



(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)



1-0030883

(51)⁷ C07K 14/65

(13) B

(21) 1-2015-02068

(22) 16/12/2013

(86) PCT/IB2013/060985 16/12/2013

(87) WO 2014/097116 26/06/2014

(30) 61/738,475 18/12/2012 US

(45) 25/01/2022 406

(43) 25/09/2015 330A

(73) NOVARTIS AG (CH)

Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland

(72) FORNARO, Mara (IT); HUBER, Thomas (CH); ZURINI, Mauro (CH).

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) POLYPEPTIT CHỨA BIẾN THỂ PROTEIN YẾU TỐ TĂNG TRƯỞNG TƯƠNG TỰ INSULIN 1 (IGF-1) CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA POLYPEPTIT NÀY

(57) Sáng chế thuộc đến việc cải biến yếu tố sinh trưởng tương tự insulin 1 (Insulin-like growth factor 1 -IGF-1). Cụ thể là, sáng chế đề cập đến polypeptit IGF-1 cải biến và polypeptit tiền chất của IGF-1 cải biến trong đó sự cắt bỏ peptit Ea được ngăn ngừa. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa các polypeptit này để điều trị các bệnh và rối loạn cơ.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực cải biến yếu tố sinh trưởng tương tự insulin 1 (Insulin-like growth factor 1 - IGF-1). Cụ thể là, sáng chế đề cập đến polypeptit IGF-1 cải biến mà gắn với vùng Fc của globulin miễn dịch của người.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các yếu tố sinh trưởng tương tự insulin (insulin-like growth factor - IGF) là một phần trong hệ thống phức tạp mà tế bào sử dụng để trao đổi thông tin với môi trường sinh lý của chúng. Hệ thống phức tạp này (thường được đề cập là trục yếu tố sinh trưởng tương tự insulin) bao gồm hai thụ thể bề mặt tế bào (IGF-1R và IGF-2R), hai phối tử (IGF-1 và IGF-2), một họ gồm sáu protein gắn kết IGF ái lực cao (IGFBP 1-6), và các enzym liên quan đến phân giải IGFBP (các proteaza). Hệ thống này không chỉ quan trọng đối với sự điều hòa chức năng sinh lý bình thường mà còn quan trọng đối với một số tình trạng bệnh lý (Glass, Nat Cell Biol 5:87-90, 2003).

Trục IGF này đã được chứng minh là đóng vai trò trong việc thúc đẩy sự tăng sinh tế bào và trong việc ức chế sự chết tế bào (apoptosis). IGF-1 chủ yếu được tiết bởi gan do sự kích thích của hormon sinh trưởng của người (human growth hormone -hGH). Hầu hết tất cả tế bào trong cơ thể người đều chịu ảnh hưởng của IGF-1, đặc biệt tế bào ở cơ, sụn, xương, gan, thận, thần kinh, da và phổi. Ngoài các tác động tương tự insulin, IGF-1 cũng có thể điều hòa sự sinh trưởng tế bào. IGF-1 và IGF-2 được điều hòa bởi họ các sản phẩm của gen được biết đến là protein gắn kết IGF. Các protein này hỗ trợ điều biến hoạt động của IGF theo các cách phức tạp bao gồm cả ức chế hoạt động của IGF bằng cách ngăn chặn sự gắn kết với thụ thể IGF cũng như thúc đẩy hoạt động của IGF qua việc hỗ trợ sự vận chuyển đến các thụ thể này và tăng thời gian bán hủy của IGF ở mạch máu. Có ít nhất sáu protein gắn kết đã được mô tả đặc điểm (IGFBP1-6).

Ở dạng thành thực của nó, IGF-1 của người, còn được gọi là somatomedin, là một protein nhỏ gồm 70 axit amin đã được chứng minh là kích thích sự sinh trưởng của một phạm vi rộng các tế bào trong nuôi cấy. Protein IGF-1 này ban đầu được mã hóa bằng ba biến thể mARN do cắt nối đã biết. Khung đọc mở của mỗi mARN này mã hóa cho một protein tiền chất chứa 70 axit amin của IGF-1 (SEQ ID NO.:1) và một peptit E cụ thể ở đầu C, tùy thuộc vào mARN cụ thể của IGF-1. Các peptit E này được gọi là peptit Ea (rsvraqrhtdmpktqkqevhlknasrgsagnknyrm; SEQ ID NO.:2), peptit Eb (rsvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpgkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsARNecrgkk gk; SEQ ID NO.:3) và peptit Ec (rsvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgstfeerk; SEQ ID NO.: 4) và có độ dài trong khoảng từ 35 đến 87 axit amin và bao gồm một vùng trình tự chung ở đầu N và vùng trình tự biến đổi ở đầu C. Ví dụ, khung đọc mở của IGF-1-Ea kiểu đại mã hóa một polypeptit gồm 135 axit amin chứa trình tự dẫn đầu và một polypeptit gồm 105 axit amin không chứa trình tự dẫn đầu (gpetlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygssrrapqtgividccfrscdlrrlemycaplpkaksarsvraqrhtdmpktqkqevhlknasrgsagnknyrm; SEQ ID NO.:5). Trong biểu hiện sinh lý, các peptit E này bị cắt khỏi protein tiền chất bởi các proteaza nội sinh để thu được IGF-1 hoàn chỉnh có 70 axit amin. Tính khả dụng và thời gian bán hủy của IGF-1 trong huyết thanh người chủ yếu chịu ảnh hưởng và bị điều biến bởi proteaza và protein gắn kết IGF-1 (IGF-1 binding protein - IGFBP). IGFBP có thể ức chế hoặc kích hoạt các hoạt động của IGF-1 (Oh Y, et al., Characterization of the affinities of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins 1-4 for IGF-I, IGF-II, IGF-I/insulin hybrid, and IGF-I analogs. Endocrinology. 1993 Mar;132(3):1337-44). Các chiến lược để tăng thời gian bán hủy của IGF-1 được mô tả trong phần Tình trạng kỹ thuật của sáng chế. Các chiến lược được dự định là:

(i) sản xuất biến thể của IGF-1 chứa các đột biến đặc thù nhằm ngăn ngừa sự phân cắt IGF-1 trong huyết thanh của người bởi serin proteaza, hoặc nhằm để làm giảm tác động tiêu cực của protein gắn kết IGF-1 lên tính khả dụng hoặc thời gian bán hủy trong huyết thanh của IGF-1 (công bố đơn sáng chế quốc tế WO200040613, WO05033134, WO2006074390, WO2007/146689);

(ii) sản xuất protein dung hợp của IGF-1, trong đó protein IGF-1 thành thực được dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch của người (công bố đơn sáng chế quốc tế WO2005033134, WO200040613);

(iii) sử dụng protein tiền chất của IGF-1 trong đó sự phân cắt peptit E từ IGF-1 bằng proteaza được làm giảm bằng sự cải biến protein tiền chất này (công bố đơn sáng chế quốc tế WO2007146689);

(iv) kết hợp các chiến lược được mô tả ở trong công bố đơn sáng chế quốc tế ((i)/(ii) WO05033134, (i)/(ii) WO200040613, (i)/(iii) WO2007146689).

Mặc dù đã có các chiến lược được mô tả ở trên, các biến thể tiền chất của IGF-1 dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch của người vẫn là các ứng cử viên thuốc kém do hai nguyên nhân chủ yếu: (i) hiệu suất sản xuất thấp trong hệ thống sản xuất là động vật có vú, và (ii) ái lực gắn kết với thụ thể insulin (insulin receptor - InsR) tăng lên so với IGF-1 kiểu đại của người không được cải biến, điều này có thể gây ra hạ đường huyết, một yếu tố bất lợi cho việc điều trị bệnh.

Do đó, tồn tại nhu cầu về một công nghệ khắc phục các vấn đề được đề cập trong phần Tình trạng kỹ thuật của sáng chế. Sáng chế giải quyết nhu cầu này ở một số khía cạnh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Đối tượng thứ nhất theo sáng chế đề cập đến polypeptit chứa protein IGF-1 của người (hIGF-1), trong đó axit amin glyxin ở vị trí 42 của protein hIGF-1 đã nêu được xóa hoặc được thay thế, và trong đó việc đánh số các axit amin này tương ứng với SEQ ID NO.: 1.

Phương án bổ sung theo sáng chế đề cập đến polypeptit chứa protein IGF-1 của người được dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch của IgG của người, trong đó axit amin glyxin ở vị trí 42 của protein IGF-1 của người được xóa hoặc được thay thế, và trong đó việc đánh số các axit amin này tương ứng với SEQ ID NO.: 1.

Đối tượng khác theo sáng chế đề cập đến polypeptit chứa protein tiền chất của IGF-1 của người, trong đó axit amin glyxin ở vị trí 42 của protein tiền chất của IGF-1

của người đã nêu được xóa hoặc được thay thế, và trong đó việc đánh số các axit amin này tương ứng với SEQ ID NO.: 5.

Phương án bổ sung theo sáng chế đề cập đến polypeptit chứa protein tiền chất của IGF-1 của người được dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch của IgG của người, trong đó axit amin glyxin ở vị trí 42 của protein tiền chất của IGF-1 của người được xóa hoặc được thay thế, và trong đó việc đánh số các axit amin này tương ứng với SEQ ID NO.: 5.

Theo phương án nhất định, sáng chế đề cập đến polypeptit được mô tả ở trên, trong đó axit amin glyxin ở vị trí 42 được xóa hoặc được thay thế bằng serin.

Theo phương án bổ sung, protein IGF-1 của người nêu trên chứa sự xóa hoặc sự đột biến bổ sung ở các axit amin G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69 và/hoặc A70.

Theo phương án bổ sung, protein tiền chất của IGF-1 của người nêu trên chứa peptit Ea và sự xóa hoặc sự đột biến bổ sung ở các axit amin G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69, A70, R71, S72, R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 và/hoặc M105.

Theo phương án khác nữa là phương án mà có thể được kết hợp với các phương án đã nêu theo sáng chế, protein tiền chất của IGF-1 của người và vùng Fc được phân tách ở peptit vùng bản lề.

Theo đó, sáng chế cũng đề cập đến protein tiền chất của IGF-1 của người nêu trên, trong đó peptit vùng bản lề được chọn từ nhóm bao gồm các peptit bản lề 1 (SEQ ID NO.: 22), peptit bản lề 2 (SEQ ID NO.: 23) và peptit bản lề 3 (SEQ ID NO.: 24).

Theo phương án cụ thể, protein tiền chất của IGF-1 của người nêu trên khi được đột biến ở peptit Ea ở các axit amin R74, R77 và/hoặc R104, các axit amin R74, R77 và R104 đã nêu được đột biến thành glutamin (Q).

Polypeptit chứa hoặc bao gồm protein IGF-1 của người hoặc protein tiền chất của IGF-1 của người như nêu trên, trong đó:

- a. các axit amin E3, R71 và S72 được xóa,
- b. axit amin G42 được xóa hoặc được thay thế bằng serin, và

- c. axit amin R37 được đột biến thành alanin và trong đó việc đánh số các axit amin này tương ứng với SEQ ID NO.: 5.

Phương án cụ thể khác theo sáng chế đề cập đến protein tiền chất của IGF-1 của người nêu trên, trong đó peptit E là peptit Ea và trong đó:

- a. axit amin G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa,
- b. axit amin G42 được xóa hoặc được đột biến thành serin, và
- c. axit amin R36, R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin,
- d. axit amin R37 được đột biến thành alanin và trong đó việc đánh số các axit amin này tương ứng với SEQ ID NO.: 5.

