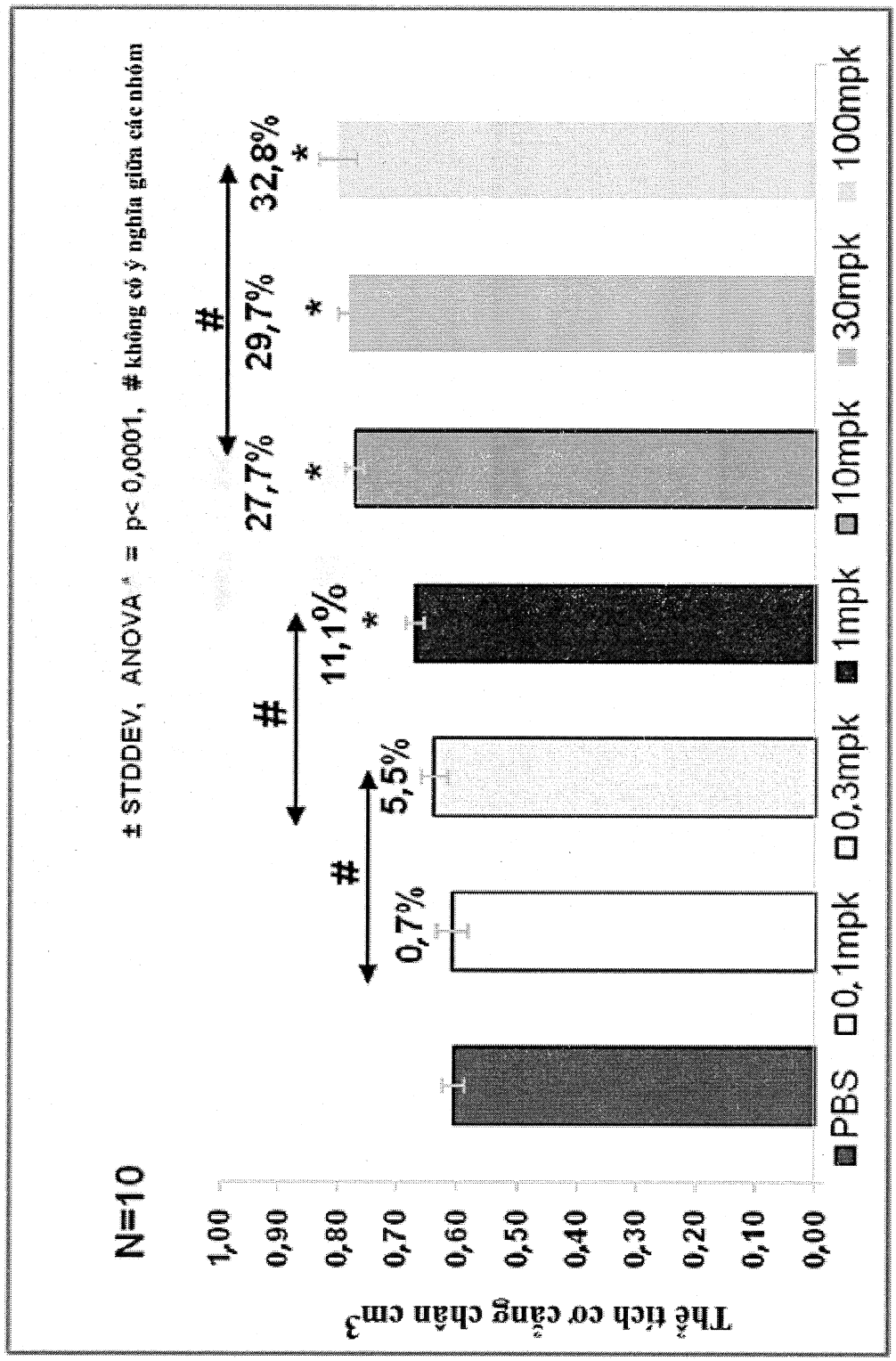

± STDDEV, ANOVA * = p< 0,0001, # không có ý nghĩa giữa các nhóm
N=10
Thể tích cơ căng chân cm3
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
PBS
0,1mpk
0,3mpk
1mpk
10mpk
30mpk
100mpk
#
0,7%
5,5%
11,1%
27,7%
29,7%
32,8%
*

Fig. 16