Phương án cụ thể khác theo sáng chế đề cập đến protein tiền chất của IGF-1 của người nêu trên, trong đó Peptit E là peptit Ea và trong đó:

- a. axit amin G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71, S72, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 và/hoặc M105 được xóa,
- b. axit amin G42 được xóa hoặc được đột biến thành serin, và
- c. axit amin R36, R74 và R77 được đột biến thành glutamin, và
- d. axit amin R37 được đột biến thành alanin và trong đó việc đánh số các axit amin này tương ứng với SEQ ID NO.: 5.

Tương tự, sáng chế đề cập đến protein tiền chất của IGF-1 của người nêu trên, trong đó peptit E là peptit Ea và trong đó

- a. axit amin G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa,
- b. axit amin G42 được xóa hoặc được đột biến thành serin,
- c. axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin, và
- d. axit amin R37 được đột biến thành axit glutamic và trong đó việc đánh số các axit amin này tương ứng với SEQ ID NO.: 5.

Tương tự, sáng chế đề cập đến protein tiền chất của IGF-1 của người nêu trên, trong đó peptit E là peptit Ea và trong đó:

- a. axit amin G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71, S72, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 và/hoặc M105 được xóa,

- b. axit amin G42 được xóa hoặc được đột biến thành serin,
- c. axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin, và
- d. axit amin R37 được đột biến thành axit glutamic và trong đó việc đánh số các axit amin này tương ứng với SEQ ID NO.: 5.

Theo phương án cụ thể nữa, sáng chế đề cập đến protein dung hợp Fc tiền chất của IGF-1 của người nêu trên, trong đó peptit E là peptit Ea và trong đó:

- a. axit amin G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa,
- b. axit amin G42 được xóa hoặc được đột biến thành serin, và
- c. axit amin R36, R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin,
- d. axit amin R37 được đột biến thành alanin, trong đó việc đánh số các axit amin này tương ứng với SEQ ID NO.: 5, và
- e. trong đó protein tiền chất của IGF-1 và vùng Fc được phân tách bởi bản lề là peptit bản lề 1 (SEQ ID NO.:22).

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến protein dung hợp Fc tiền chất của IGF-1 của người nêu trên, trong đó peptit E là peptit Ea và trong đó:

- a. axit amin G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa,
- b. axit amin G42 được xóa hoặc được đột biến thành serin,
- c. axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin,
- d. axit amin R37 được đột biến thành axit glutamic, trong đó việc đánh số các axit amin này tương ứng với SEQ ID NO.: 5, và
- e. trong đó protein tiền chất của IGF-1 và vùng Fc được phân tách bởi bản lề là peptit bản lề 3 (SEQ ID NO.: 24).

Theo phương án nhất định, sáng chế đề cập đến polypeptit nêu trên, trong đó vùng Fc được cải biến để điều biến sự gắn kết của nó với thụ thể Fc.

Do đó, sáng chế đề cập đến protein dung hợp Fc tiền chất của IGF-1 của người nêu trên, trong đó vùng Fc này được cải biến để

- I. giảm ái lực của nó đối với thụ thể Fc;

- II. giảm hoạt tính ADCC; hoặc
- III. ngăn ngừa hoạt tính ADCC.

Phương án cụ thể khác theo sáng chế đề cập đến protein dung hợp Fc tiền chất của IGF-1 của người nêu trên chứa SEQ ID NO.: 8, hoặc SEQ ID NO.: 9, hoặc SEQ ID NO.: 10, hoặc SEQ ID NO.: 11, hoặc SEQ ID NO.: 12, hoặc SEQ ID NO.: 13, hoặc SEQ ID NO.: 14, hoặc SEQ ID NO.: 27.

Theo phương án nhất định, phương án mà có thể được kết hợp với các phương án nêu trên theo sáng chế, protein dung hợp Fc tiền chất của IGF-1 của người này được glycosyl hóa.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit chứa phân tử axit nucleic mã hóa cho protein dung hợp Fc tiền chất của IGF-1 của người nêu trên. Theo đó, sáng chế đề cập đến polynucleotit chứa phân tử axit nucleic như được mô tả trong SEQ ID NO.:15 hoặc SEQ ID NO.: 16 hoặc SEQ ID NO.: 17 hoặc SEQ ID NO.: 18 hoặc SEQ ID NO.: 19 hoặc SEQ ID NO.: 20 hoặc SEQ ID NO.: 21.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm gồm polypeptit chứa một trong số các protein tiền chất của IGF-1 của người nêu trên để dùng trong điều trị bệnh.

Theo phương án khác của sáng chế, dược phẩm nêu trên được sử dụng trong điều trị để điều trị rối loạn cơ ở bệnh nhân cần được điều trị. Theo phương án cụ thể theo sáng chế, sử dụng trong điều trị này là để điều trị cho các bệnh nhân bỏng bị mất trọng lượng nạc cơ thể và/hoặc suy mòn cơ hoặc điều trị cho bệnh nhân mắc COPD, hoặc điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh Kennedy, hoặc điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh thận mạn tính.

Theo phương án bổ sung của sáng chế, rối loạn cơ được mô tả ở trên là bệnh teo cơ. Do đó, theo một số khía cạnh của sáng chế, việc sử dụng trong điều trị là điều trị bệnh sarcopenia do béo phì, bệnh sarcopenia, và bệnh teo cơ do tiểu đường.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị rối loạn cơ ở bệnh nhân cần điều trị rối loạn này, phương pháp này bao gồm dùng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của protein tiền chất của IGF-1 của người theo sáng chế nêu trên.

Theo đó, theo một phương án cụ thể, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho bệnh nhân bỏng bị mất trọng lượng nạc cơ thể và/hoặc suy mòn cơ, hoặc phương pháp

điều trị cho bệnh nhân mắc COPD, hoặc phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh Kennedy, hoặc phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh thận mạn tính.

Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp điều trị rối loạn cơ cho bệnh nhân cần điều trị rối loạn này, trong đó rối loạn cơ này là bệnh teo cơ được chọn từ nhóm bao gồm bệnh sarcopenia do béo phì, bệnh sarcopenia, và bệnh teo cơ do tiểu đường.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit IGF-1 hoặc polypeptit tiền chất của IGF-1 như nêu trên, trong đó axit amin glyxin ở vị trí 42 được xóa. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit IGF-1 hoặc polypeptit tiền chất của IGF-1 như nêu trên, trong đó protein nêu trên được peg hóa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: ái lực gắn kết với IGF-1R

Ái lực gắn kết cao của các biến thể của hIGF-1 và các biến thể của IGF-1 với rhIGF1R được đo bằng cách sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt (Biacore).

Fig. 2 (A-D): Sự phosphoryl hóa IGF-1R trong thể biến nạp tế bào NIH3T3-IGF-1R

Các tế bào NIH3T3 biểu hiện quá mức thụ thể IGF-1 của người (NIH3T3-IGF-1R) được nuôi cấy trong thời gian 24 giờ trong môi trường sinh trưởng, bỏ đói trong thời gian 18 giờ trong môi trường không chứa huyết thanh và được kích thích trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 37°C với các nồng độ đẳng mol của các peptit đại diện. Mức độ phosphoryl hóa IGF-1R được phân tích bằng ELISA. Sự phosphoryl hóa thụ thể được biểu hiện bằng % đối chứng $\pm$ độ lệch chuẩn (SD) (các tế bào nguyên bào sợi cơ của phôi chuột NIH 3T3 lấy từ dòng tế bào được phân lập và được bắt đầu năm 1962 ở Trường Đại học NY khoa bệnh học Y học; Todaro GJ, Green H . Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. . J. Cell Biol. 17: 299-313, 1963)

Fig. 3 (A-D): Sự phosphoryl hóa InsR trong thể biến nạp tế bào NIH3T3-InsR

Các tế bào NIH3T3 biểu hiện quá mức thụ thể insulin của người (NIH3T3-InsR) được nuôi cấy trong thời gian 24 giờ trong môi trường sinh trưởng, bỏ đói trong thời gian 18 giờ trong môi trường không chứa huyết thanh và được kích thích trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 37°C với các nồng độ đẳng mol của các peptit đã nêu. Mức độ phosphoryl

hóa InsR được phân tích bằng ELISA. Sự phosphoryl hóa thụ thể được biểu hiện bằng đơn vị ngẫu nhiên $\pm$ độ lệch chuẩn (SD).

Fig. 4 (A-C): Sự phosphoryl hóa IGF-1R ở nguyên bào cơ sơ cấp của người và khí đuôi dài cynomolgus

Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường sinh trưởng, bỏ đói trong 4 giờ và tiếp đó được kích thích bằng hIGF-1 hoặc các biến thể hIGF-1 trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 37°C. Mức độ phosphoryl hóa IGF-1R được phân tích bằng ELISA bằng cách sử dụng DuoSet IC human phosphor-IGF1R. Sự phosphoryl hóa thụ thể được biểu hiện là % đối chứng $\pm$ độ lệch chuẩn (SD).

Fig. 5 (A-D): Sự hấp thu glucoza trong các tế bào ống cơ và các tế bào tạo mỡ ở chuột

Các tế bào tạo mỡ 3T3-L1 (B và D) và tế bào ống cơ của chuột C2C12 (A và C) được phân tán lên các đĩa 24 giếng và được nuôi cấy trong DMEM không chứa huyết thanh trong thời gian 4 giờ. DMEM không chứa huyết thanh tiếp đó lần lượt được thay bằng chất đệm KRP hoặc HBS đối với các tế bào tạo mỡ 3T3-L1 và C2C12. Các tế bào được xử lý trong thời gian 1 giờ bằng peptit cụ thể ở nhiệt độ 37°C. Mức độ hấp thu glucoza đo được bằng cách bổ sung 0,4 μ Ci (với các tế bào tạo mỡ) hoặc 0,8 μ Ci (với C2C12) hợp chất [3 H] 2-deoxy-D-glucoza và 0,1mM (với các tế bào tạo mỡ) hoặc 0,01mM (với C2C12) 2-deoxy-D-glucoza trong thời gian 10 phút (các tế bào tạo mỡ) hoặc 5 phút (với C2C12) ở nhiệt độ trong phòng. Độ kích hoạt phóng xạ được phân tích bằng kỹ thuật đếm nhấp nháy.

Fig. 6: Sự hấp thu glucoza: thử nghiệm theo tiến trình thời gian trong các tế bào tạo mỡ

Các tế bào tạo mỡ 3T3-L1 được phân tán lên các đĩa 24 giếng và được nuôi cấy trong DMEM không chứa huyết thanh (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) trong 4 giờ. DMEM không chứa huyết thanh tiếp đó được thay bằng chất đệm KRP và các tế bào được xử lý trong thời gian 15 phút, 60 phút, 90 phút và 120 phút bằng peptit cụ thể ở nhiệt độ 37°C. Sự hấp thu glucoza đo được bằng cách bổ sung 0,4 μ Ci [3 H] 2-deoxy-D-glucoza và 0,1mM 2-deoxy-D-glucoza trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Độ kích hoạt phóng xạ được phân tích bằng kỹ thuật đếm nhấp nháy. 3T3-L1 là dòng tế bào được biến đổi từ các tế bào 3T3 được dùng trong nghiên cứu sinh học trên mô mỡ; Green H, Kehinde O (1975). "An established preadipose cell line and its

differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion". Cell 5 (1): 19–27.

Fig. 7 (A-B):

Chuột đực trưởng thành (n=3 con/nhóm) được nhận hIGF-1-Ea-Fc_mut 13/2_A hoặc hIGF-1-Ea-Fc_mut 04/2_E ở liều lượng là 10mg/kg bằng cách tiêm trong tĩnh mạch nhanh (i.v.) hoặc tiêm dưới da (s.c.). Các mẫu máu được lấy lần lượt theo thời gian vào các thời điểm 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 168 giờ và 336 giờ sau khi dùng chất thử nghiệm. Nồng độ huyết thanh của protein tái tổ hợp xác định được bằng ELISA.

Fig. 8 (A-C): Sự tác động của các hIGF-1-Ea-Fc đột biến đối với sự teo cơ do dexamethason.

Các giá trị sự thay đổi về trọng lượng cơ thể (A), và trọng lượng cơ (B và C) của các nhóm (A) chất dẫn thuốc, (B) Dex, (C) Dex với hIGF-1 ở liều 3,8mg/kg/ngày s.c. truyền bằng bơm nhỏ, (D) Dex với hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A với liều 3mg/kg/ngày s.c. hai ngày một lần, (E) Dex với hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A với liều 10mg/kg/ngày s.c. hai ngày một lần, và (F) Dex với hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A với liều 3mg/kg/ngày s.c. hai ngày một lần được thể hiện bằng giá trị trung bình $\pm$ SEM (n=4-6). *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$ so với nhóm B, #### $P < 0,001$ so với nhóm A (kiểm tra đa so sánh của Dunnett tiếp sau ANOVA).

Fig. 9: Sự sản xuất các biến thể của IGF-1 mang các đột biến G42 khác nhau trong tế bào HEK293

Số liệu sản xuất từ dịch nuôi cấy HEK293F quy mô 100ml được chuyển nhiễm FuGene. Hàm lượng được đo bằng HPLC protein A phân tích từ dịch nuôi cấy tế bào trong. Nồng độ được đo sau quá trình tinh sạch protein A. Mức độ kết tụ protein tinh sạch được đo bằng SEC-MALS.

Fig. 10: Tỷ lệ vật liệu bị cắt giảm của hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc (SEQ ID NO. 6) (xám đậm) và hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_A (SEQ ID NO.9) (xám nhạt) biểu hiện trong hai dòng tế bào CHO khác nhau. Tỷ lệ vật liệu bị cắt giảm được xác định từ protein tinh sạch (sắc ký protein A) của tế bào biến thể CHOK1 chuyển nhiễm cũng như tế bào biến thể CHO-DUX11 chuyển nhiễm. Tỷ lệ cắt giảm được xác định qua phân tích

LC-MS pha đảo. Tỷ lệ vật liệu bị cắt giảm của hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_A là thấp hơn đáng kể ở cả hai dòng tế bào này.

Fig. 11: Sự sinh trưởng tế bào của các tế bào biến thể CHO-K1 biểu hiện kháng thể tái tổ hợp (đường nét đậm) và tế bào biến thể CHO-K1 biểu hiện hIGF-1Ea 3mut (SEQ ID NO.: 27) (đường chấm chấm) trong thời gian vận hành bình phản ứng sinh học. B: Phần trăm tế bào sống sót trong khi vận hành bình phản ứng sinh học (đường nét đậm dòng biến thể CHO-K1 tạo ra kháng thể, đường chấm chấm các dòng biểu hiện hIGF-1Ea 3mut).

Fig. 12: Số tế bào sống sót: Đường liên tục thể hiện sự sinh trưởng tế bào của các tế bào biến thể CHO-K1. Trong quá trình đồng nuôi cấy với IGF-1 kiểu dại hoặc hIGF-1Ea 3mut sự sinh trưởng của tế bào bị ức chế (lần lượt là đường chấm chấm và đường nét đứt). Sự sinh trưởng trung bình của 3 nhóm tái bản sinh học được thể hiện. Sự sinh trưởng của IGF-1/hIGF-1Ea 3mut tăng vọt vào ngày thứ 2 (thí nghiệm tăng vọt lên). B: Khả năng sống của tế bào: Đường liên tục thể hiện khả năng sống của tế bào của tế bào biến thể CHO-K1, đường chấm chấm tương ứng với đường đậm cho thấy sự giảm khả năng sống sót tế bào sau khi sự sinh trưởng của IGF-1/hIGF-1Ea 3mut tăng vọt. Khả năng sống của các tế bào này giảm sớm hơn hai ngày khi tế bào được đồng nuôi cấy với IGF-1/hIGF-1Ea 3mut. Không có sự khác biệt giữa IGF-1 và hIGF-1Ea 3mut về sự sinh trưởng của tế bào hoặc khả năng sống của tế bào có thể được phát hiện.

Fig. 13: Sự sinh trưởng tế bào của các tế bào biến thể CHO-DUXB11 (đường đậm) và sự sinh trưởng tế bào giảm trong quá trình đồng nuôi cấy với IGF-1Ea 3mut (đường chấm chấm) được thể hiện. Sau khi bổ sung chất ức chế IGF-1R tyrosin kinaza NVPAEW541 (đường đậm có dấu hoa thị) sự sinh trưởng tế bào giảm nhẹ. Việc đồng nuôi cấy với IGF-1Ea 3mut và việc bổ sung chất ức chế IGF-1R tyrosin kinaza dẫn đến không còn sự ức chế sự sinh trưởng tế bào nữa (đường chấm chấm có dấu hoa thị).

Fig. 14: Sự giảm sinh trưởng tế bào đồng nuôi cấy với IGF-1 được thể hiện trong đường đậm về sinh trưởng tế bào của tế bào biến thể CHO-K1 kiểu dại (WT) và trong đường đậm có chấm tròn. Với các đường chấm chấm, sự sinh trưởng tế bào của ba dòng IGF-1R KO được thể hiện. Sự sinh trưởng tế bào được cải thiện hơn một chút so với tế bào biến thể CHO-K1 kiểu dại. Sự đồng nuôi cấy với IGF-1 chỉ ức chế sinh trưởng tế bào ít

và sự sinh trưởng tế bào là tương tự với tế bào biến thể CHO-K1 kiểu dại không đồng nuôi cấy với IGF-1.

Fig. 15: Hàm lượng protein dung hợp IGF-1-Fc của mẻ nuôi cấy ngày thứ 14 được thể hiện (mức độ tích lũy). Sự biểu hiện của 7 protein dung hợp IGF-1-Fc khác nhau trong 5 dòng tế bào khác nhau được nhấn mạnh. Sự biểu hiện của protein dung hợp IGF-1-Fc tăng gấp 5-20 lần ở các dòng tế bào CHO-K1 biến đổi IGF-1R-KO, dòng tế bào CHO-DUXB11 biến đổi IGF-1R-KO cũng như ở dòng tế bào CHO-DUXB11 biến đổi shARN (biểu hiện của IGF-1R và INSR giảm) so với dòng tế bào biến thể CHO-K1 kiểu dại hoặc dòng tế bào biến thể CHO-DUXB11 kiểu dại.

Fig. 16: Hàm lượng protein dung hợp IGF-1-Fc của mẻ nuôi cấy ngày thứ 14 trong bình lắc dung tích 50ml. Hàm lượng của protein dung hợp IGF-1-Fc: hIGF-1-Ea-fc_mut 13/2_A trong 15 dòng tế bào CHO-DUXB11 biến thể IGF-1R-KO tốt nhất cao hơn khoảng 6-7 lần so với hàm lượng của protein dung hợp IGF-1-Fc: hIGF-1-Ea-Δ1-3, R37A, Δ71-72, miền R77Q-fc ở dòng tế bào biến thể CHO-DUXB11 kiểu dại.

Fig. 17: Sự sản xuất và thử thách protein của các biến thể IGF-1 trong tế bào HEK293F.

Dữ liệu sản xuất từ dịch nuôi cấy HEK293T quy mô 100ml được chuyển nhiễm PEI. Hiệu suất sau quá trình tinh sạch protein A được ngoại suy cho thể tích dịch nuôi cấy là 1L. Sự kết cụm được đo bằng SEC-MALS sau quá trình tinh sạch protein A. Các protein tinh sạch được ủ trong môi trường CHO điều kiện từ các tế bào biến thể CHOK1 trong thời gian 5 ngày và từ các tế bào biến thể CHODUXB11 trong thời gian 20 ngày. Phần trăm protein có chiều dài đầy đủ còn lại được thể hiện. Phương pháp được mô tả trong ví dụ 2.

Fig. 18: Sự phosphoryl hóa InsR trong các thể biến nạp tế bào NIH3T3-InsR

Các tế bào NIH3T3 biểu hiện quá mức thụ thể insulin của người (NIH3T3-InsR) được nuôi cấy trong thời gian 24 giờ trong môi trường sinh trưởng, bỏ đói trong thời gian 18 giờ trong môi trường không chứa huyết thanh và được kích thích trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 37°C với các nồng độ đẳng mol của các peptit đã nêu. Mức độ phosphoryl hóa InsR được phân tích bằng ELISA. Sự phosphoryl hóa thụ thể được biểu hiện là đơn vị ngẫu nhiên $\pm$ độ lệch chuẩn (SD).

Fig. 19: Mức độ hấp thu glucoza ở tế bào ống cơ và tế bào tạo mỡ của chuột

Các tế bào tạo mỡ 3T3-L1 (A) và tế bào ống cơ C2C12 (B) chuột được phân tán lên các đĩa 24 giếng và được nuôi cấy trong DMEM không chứa huyết thanh trong thời gian 4 giờ. DMEM không chứa huyết thanh tiếp đó được thay bằng chất đệm tương ứng là KRP hoặc HBS với các tế bào tạo mỡ 3T3-L1 và tế bào C2C12. Các tế bào được xử lý trong thời gian 1 giờ bằng peptit cụ thể ở nhiệt độ 37°C. Mức độ hấp thu glucoza đo được bằng cách bổ sung 0,4μCi (với các tế bào tạo mỡ) hoặc 0,8μCi (với C2C12) [³H] 2-deoxy-D-glucoza và 0,1mM (với các tế bào tạo mỡ) hoặc 0,01mM (với C2C12) 2-deoxy-D-glucoza trong thời gian 10 phút (với các tế bào tạo mỡ) hoặc 5 phút (với C2C12) ở nhiệt độ trong phòng. Độ kích hoạt phóng xạ được phân tích bằng kỹ thuật đếm nhấp nháy.

Định nghĩa chung

Để sáng chế có thể được hiểu dễ dàng hơn, trước tiên định nghĩa một số thuật ngữ nhất định. Các định nghĩa khác được nêu ra trong phần Mô tả chi tiết sáng chế.

Chứa: thuật ngữ “chứa” có nghĩa là “bao gồm”, ví dụ, chế phẩm “chứa” X có thể bao gồm toàn bộ là X hoặc có thể bao gồm thành phần bổ sung khác, ví dụ, X + Y.

Ký tự “Δ” hoặc các chữ cái “d” hoặc “D”: trong trường hợp mô tả protein (ví dụ, “miền hIGF-1-Ea- Δ1-3, R37A, Δ 71-72, R77Q-fc” hoặc “miền hIGF-1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-fc”) dùng để chỉ sự xóa axit amin. Ví dụ như, thuật ngữ “D71-72, 77” (trong trường hợp protein hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc) mô tả thực tế là các axit amin 71, 72 và 77 đã được xóa.

Protein yếu tố sinh trưởng tương tự insulin 1 hoặc biến thể của nó: cụm từ “protein yếu tố sinh trưởng tương tự insulin 1 hoặc biến thể của nó” dùng để chỉ các protein được mã hóa bởi gen yếu tố sinh trưởng tương tự insulin 1, đặc biệt được ưu tiên là protein yếu tố sinh trưởng tương tự insulin 1 của người (human Insulin like growth factor 1 protein -hIGF-1 protein) và các biến thể của nó. Biến thể của protein IGF-1 là protein có trình tự khác ít nhất là một axit amin so với trình tự IGF-1 kiểu đại, trong đó thuật ngữ “trình tự kiểu đại” dùng để chỉ trình tự polypeptit hoặc trình tự gen có trong ít nhất là một sinh vật xuất hiện trong tự nhiên hoặc trình tự polypeptit hoặc trình tự gen không được thay đổi, không bị đột biến, hoặc không bị tác động khác của con người. Thuật ngữ biến thể của IGF-1 và phân tử bất chức IGF-1 được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này. Biến thể của IGF-1 cũng là protein tiền chất của IGF-1 hoặc

protein pro-IGF-1 chứa trình tự peptit dẫn đầu. Biến thể của IGF-1 cũng là protein dung hợp chứa protein IGF-1, ví dụ, protein chứa protein IGF-1 được dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch. Không kể các ví dụ khác, các ví dụ về biến thể IGF-1 được bộc lộ trong các công bố đơn sáng chế quốc tế số WO05033134 (protein IGF-1 ổn định dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch) và WO2007146689 (protein tiền chất IGF-1 ổn định). Biến thể của IGF-1 như nêu trên vẫn giữ được hoạt tính sinh học theo nghĩa là protein này có thể được xem như tương đương về mặt chức năng với IGF-1 kiểu đại.

Protein tương đương về mặt chức năng đối với protein IGF-1 cần được hiểu là các protein IGF-1 chứa đột biến tự nhiên hoặc đột biến nhân tạo. Các đột biến có thể là chèn thêm, xóa hoặc thay thế một hoặc nhiều axit nucleic mà không làm giảm hoạt tính sinh học của protein IGF-1 đó. Protein tương đương về mặt chức năng có độ đồng nhất ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, tốt hơn là 90%, tốt nhất là hơn 95%, đặc biệt tốt hơn là có độ đồng nhất ít nhất là 98% – nhưng độ đồng nhất nhỏ hơn 100% với protein IGF-1 kiểu đại, ví dụ, protein IGF-1 của người có SEQ ID NO.: 1. Trong trường hợp các protein dung hợp như nêu trên, độ đồng nhất 100% sẽ chỉ xác định được trên phần IGF-1 cơ bản của protein dung hợp này.

Các yếu tố sinh trưởng tương tự insulin (IGF) là một phần của hệ thống phức tạp để tế bào dùng để trao đổi thông tin với môi trường sinh lý của chúng. Hệ thống phức tạp này (thường được đề cập là trục yếu tố sinh trưởng tương tự insulin) gồm hai thụ thể bề mặt tế bào (IGF-1R và IGF-2R), hai phối tử (IGF-1 và IGF-2), một họ gồm sáu protein gắn kết IGF ái lực cao (IGFBP 1-6), và enzym liên quan đến phân giải IGFBP (các proteaza). Hệ thống này không chỉ quan trọng đối với sự điều hòa chức năng sinh lý bình thường mà còn quan trọng đối với một số tình trạng bệnh lý (Glass, Nat Cell Biol 5:87-90, 2003). Trục IGF này đã được chứng minh là đóng vai trò trong việc thúc đẩy sự tăng sinh tế bào và trong việc ức chế sự chết tế bào (apoptosis). IGF-1 chủ yếu được tiết bởi gan do sự kích thích bởi hormon sinh trưởng của người (hGH). Hầu hết mọi tế bào trong cơ thể con người chịu ảnh hưởng của IGF-1, đặc biệt tế bào ở cơ, sụn, xương, gan, thận, thần kinh, da và phổi. Ngoài các tác động tương tự insulin, IGF-1 cũng có thể điều hòa sự sinh trưởng tế bào. IGF-1 và IGF-2 được điều hòa bởi họ các sản phẩm của gen được biết đến là protein gắn kết IGF. Các protein này hỗ trợ điều biến hoạt động của IGF theo các cách phức tạp bao gồm ức chế hoạt động của IGF bằng cách

ngăn chặn sự gắn kết với thụ thể IGF cũng như thúc đẩy hoạt động của IGF qua việc hỗ trợ sự vận chuyển IGF đến các thụ thể của chúng và tăng thời gian bán hủy của IGF ở mạch máu. Có ít nhất sáu protein gắn kết đã được mô tả đặc điểm (IGFBP1-6). IGF-1 được sử dụng rộng rãi trong các ứng dụng điều trị. Mecasermin (nhãn hiệu Increlex™) là sản phẩm tổng hợp tương tự IGF-1 đã được phê chuẩn để điều trị sự chậm sinh trưởng. Một số công ty đã đánh giá IGF-1 trong các thử nghiệm lâm sàng với nhiều chỉ thị khác, bao gồm bệnh tiểu đường typ 1, bệnh tiểu đường typ 2, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, tổn thương nghiêm trọng do bỏng và bệnh loạn dưỡng tăng trưởng lực cơ.

Để rõ ràng và nhất quán, việc đánh số các gốc axit amin của phân tử tiền chất của IGF-1 hoặc các protein hoàn chỉnh trong đơn sáng chế và trong phần Yêu cầu bảo hộ được dựa trên việc đánh số trình tự protein tiền chất kiểu đại của yếu tố sinh trưởng tương tự insulin 1 của người (somatomedin C), dạng tương đồng CRA_c (số truy cập EAW97697) không chứa peptit tín hiệu (có nghĩa là SEQ ID NO.: 5).

Tế bào động vật có vú: thuật ngữ “tế bào động vật có vú” trong phạm vi của phương pháp theo sáng chế dùng để chỉ các tế bào động vật có vú thích hợp để tạo ra protein ở quy mô sản xuất công nghiệp. Các tế bào này được biết rõ bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực này và có nguồn gốc từ, ví dụ, các loài *Cricetulus griseus*, *Cercopithecus aethiops*, *Homo sapiens*, *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus* và *Chlorocebus*. Các dòng tế bào tương ứng đã biết như là các tế bào CHO (tế bào buồng trứng của chuột Hamster Trung Quốc), tế bào COS (dòng tế bào có nguồn gốc từ thận của khỉ (khỉ xanh Châu Phi), tế bào Vero (các tế bào biểu mô thận được tách chiết từ khỉ xanh Châu Phi), tế bào Hela (dòng tế bào có nguồn gốc từ các tế bào ung thư cổ tử cung được lấy từ Henrietta Lacks), tế bào BHK (tế bào thận của chuột hamster sơ sinh), tế bào HEK (tế bào thận gốc phôi của người), tế bào NS0 (dòng tế bào u tủy của chuột), tế bào C127 (dòng tế bào không gây ung thư của chuột), tế bào PerC6® (dòng tế bào của người, hãng Crucell), tế bào CAP (sản phẩm amniotit của hãng CEVEC) và tế bào Sp-2/0 (tế bào u tủy của chuột).

Thuật ngữ “tính đặc hiệu thụ thể của protein IGF-1 được làm ổn định có trước đó trong lĩnh vực kỹ thuật này” trong phạm vi của đơn sáng chế này cũng dùng để chỉ sự giảm khả năng cảm ứng sự phosphoryl hóa thụ thể insulin (giảm hiệu lực và/hoặc hiệu quả) của các phân tử IGF-1 theo sáng chế so sánh với các biến thể IGF-1 có trước đó trong

lĩnh vực kỹ thuật này, giảm nguy cơ cảm ứng hạ đường huyết, một yếu tố bất lợi cho việc điều trị bệnh.

Phân tử tiền thân: sau đây, thuật ngữ “phân tử tiền thân” khi được sử dụng trong phạm vi của sáng chế sẽ dùng để chỉ phân tử tiền chất của protein IGF1 hoàn chỉnh của người không gồm peptit tín hiệu, nhưng bao gồm các peptit tương ứng là Ea, Eb và Ec.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phân tử chứa peptit Ea dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch, trong đó các gốc protein G1, P2, E3, R71 và S72 được xóa, axit amin R77 được xóa hoặc được thay thế bằng glutamin và axit amin R37 được thay thế bằng alanin (miền hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, 77-fc (SEQ ID NO.:6) và miền hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, R77Q-fc (SEQ ID NO.:7)) được điều chế và kiểm thử. Sự biểu hiện của miền hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72del71-72, 77-fc (SEQ ID NO.:6) trong hệ thống tế bào động vật có vú là không thể, bởi vấn đề kết cụm và phân rã (hơn 90% protein được tạo ra bị phân rã; xem Fig. 10)

Ngoài ra, các protein chứa miền hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72del71-72, 77-fc (SEQ ID NO.:6) nêu trên cho thấy tính đặc hiệu thụ thể giảm so với IGF-1 hoàn chỉnh không cải biến trong thử nghiệm phosphoryl hóa InsR NIH3T3 (xem Fig. 3).

Do đó, các biến thể tiền chất của IGF-1 dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch của người là các ứng cử viên thuốc kém, bởi vì (i) sản lượng sản xuất thấp trong hệ thống sản xuất là động vật có vú, và (ii) tăng ái lực gắn kết với thụ thể insulin (insulin receptor -InsR) so với IGF-1 kiểu đại của người không cải biến, có thể dẫn đến hạ đường huyết, một yếu tố bất lợi cho việc điều trị bệnh.

Sáng chế được dựa trên quan sát bất ngờ về (1) hiệu suất sản xuất trong hệ thống sản xuất là tế bào của động vật có vú và (2) tính đặc hiệu thụ thể của protein IGF-1 tự nhiên hoặc protein IGF-1 được làm ổn định có trước đó trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được cải thiện bằng cách đưa vào các axit amin đột biến cụ thể khác, trong đó các đột biến khác nhau giải quyết các vấn đề khác nhau và các đột biến đã nêu có thể được kết hợp với nhiều vấn đề xác định là liên quan đến hiệu suất sản xuất, hiệu quả và/hoặc tính đặc hiệu thụ thể.

Một kết quả cụ thể gây bất ngờ khác là quan sát thấy protein IGF-1 của người (SEQ ID NO.: 1) được đột biến ở vị trí G42 (đột biến thay thế G42S) cảm ứng hấp thu glucoza ít hơn trong các hệ thống tế bào ống cơ C2C12 và tế bào tạo mỡ (3T3-L1) *in vitro* so sánh với IGF-1 kiểu dại của người không cải biến, có thể làm giảm nguy cơ hạ đường huyết khi điều trị IGF-1 *in vivo* (Fig. 18).

Một kết quả cụ thể đáng ngạc nhiên khác nữa là quan sát thấy các protein tiền chất của IGF-1 của người có trước đó trong lĩnh vực kỹ thuật này được gây đột biến ở vị trí G42 (đột biến xóa hoặc thay thế cụ thể) có khả năng kích thích sự phosphoryl hóa thụ thể insulin (InsR) giống như IGF-1 kiểu dại không cải biến của người, làm giảm nguy cơ hạ đường huyết của biến thể IGF-1 có trước đó trong lĩnh vực kỹ thuật này (Fig. 3). Thậm chí đáng ngạc nhiên hơn là quan sát thấy đột biến G42S có một tác động tích cực khác nữa lên hiệu suất sản xuất các protein tiền chất của IGF-1 của người có trước đó trong lĩnh vực này khi được dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch trong tế bào động vật có vú (Fig. 10/17), có nghĩa là sự tạo thành các kết cụm tác động tiêu cực đến hiệu suất sản xuất có thể được giảm xuống đáng kể bằng cách đưa vào đột biến G42S (Fig. 9/17). Do đó, sáng chế ở mức độ nào đó dựa trên phát hiện gây bất ngờ này, bằng cách thao tác lên axit amin glyxin 42 trong protein IGF-1 của người hoặc các biến thể phân tử tiền chất IGF-1 của người của nó, hai rào cản chính về kỹ thuật trong sự phát triển các biến thể IGF-1 cho điều trị có thể được khắc phục. Theo khía cạnh khác sáng chế đề xuất giải pháp cho vấn đề là protein tiền chất của IGF-1 có trước đó trong lĩnh vực kỹ thuật này khi được dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch IgG của người không thể được sản xuất ở quy mô công nghiệp trong các tế bào động vật có vú, bởi vì các protein dung hợp đã nêu bị phân rã ngay lập tức bởi các proteaza của tế bào động vật có vú. Do đó, theo khía cạnh khác sáng chế được dựa trên phát hiện bất ngờ là bằng cách thao tác lên axit amin cụ thể trong các biến thể tiền chất của peptit Ea IGF-1, một rào cản chính về kỹ thuật khác trong sự phát triển các biến thể tiền chất của IGF-1 trong điều trị có thể được khắc phục.

Các ví dụ cho các phân tử này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các polypeptit dưới đây:

Protein IGF-1 của người (SEQ ID No.: 1) trong đó axit amin G42 được xóa.

Protein IGF-1 của người (SEQ ID No.: 1) trong đó axit amin G42 được thay thế bằng axit amin serin.

Protein IGF-1 của người (SEQ ID No.: 1) trong đó axit amin G42 được thay thế bằng axit amin serin và trong đó (các) axit amin

- (a) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa; hoặc
- (b) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q); hoặc
- (c) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R37 được thay thế hoặc được xóa; hoặc
- (d) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E); hoặc
- (e) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R37 được thay thế bằng alanin; hoặc
- (f) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P); hoặc
- (g) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R36 và R37 được thay thế hoặc được xóa; hoặc
- (h) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q); hoặc
- (i) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và R37 được thay thế bằng alanin.

Protein IGF-1 của người (SEQ ID No.: 1) trong đó axit amin G42 được thay thế bằng axit amin serin và trong đó axit amin E3 được xóa và axit amin R37 được thay thế bằng alanin.

Protein IGF-1 của người (SEQ ID No.: 1) trong đó axit amin G42 được thay thế bằng axit amin serin và trong đó axit amin E3 được xóa và axit amin R37 được thay thế bằng alanin dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch, cụ thể là vùng Fc được cải biến, cụ thể là vùng Fc, được cải biến để điều biến sự gắn kết của nó với thụ thể Fc, như được mô tả sau đây.

Polypeptit khác theo sáng chế là protein IGF-1 của người có SEQ ID NO.: 117.

Polypeptit khác theo sáng chế là protein tiền chất của IGF-1 của người có SEQ ID NO.: 118.

Người ta đã phát hiện ra rằng đột biến hoặc xóa các axit amin R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 và/hoặc M105 trong các protein tiền

chất của peptit Ea IGF-1 có trước đó trong lĩnh vực kỹ thuật này được đề cập trước đó dẫn đến một hiệu suất cao hơn của protein không bị phân rã khi được biểu hiện bởi các tế bào động vật có vú. Các nhà khoa học còn khám phá ra rằng sự kết hợp của các đột biến/đột biến xóa ở vị trí R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 và/hoặc M105 nêu trên tạo ra tác động hiệp đồng. Do đó, theo một phương án trong protein tiền chất của IGF-1 cải biến theo sáng chế, R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 và/hoặc M105, được xóa hoặc được đột biến miễn là protein IGF-1 cải biến này chứa peptit Ea (SEQ ID NO.: 2). Theo một phương án, R74, R77 và/hoặc R104 được đột biến thành Q trong protein tiền chất của IGF-1 được bộc lộ ở đây. Theo một phương án khác, K68, S69, A70, R71 và/hoặc R72 ngoài ra có thể được xóa hoặc được đột biến trong các protein tiền chất của IGF-1 cải biến được bộc lộ ở đây.

Do đó, sáng chế đề xuất polypeptit chứa protein tiền chất của IGF-1 của người, có nghĩa là chứa peptit Ea từ IGF-1 của người, trong đó axit amin glyxin ở vị trí 42 được xóa hoặc được thay thế bằng một axit amin khác và trong đó việc đánh số các axit amin này tương ứng với SEQ ID NO.: 5. Peptit E có thể là peptit Ea, Eb, hoặc Ec (SEQ ID NOs: 2-4). Theo phương án cụ thể, axit amin glyxin ở vị trí 42 được xóa hoặc được thay thế bằng axit amin hoặc serin.

Theo một phương án, protein tiền chất của peptit Ea IGF-1 của người được mô tả trước đó được đột biến ở vị trí G42 như đã nêu (được xóa hoặc được đột biến thành serin) chứa sự xóa và/hoặc các đột biến bổ sung ở các axit amin G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69, A70, R71, S72, R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 và/hoặc M105, trong đó việc đánh số các axit amin này tương ứng với SEQ ID NO.: 5.

Các ví dụ về các phân tử này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các polypeptit dưới đây:

Polypeptit chứa protein tiền chất của peptit Ea IGF-1 của người trong đó axit amin G42 được thay thế bằng axit amin serin và trong đó (các) axit amin

(1) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin R71 và S72 được xóa.

- (2) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa.
- (3) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế hoặc được xóa và axit amin R71 và S72 được xóa.
- (4) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin R71 và S72 được xóa.
- (5) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin và axit amin R71 và S72 được xóa.
- (6) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin R71 và S72 được xóa.
- (7) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 được thay thế hoặc được xóa và axit amin R71 và S72 được xóa.
- (8) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa.
- (9) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q), R37 được thay thế bằng alanin và axit amin R71 và S72 được xóa.
- (10) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R77 được đột biến thành glutamin (Q).
- (11) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).
- (12) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và Q104 được đột biến thành glutamin (Q).
- (13) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).
- (14) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).
- (15) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

- (16) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R77 được đột biến thành glutamin (Q).
- (17) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).
- (18) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).
- (19) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin (A) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).
- (20) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin (A) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).
- (21) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin (A) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin
- (22) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).
- (23) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).
- (24) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin
- (25) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).
- (26) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).
- (27) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q), R37 được thay thế bằng alanin và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(28) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

(29) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q), R37 được thay thế bằng alanin và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

(1a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(2a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(3a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế hoặc được xóa và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(4a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(5a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(6a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(7a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 được thay thế hoặc được xóa và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(8a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(9a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q), R37 được thay thế bằng alanin và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(10a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(11a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(12a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và Q104 được đột biến thành glutamin (Q).

(13a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(14a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(15a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

(16a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(17a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(18a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

(19a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin (A) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(20a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin (A) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(21a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin (A) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin

(22a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(23a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(24a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin.

(25a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(26a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(27a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q), R37 được thay thế bằng alanin và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(28a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

(29a) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q), R37 được thay thế bằng alanin và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến các protein nêu trên chứa các polypeptit (1)-(29a), trong đó các phân tử này thay vì được đột biến ở các vị trí 1-3, chỉ axit amin E3 được xóa (ví dụ, phân tử (28a) cũng có thể dùng để chỉ polypeptit chứa

protein tiền chất của peptit Ea IGF-1 của người trong đó axit amin G42 được thay thế bằng axit amin serin và trong đó axit amin E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q), axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).)

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến polypeptit chứa protein tiền chất của IGF-1 của người, có nghĩa là chứa peptit Ea từ IGF-1 của người, được dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch và trong đó axit amin glyxin ở vị trí 42 được thay thế bằng một axit amin khác và trong đó việc đánh số các axit amin phần IGF-1 của protein này tương ứng với SEQ ID NO.: 5. Peptit E có thể là peptit Ea, Eb, hoặc Ec và axit amin được thay thế vào vị trí 42 là serin.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến polypeptit chứa protein tiền chất của IGF-1 của người; (a) trong đó axit amin G42 được xóa hoặc được thay thế bằng axit amin serin; và (b) axit amin này được liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch, cụ thể là vùng Fc được cải biến, cụ thể là vùng Fc, được cải biến để điều biến sự gắn kết của nó với thụ thể Fc. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin có thể được thay thế bằng một gốc axit amin khác sao cho vùng Fc có ái lực với thụ thể Fc hoặc thành phần C1 của con đường bổ thể bị biến đổi. Vùng Fc được gọi là các vùng Fc của globulin miễn dịch cam đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này: LALA và N297A (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20(6):685-691); và D265A (đã nêu trong tài liệu của Baudino et al., 2008, J. Immunol. 181: 6664-69; Strohl, W.). Ví dụ, kháng thể IgG1 có vùng Fc cam chứa đột biến được gọi là LALA gồm đột biến L234A và L235A trong trình tự axit amin Fc IgG1. Một ví dụ khác là kháng thể IgG1 cam chứa đột biến D265A. Một ví dụ khác là kháng thể IgG1 cam chứa đột biến N297A, tạo ra các kháng thể aglycosyl hóa/không glycosyl hóa.

Vấn đề về LALA nêu trên được mô tả chi tiết hơn trong bằng sáng chế Mỹ số US5,624,821 và US5,648,260 đều của tác giả Winter et al. Do đó, Theo một phương án protein tiền chất của IGF-1 của người được bộc lộ ở đây được dung hợp với vùng Fc chứa đột biến L234A và L235A hoặc đột biến D265A hoặc đột biến N297A. Các cấu trúc Fc LALA, D265A hoặc N297A này làm giảm hoạt tính ADCC.

Theo một phương án, polypeptit này chứa protein tiền chất của peptit Ea IGF-1 của người dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch, trong đó axit amin glyxin ở vị

trí 42 được thay thế bằng axit amin serin, chứa sự xóa và/hoặc các đột biến bổ sung ở các axit amin G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69, A70, R71, S72, R74, R77 và/hoặc R104.

Các ví dụ về các phân tử này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các polypeptit dưới đây:

Polypeptit chứa protein tiền chất của peptit Ea IGF-1 của người dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch trong đó axit amin glyxin ở vị trí 42 được thay thế bằng axit amin serin, trong đó việc đánh số các axit amin phần IGF-1 của protein đã nêu tương ứng với SEQ ID NO.: 5 và trong đó (các) axit amin:

(1b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin R71 và S72 được xóa.

(2b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa.

(3b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế hoặc được xóa và axit amin R71 và S72 được xóa.

(4b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin R71 và S72 được xóa.

(5b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin và axit amin R71 và S72 được xóa.

(6b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin R71 và S72 được xóa.

(7b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 được thay thế hoặc được xóa và axit amin R71 và S72 được xóa.

(8b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa.

(9b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q), R37 được thay thế bằng alanin và axit amin R71 và S72 được xóa.

(10b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(11b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(12b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và Q104 được đột biến thành glutamin (Q).

(13b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(14b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(15b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

(16b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(17b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(18b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

(19b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin (A) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(20b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin (A) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(21b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin (A) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

(22b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(23b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(24b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

(25b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(26b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(27b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q), R37 được thay thế bằng alanin và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(28b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

(29b) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q), R37 được thay thế bằng alanin và axit amin R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

(1c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(2c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(3c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế hoặc được xóa và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(4c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(5c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(6c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(7c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 được thay thế hoặc được xóa và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(8c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(9c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q), R37 được thay thế bằng alanin và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa.

(10c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(11c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(12c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế hoặc được xóa và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và Q104 được đột biến thành glutamin (Q).

(13c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(14c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(15c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

(16c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(17c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(18c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng axit glutamic (E) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột

biến thành glutamin (Q). (19c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin (A) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(20c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin (A) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(21c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng alanin (A) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin

(22c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(23c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(24c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R37 được thay thế bằng prolin (P) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

(25c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 được đột biến thành glutamin (Q).

(26c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

27c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q), R37 được thay thế bằng alanin và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74 và R77 được đột biến thành glutamin (Q).

(28c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

(29c) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bằng glutamin (Q), R37 được thay thế bằng alanin và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).

Theo một phương án khác sáng chế đề cập đến các protein được mô tả trên đây chứa polypeptit (1b)-(29c) nêu trên, trong đó các phân tử này thay vì được đột biến ở các vị trí 1-3, chỉ axit amin E3 được xóa (ví dụ, phân tử (28c) này cũng có thể đề cập đến polypeptit tạo thành protein tiền chất của IGF-1 của người được dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch trong đó axit amin G42 được thay thế bằng axit amin serin và trong đó axit amin E3 được xóa, axit amin R36 và R37 cùng được thay thế bằng glutamin (Q) và axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 được xóa và axit amin R74, R77 và R104 được đột biến thành glutamin (Q).)

Theo một phương án khác sáng chế đề cập đến polypeptit nêu trên (ví dụ, các polypeptit 1-29c), chứa peptit E được đột biến bao gồm axit amin:

- a) VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASG (SEQ ID. NO.: 25), hoặc
- b) VQAQQHTDMPKTQKYQPPATNKNTKSQRRKGS (SEQ ID. NO.: 26).
- c) VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGNKNYQM (SEQ NO: 115)

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất protein tiền chất của IGF-1 được mô tả trước đó được dung hợp với vùng Fc, trong đó vùng Fc có thể được dung hợp trực tiếp với tiền polypeptit IGF-1 cải biến hoặc có thể được nối với vùng bản lề bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nếu ADN vùng bản lề được sử dụng, vùng Fc có thể được nối với phần bất kỳ của polypeptit tiền chất của IGF-1 cải biến này. Theo một phương án, vùng Fc được dung hợp trực tiếp với đầu C của polypeptit tiền chất của IGF-1 cải biến. Theo phương án khác, vùng Fc được nối với đầu C của polypeptit tiền chất của IGF-1 cải biến bằng phần tử nối Gly Ser (-GS-).

Phần tử nối ADN có thể được dùng để tạo ra vị trí giới hạn giữa các thành phần để dễ dàng thao tác. Phần tử nối cũng có thể được đề xuất để tăng cường sự biểu hiện của polypeptit này trong tế bào vật chủ, để làm giảm trở ngại về cấu trúc lập thể (steric hindrance) sao cho thành phần này có thể suy đoán cấu trúc bậc ba hoặc bậc bốn tối ưu của nó và/hoặc tương tác thích hợp với phân tử đích của nó. Về các phần tử nối và

phương pháp xác định các vùng đệm mong muốn, xem, ví dụ, George et al. (2003) Protein Engineering 15:871-879.

Trình tự của phân tử nối có thể chứa một hoặc nhiều axit amin vốn dĩ liên kết với thành phần thụ thể, hoặc có thể có một trình tự được thêm vào dùng để tăng cường sự biểu hiện của protein dung hợp này, tạo ra các vị trí quan tâm đặc biệt được mong muốn, cho phép thành phần các miền chứa thành phần tạo thành các cấu trúc bậc ba tối ưu và/hoặc để tăng cường sự tương tác của một thành phần với phân tử đích của nó. Theo một phương án, phân tử nối này chứa một hoặc nhiều trình tự peptit có độ dài trong khoảng 1-100 axit amin, tốt hơn là 1-25 axit amin. Theo một phương án, phân tử nối này có độ dài là 1-5 axit amin. Theo một phương án, phân tử nối này là trình tự ba axit amin; cụ thể hơn, trình tự ba axit amin này là Gly Pro Gly. Theo phương án khác, phân tử nối này là Gly Ser.

Các ví dụ của các phân tử bản lề này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polypeptit dưới đây:

bản lề 1: CPPCPA (SEQ ID NO.: 22)

bản lề 2: DKTHTCPPCPA (SEQ ID NO.: 23)

bản lề 3: EPKSCDKTHTCPPCPA (SEQ ID NO.: 24)

Do đó, sáng chế đề cập đến polypeptit chứa protein tiền chất của peptit Ea IGF-1 của người được dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch, cụ thể là vùng Fc được cải biến, cụ thể là vùng Fc, được cải biến để điều biến sự gắn kết của nó với thụ thể Fc, tốt hơn là được cải biến bằng cách thay thế một hoặc cả hai axit amin 234 và 235 bằng alanin như đã nêu, trong đó axit amin glyxin ở vị trí 42 được thay thế bằng serin, trong đó việc đánh số các axit amin này tương ứng với SEQ ID NO.: 5 và trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch này được dung hợp với protein tiền chất của IGF-1 thông qua vùng bản lề.

Các ví dụ về các phân tử này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polypeptit dưới đây:

hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E (SEQ ID NO.:8)

hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (SEQ ID NO.:9)

hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C (SEQ ID NO.:10)

hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F (SEQ ID NO.:11)

hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (SEQ ID NO.:12)

hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A (SEQ ID NO.:13)

hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F (SEQ ID NO.:14)

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, axit amin R71 và S72 của protein tiền chất của IGF-1 nêu trên có thể được đột biến như sau:

- (1) Xóa một hoặc cả R71 và S72, và/hoặc
- (2) Đột biến một hoặc cả R71 và S72 thành axit amin không phải axit amin có tính bazơ, như là alanin, và/hoặc
- (3) Đột biến chèn một hoặc nhiều axit amin không phải axit amin có tính bazơ giữa R71 và S72, và/hoặc
- (4) Đặt vị trí glycosyl hóa gần R71 và S72 có tác dụng che vị trí của proteaza, và/hoặc
- (5) Peg hóa điểm định hướng bằng cách sử dụng sự thay thế R71 hoặc S72, hoặc đột biến chèn gần hoặc giữa R71 và S72, bằng axit amin không phải axit amin tự nhiên.

Các phương pháp để cải biến protein như phương pháp tạo đột biến điểm định hướng, việc đưa vào các vị trí glycosyl hóa hoặc peg hóa điểm định hướng được biết rõ bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án, vùng Fc được cải biến để điều biến sự gắn kết của nó với thụ thể Fc. Theo một phương án, vùng Fc được cải biến để giảm ái lực của nó với thụ thể Fc. Theo một phương án, vùng Fc được cải biến để giảm hoạt tính ADCC. Theo một phương án, vùng Fc được cải biến ngăn cản hoạt tính ADCC.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit chứa SEQ ID NO.: 8 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E). Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit chứa SEQ ID NO.: 9 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A). Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit chứa SEQ ID NO.:10 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C). Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit chứa SEQ ID NO.: 11 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit chứa SEQ ID NO.:12 (hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit chứa SEQ ID NO.:13 (hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit chứa SEQ ID NO.:14 (hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit gồm các SEQ ID NO.:8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc 14.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99% với SEQ ID NO.: 8.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99% với SEQ ID NO.: 9.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99% với SEQ ID NO.: 10.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99% với SEQ ID NO.: 11.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99% với SEQ ID NO.: 12.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99% với SEQ ID NO.: 13.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99% với SEQ ID NO.:14.

Theo một phương án, các polypeptit theo sáng chế được glycosyl hóa.

Đột biến axit amin

Như được đề cập ở trên, nhiều axit amin có thể được đột biến thành axit amin khác. Thông thường là axit amin được thay thế bằng gốc alanin. Tuy nhiên, axit amin khác có thể được sử dụng, chẳng hạn như axit amin không phải axit amin tự nhiên hoặc axit amin tự nhiên từ nhóm khác (có nghĩa là nhóm phân cực, nhóm có tính axit, nhóm có tính bazơ hoặc nhóm không phân cực). Các phương pháp để đưa đột biến vào axit amin của protein được biết rõ bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (1994); T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Các phương pháp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự khuếch đại ADN mã hóa cho biến thể polypeptit hoạt động về mặt chức năng hoặc các mảnh của nó bằng phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR) thực hiện bằng các môi gây đột biến và lắp ráp các mảnh này bằng PCR ghép nối nếu cần thiết hoặc đưa vào các đột biến bằng cách sử dụng các kit thương mại sẵn có như là "QuikChange.TM. Site-Directed Mutagenesis Kit" (hãng Stratagene). Xem, ví dụ, Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (1994); T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Hơn nữa, các trình tự đột biến có thể thu được bằng cách tổng hợp gen nhân tạo là một dịch vụ được cung cấp bởi các công ty thương mại (ví dụ, Geneart, Life Technology). Sự tạo thành của các biến thể hoặc dẫn xuất của polypeptit hoạt động về mặt chức năng từ polypeptit bằng cách thay thế axit amin mà không làm ảnh hưởng chức năng của polypeptit có thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các vùng Fc của globulin miễn dịch

Theo một phương án, vùng Fc là từ IgG, IgM hoặc IgA. Theo một phương án vùng Fc có nguồn gốc từ IgG. Miền Fc của IgG này có thể được chọn từ các isotyp

IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, cũng như allotyp bất kỳ bên trong mỗi nhóm isotyp. Theo một phương án vùng Fc này là vùng Fc của người.

Vùng Fc có thể được biến đổi bằng cách thay thế ít nhất một gốc axit amin bằng một gốc axit amin khác để biến đổi các chức năng đáp ứng của vùng Fc. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin có thể được thay thế bằng một gốc axit amin khác sao cho vùng Fc này có ái lực với thụ thể Fc hoặc thành phần C1 của con đường bổ thể biến đổi. Vấn đề này được mô tả chi tiết hơn trong bằng sáng chế Mỹ số US5,624,821 và US5,648,260, đều của tác giả Winter et al. Trong trường hợp cụ thể, các gốc 234 và 235 có thể bị đột biến. Trong trường hợp cụ thể, các đột biến này có thể là thành alanin. Do đó theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có đột biến trong vùng Fc ở một hoặc cả hai axit amin 234 và 235. Theo phương án khác, một hoặc cả hai axit amin 234 và 235 có thể được thay thế bằng alanin. Ví dụ như một biến thể Fc trong đó các 234 và 235 được thay thế bằng alanin thường được dùng để chỉ đột biến “LALA”. Các cấu trúc Fc LALA này giảm hoạt tính ADCC. Theo một phương án, protein tiền chất của IGF-1 được nối với Fc LALA của IgG1.

Liên kết

“Được dung hợp với” hoặc “được nối với” như được dùng ở đây trong phạm vi theo sáng chế được dung hợp với/được nối với vùng Fc của globulin miễn dịch, có thể có nghĩa là kết hợp hai polypeptit không tự nhiên xuất hiện trong cùng một polypeptit.

Vùng Fc của globulin miễn dịch có thể được dung hợp trực tiếp với polypeptit IGF-1 cải biến hoặc có thể được nối bằng phần tử nối bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nếu phần tử nối ADN được sử dụng, vùng Fc có thể được nối với phần bất kỳ của polypeptit IGF-1 cải biến. Theo một phương án vùng Fc được dung hợp trực tiếp với đầu C của polypeptit IGF-1 cải biến. Theo phương án khác, vùng Fc được nối với đầu C polypeptit IGF-1 cải biến bằng phần tử nối Gly Ser (-GS-) và/hoặc vùng bản lề (SEQ ID NO.: 22 đến 24) với, như là hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E (SEQ ID NO.: 8), hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (SEQ ID NO.: 9), hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C (SEQ ID NO.: 10), hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F (SEQ ID NO.: 11), hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (SEQ ID NO.: 12), hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A (SEQ ID NO.: 13) hoặc hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F (SEQ ID NO.:14).

Phần tử nối ADN có thể được dùng để cung cấp vị trí giới hạn giữa các thành phần để dễ dàng thao tác. Phần tử nối có thể cũng được đề xuất để tăng cường sự biểu hiện của polypeptit này trong tế bào chủ, để giảm sự cản trở cấu hình lập thể sao cho thành phần này có thể dự đoán cấu trúc bậc ba và/hoặc bậc bốn tối ưu của nó và/hoặc tương tác các thích hợp với phân tử đích của nó. Với các phần tử nối và các phương pháp để xác định các vùng đệm có thể được mong muốn, xem, ví dụ, George et al. (2003) Protein Engineering 15:871-879.

Trình tự của phần tử nối có thể bao gồm một hoặc nhiều axit amin vốn liên kết được với thành phần thụ thể, hoặc có thể một trình tự được thêm vào dùng để tăng cường sự biểu hiện của protein dung hợp này, cung cấp các vị trí quan tâm đặc biệt được mong muốn, cho phép các thành phần cuộn gập nên các cấu trúc bậc ba tối ưu và/hoặc để tăng cường sự tương tác của thành phần với phân tử đích của nó.

Theo một phương án, phần tử nối này chứa một hoặc nhiều trình tự peptit có độ dài trong khoảng 1-100 axit amin, tốt hơn là trong khoảng 1-25. Theo một phương án, phần tử nối này có độ dài trong khoảng 1-5 axit amin. Theo một phương án, phần tử nối này là một trình tự ba axit amin; cụ thể hơn, trình tự ba axit amin này là Gly Pro Gly. Theo phương án khác, phần tử nối này là Gly Ser.

Axit nucleic

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho polypeptit theo sáng chế. Các trình tự axit nucleic được ưu tiên là các trình tự mã hóa hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E, hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A, hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C, hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F, hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E, hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A hoặc hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F (SEQ ID NO.: 15-21).

Các phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể ở dạng ARN, như là mARN, hoặc ở dạng ADN, bao gồm, ví dụ, cADN hoặc ADN tổng hợp. Các phân tử axit nucleic này có thể là mạch đôi hoặc mạch đơn. ADN mạch đơn có thể là mạch mang mã còn được gọi là mạch có nghĩa, hoặc nó có thể là mạch không mang mã, còn dùng để chỉ mạch đối nghĩa.

Sự thoái hóa của mã di truyền đã được biết rõ. Do đó hai hoặc nhiều trình tự axit nucleic có thể mã hóa cho cùng một trình tự polypeptit. Các trình tự axit nucleic biến thể

này được bao gồm trong phạm vi của đơn sáng chế. Trên thực tế, tốt hơn là có thể tạo ra các cải biến bảo toàn trình tự axit nucleic để cải thiện sự biểu hiện của polypeptit theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất vector chứa axit nucleic theo sáng chế. Vector này có thể là vector tách dòng hoặc vector biểu hiện. Theo một phương án, axit nucleic này có thể được bao gồm bên trong vector biểu hiện mang các yếu tố cần thiết cho sự biểu hiện có hiệu quả được biết rõ bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các yếu tố bao gồm, ví dụ, promoter, như là, ví dụ, promoter- yếu tố tăng cường Cytomegalovirus (CMV), trình tự tín hiệu cho quá trình tiết, như là trình tự có trong tự nhiên hoặc trình tự bất kỳ đã biết khác để tạo điều kiện cho quá trình tiết, tín hiệu gắn đuôi polyadenin và yếu tố kết thúc phiên mã, ví dụ, có nguồn gốc từ gen hormon sinh trưởng của bò (Bovine Growth Hormone - BGH), yếu tố cho phép sự tái bản episom và sự tái bản ở sinh vật nhân sơ (ví dụ, tâm tái bản SV40 và ColE1 hoặc các tâm tái bản khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này) và các yếu tố cho phép sự chọn lọc, như là gen kháng ampicillin và chỉ thị zeoxin hoặc hygromycin.

Theo một phương án sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic đã phân lập chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm:

- a) trình tự polynucleotit được trong SEQ ID NO.: 15 hoặc trình tự bổ sung của nó;
- b) trình tự polynucleotit chứa trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% so với toàn bộ trình tự được trong SEQ ID NO.: 15;
- c) trình tự polynucleotit được trong SEQ ID NO.: 16 hoặc trình tự bổ sung của nó;
- d) trình tự polynucleotit chứa trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% so với toàn bộ trình tự được trong SEQ ID NO.: 16;
- e) trình tự polynucleotit được trong SEQ ID NO.: 17 hoặc trình tự bổ sung của nó;
- f) trình tự polynucleotit chứa trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% so với toàn bộ trình tự được trong SEQ ID NO.: 17;

- g) trình tự polynucleotit được trong SEQ ID NO.: 18 hoặc trình tự bổ sung của nó;
- h) trình tự polynucleotit chứa trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% so với toàn bộ trình tự được trong SEQ ID NO.: 18;
- i) trình tự polynucleotit được trong SEQ ID NO.: 19 hoặc trình tự bổ sung của nó;
- j) trình tự polynucleotit chứa trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% so với toàn bộ trình tự được trong SEQ ID NO.: 19;
- k) trình tự polynucleotit được trong SEQ ID NO.: 20 hoặc trình tự bổ sung của nó;
- l) trình tự polynucleotit chứa trình tự có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ đồng nhất trình tự với toàn bộ trình tự được trong SEQ ID NO.: 20;
- m) trình tự polynucleotit được trong SEQ ID NO.: 21 hoặc trình tự bổ sung của nó;
- n) trình tự polynucleotit chứa trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% so với toàn bộ trình tự được trong SEQ ID NO.: 21.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến các polypeptit biến thể của IGF-1 nêu trên, trong đó protein tiền chất của IGF-1 của người đã nêu được peg hóa. Sự peg hóa này cụ thể là được ưu tiên cho protein tiền chất của IGF-1 không được dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch của IgG của người. Sự tiếp hợp với poly(etylen glycol) (PEG; sự peg hóa) được chứng minh là hữu ích để kéo dài thời gian bán hủy của các thuốc điều trị chứa protein. Người ta dự đoán rằng sự peg hóa của các polypeptit tiền chất của IGF theo sáng chế có thể tạo ra các lợi ích tương tự trong dược phẩm. Các phương pháp peg hóa IGF-1 đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, công bố đơn sáng chế Mỹ số 2006/0154865, mô tả các tính chất hữu ích của IGF-1 được peg hóa một lần ở lysin. Phân tử được peg hóa một lần ở lysin này có thể được lắp ráp thành các polypeptit tiền chất của IGF theo sáng chế. Ngoài ra, sự peg hóa này có thể được thực hiện trên phần bất kỳ của polypeptit theo sáng chế bằng sự đưa vào axit amin không phải axit amin tự nhiên. Các axit amin không phải axit amin tự nhiên có thể được

đưa vào bằng kỹ thuật được mô tả trong tài liệu của Deiters et al., J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003; Wang and Schultz, Science 301:964-967, 2003; Wang et al., Science 292:498-500, 2001; Zhang et al., Science 303:371-373, 2004 hoặc trong bằng sáng chế Mỹ số 7,083,970. Một cách ngắn gọn, một số hệ thống biểu hiện bao gồm tạo đột biến điểm định hướng tạo ra codon vô nghĩa, chẳng hạn như codon amber TAG, vào trong khung đọc mở mã hóa cho polypeptit theo sáng chế. Các vector biểu hiện này sau đó được đưa vào trong vật chủ mà có thể sử dụng tARN đặc hiệu với codon vô nghĩa được đưa vào này và thay bằng axit amin không phải axit amin tự nhiên đã chọn. Axit amin không phải axit amin tự nhiên cụ thể là hữu ích cho mục đích tiếp hợp các gốc với các polypeptit theo sáng chế bao gồm các polypeptit theo sáng chế với acetylen và các chuỗi bên azido. Các polypeptit phân tử tiền chất của IGF chứa các axit amin mới này sau đó có thể được peg hóa ở các vị trí đã chọn trước trong protein này. Ngoài ra, các phân tử IGF đã peg hóa không chứa peptit E này cũng hữu dụng để làm chất điều trị bệnh.

Sản xuất biến thể IGF-1 theo sáng chế ở tế bào động vật có vú

Điều chế IGF-1 tự nhiên của người trong các hệ thống biểu hiện sinh vật nhân sơ được biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Biểu hiện trong các tế bào nhân thực, cụ thể là các tế bào chủ là động vật có vú, đôi lúc là được ưu tiên hơn bởi vì các tế bào nhân thực này có nhiều khả năng hơn các tế bào nhân sơ trong việc lắp ráp và tiết ra protein cuộn gấp chính xác và có hoạt tính miễn dịch.

Các tế bào động vật có vú để biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm tế bào buồng trứng của chuột Hamster Trung Quốc (tế bào CHO) (bao gồm, tế bào CHO-dhfr, được mô tả trong tài liệu của Urlaub và Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 sử dụng với chỉ thị chọn lọc DH FR, ví dụ, như được mô tả trong tài liệu của R.J. Kaufman và P.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621), tế bào HEK293 (dòng tế bào từ 293 tế bào thận gốc phôi của người), tế bào NSO- tế bào u tủy của chuột, tế bào COS và tế bào SP2. Các tế bào chủ được ưu tiên là tế bào biến thể CHO K1. Tuy nhiên, sự biểu hiện của IGF-1 trong dòng tế bào CHO dẫn đến sự ức chế sinh trưởng tế bào và hàm lượng protein IGF-1 thấp (xem các fig. 11/12). Sự làm giảm biểu hiện/làm bất hoạt IGF-1-R ổn định trong tế bào CHO bằng cách sử dụng kỹ thuật “nucleaza ngón tay kềm” tạo ra sự cải thiện sinh trưởng tế bào và hàm lượng protein

IGF-1 cao hơn (các Fig. 14, 15, 16). Tế bào CHO với sự biểu hiện IGF-1-R giảm (si/shARN làm giảm biểu hiện) chuyển nhiễm bền các plasmit mã hóa IGF-1 đã tạo ra hàm lượng tích lũy cao gấp khoảng 5 lần so với các tế bào CHO kiểu đại chuyển nhiễm bền. Thậm chí hàm lượng tích lũy cao hơn có thể được đo sau khi sự chuyển nhiễm bền của dòng tế bào làm bất hoạt IGF-1-R. Sự tăng hàm lượng của IGF-1 tái tổ hợp gấp 5-20 lần có thể được phát hiện so sánh với dòng tế bào CHO kiểu đại. Tóm lại, những số liệu này chứng minh rằng sự làm giảm biểu hiện hoặc làm bất hoạt gen thụ thể IGF-1 trong dòng tế bào động vật có vú có thể cải thiện đáng kể việc sản xuất IGF-1 và các biến thể của nó.

Vì thế, phương pháp thích hợp để sản xuất IGF-1 tái tổ hợp hoặc các biến thể của nó trong tế bào động vật có vú, ví dụ, tế bào CHO, trong đó tế bào động vật có vú đã nêu sẽ bị làm suy giảm sự biểu hiện về mặt chức năng thụ thể của yếu tố sinh trưởng tương tự Insulin 1 (IGF-1R) bao gồm các bước sau đây:

- a. Sản xuất tế bào động vật có vú sẽ bị làm suy giảm sự biểu hiện về mặt chức năng thụ thể của yếu tố sinh trưởng tương tự Insulin 1;
- b. Biến nạp vector biểu hiện chứa phân tử axit nucleic mã hóa IGF-1 hoặc biến thể của nó vào tế bào ở bước a.;
- c. Chọn lọc tế bào đã biến nạp ở bước b.;
- d. Nuôi cấy tế bào được chọn lọc ở bước c. trong điều kiện cho phép sự biểu hiện của IGF-1 hoặc biến thể của nó; và
- e. Thu IGF-1 hoặc biến thể của nó từ tế bào động vật có vú được nuôi cấy trong bước d.,

trong đó ngoài thứ tự từ bước a. và b., có thể được đảo trật tự hoặc thực hiện cả hai bước này cùng lúc.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết làm thế nào để biến nạp, chọn lọc và nuôi cấy các tế bào động vật có vú đã được cải biến về mặt di truyền, ví dụ, tế bào CHO, như tế bào biến thể CHO-K1, tế bào biến thể CHO-DUXB11 hoặc tế bào CHO-DG44. Các bước tiến hành quy trình chọn lọc thông thường được dùng để tạo thuận lợi cho việc chọn lọc tế bào mà có vẻ như đã được cài ADN tái tổ hợp mã hóa protein điều trị mong muốn, như yếu tố sinh trưởng, ví dụ, IGF-1. Tính

kháng kháng sinh hoặc khả năng sinh trưởng trong môi trường chọn lọc về dinh dưỡng có được nhờ gen được cài đồng thời vào trong vector biến nạp được sử dụng cách thông thường. (xem Weber, W. và Fussenegger, M. (2003)) Inducible gene expression in mammalian cells, in Gene transfer and expression in mammalian cells, (Makrides, S.C., Ed.), Elsevier: Amsterdam, pp. 589-604.) (Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector: Niwa Hitoshi, Yamamura Ken-ichi, Miyazaki Jun-ichi). Hai hệ thống biểu hiện CHO phổ biến nhất để sản xuất protein tái tổ hợp sử dụng sự chọn lọc methotrexat (MTX) dựa vào dihydroforlat reductaza (DHFR) hoặc sự chọn lọc methionin sulfoximin (MSX) dựa vào glutamin synthetaza (GS) (Rita Costa A, Elisa Rodrigues M, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Eur J Pharm Biopharm. 2010 Feb; 74(2):127-38. Epub 2009 Oct 22. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production).

Vector đặc biệt thích hợp để tạo ra polypeptit trong tế bào động vật có vú, cụ thể là các tế bào động vật gặm nhấm như là CHO và tế bào khiếm khuyết gen DHFR đã được bộc lộ trong các công bố đơn sáng chế quốc tế số WO09080720A. Đây là một số phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để đưa vector biểu hiện vào trong tế bào chủ động vật có vú. Các phương pháp tương ứng bao gồm nhưng không giới hạn ở phương pháp chuyển nhiễm canxi phosphat, xung điện, chuyển nhiễm hạt mỡ (lipofection), chuyển gen qua trung gian biolistic và polyme. Các tế bào chủ thích hợp đã được mô tả trước đó. Sau khi đưa vector biểu hiện axit nucleic trong trong tế bào chủ, các thể biến nạp thu được được nuôi cấy trong điều kiện chọn lọc thích hợp để thử nghiệm sự biểu hiện của gen có chứa chỉ thị chọn lọc tế bào động vật có vú được bộc lộ trong cassette biểu hiện (MSM). Điều này có nghĩa là, ví dụ, khi gen chỉ thị chọn lọc động vật có vú là gen kháng kháng sinh, các thể biến nạp được nuôi cấy trong môi trường chứa kháng sinh tương ứng hoạt động trong tế bào động vật có vú và các thể biến nạp sống sót trong các điều kiện này được chọn, như vậy cho phép thu được các thể biến nạp biểu hiện gen chỉ thị và như vậy gen này đã được kết hợp vào vector này. Ngoài ra, bước chọn lọc thứ hai có thể được thực hiện bằng cách nuôi cấy các thể biến nạp nêu trên trong môi trường chọn lọc thích hợp để chọn lọc gen chỉ thị có khả năng chọn lọc và có khả năng khuếch đại chứa trong cassette biểu hiện (MASM). Ví dụ, trong trường hợp DHFR được sử dụng làm gen chỉ thị có khả năng chọn lọc và có khả năng khuếch đại, các thể biến nạp có thể được nuôi cấy trong môi trường không chứa nucleotit hoặc

không chứa purin trong sự có mặt của chất ức DHFR. Trong trường hợp promotor cảm ứng được sử dụng trong ít nhất một cassette biểu hiện, tín hiệu của sự cảm ứng tương ứng nên được tạo ra để bắt đầu sự biểu hiện của polypeptit này. Để sử dụng hệ thống chọn lọc/khuếch đại DHFR, tế bào chủ đã nêu có thể được nuôi cấy trong sự có mặt của chất ức chế DHFR. Các chất ức chế DHFR thích hợp là chất kháng axit folic chẳng hạn như là, ví dụ, MTX. Nồng độ chất kháng axit folic/MTX sử dụng phụ thuộc vào tế bào chủ và biến thể DHFR được kết hợp trong vector này. Khoảng nồng độ có thể được chọn cho các quy trình khuếch đại nhiều bước trong các tế bào chủ DHFR, ví dụ, ở các giá trị trong khoảng 5nM - 20nM đến khoảng giá trị 500nM đến 1000nM hoặc thậm chí cao hơn với bước khuếch đại thứ hai hoặc các bước khuếch đại tiếp sau. Với các tế bào DHFR+ nồng độ ban đầu thường là cao hơn trong khoảng từ 100nM đến 750nM, tốt hơn là 500nM trong bước thứ nhất và 500nM đến 1000nM và cao hơn trong các bước khuếch đại tiếp theo. Các biến thể DHFR thích hợp đã được mô tả ở trên.

Để sử dụng hệ thống chọn lọc/khuếch đại GS các tế bào chủ đã nêu có thể được nuôi cấy trong sự có mặt của, ví dụ, MSX. Nồng độ MSX sử dụng phụ thuộc vào tế bào chủ nêu trên. Khoảng nồng độ có thể được chọn trong khoảng từ 15 μ M đến 150 μ M, 20 μ M đến 100 μ M và 25 μ M đến 50 μ M. Các khoảng giá trị này cụ thể là thích hợp với tế bào NSO và tế bào CHO.

Dược phẩm

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, chứa một hoặc một tổ hợp của các biến thể IGF-1 đã nêu, được bào chế cùng với chất mang dược dụng. Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong liệu pháp kết hợp, có nghĩa là được kết hợp với các chất điều trị khác. Ví dụ, biến thể IGF-1 theo sáng chế có thể được kết hợp với ít nhất một chất làm tăng khối lượng/sức mạnh của cơ, ví dụ, kháng thể kháng ActRIIB, IGF-2 hoặc các biến thể của IGF-2, kháng thể kháng myostatin, tiền peptit myostatin, protein giả myostatin gắn kết với ActRIIB nhưng không hoạt hóa nó, chất chủ vận beta 2 chất chủ vận, chất chủ vận Ghrelin, chất chủ vận/chất bắt chước SARM, GH hoặc follistatin. Ví dụ về chất điều trị có thể được sử dụng trong liệu pháp kết hợp dưới đây được mô tả chi tiết hơn trong phần về sử dụng biến thể IGF-1 theo sáng chế.

Thuật ngữ "dược dụng" có nghĩa là đã được phê chuẩn bởi cơ quan quản lý Liên bang hoặc chính phủ liên bang hoặc được liệt kê trong dược điển Hoa Kỳ hoặc các dược điển thông dụng được công nhận khác để dùng trong động vật, và cụ thể hơn là ở người. Thuật ngữ "chất mang" dùng để chỉ chất pha loãng, chất trợ, tá dược, hoặc chất dẫn thuốc mà với những chất mang này liệu pháp điều trị được áp dụng. Các chất mang dùng trong ngành dược này có thể là chất lỏng vô trùng, như là nước và dầu, bao gồm dầu mỡ, dầu động vật, dầu thực vật, hoặc dầu có nguồn gốc tổng hợp nhân tạo, như là dầu lạc, dầu đậu nành, dầu khoáng, dầu mè và tương tự. Tá dược thích hợp bao gồm tinh, glucoza, lactoza, sucroza, gelatin, mạch nha, gạo, bột mỳ, đá phấn, silicagel, natri stearat, glyxerol monostearat, bột talc, natri clorua, sữa bột gầy, glyxerol, propylen, glycol, nước, etanol và tương tự. Chế phẩm này, nếu được mong muốn, cũng có thể chứa lượng nhỏ chất thấm ướt goặc chất tạo nhũ tương, hoặc chất đệm pH. Các chế phẩm này có thể ở dạng dung dịch, huyền phù, nhũ tương, viên nén dài, viên nén tròn, viên con nhộng, dạng bột, chế phẩm giải phóng chậm và tương tự. Chế phẩm này có thể được bào chế ở dạng thuốc đạn, với chất kết dính và chất mang truyền thống như là triglyxerit. Chế phẩm dạng uống có thể chứa các chất mang tiêu chuẩn như là manitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, natri sacarin, xenluloza, magie cacbonat, v.v, loại dùng trong ngành dược. Ví dụ về chất mang dùng trong ngành dược thích hợp được mô tả trong "Remington's Pharmaceutical Sciences" bởi E. W. Martin.

Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm này được bào chế theo các quy trình thông thường làm dược phẩm phù hợp để sử dụng cho tiêm tĩnh mạch cho con người. Nếu cần thiết, chế phẩm này cũng có thể chứa chất hòa tan và thuốc gây mê cục bộ như là lidocain để làm giảm đau ở vị trí tiêm. Nếu chế phẩm này được dùng theo đường truyền, chế phẩm này có thể được phân tán bằng chai truyền chứa nước vô trùng hoặc nước muối loại dùng trong dược phẩm. Nếu chế phẩm này được dùng theo đường tiêm, ống ampun chứa nước vô trùng cho tiêm hoặc nước muối có thể được đề xuất sao cho các thành phần này có thể được trộn trước khi dùng.

Chất mang dược dụng bao gồm bất kỳ và mọi dung môi, môi trường phân tán, chất phủ, chất kháng khuẩn và chất kháng nấm, chất đẳng trương và chất trì hoãn hấp thu, và tương tự tương hợp về mặt sinh lý động. Chất mang này nên thích hợp để dùng cho tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm dưới da, đường ngoài tiêu hóa, tủy sống hoặc biểu bì

(ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền). Tùy thuộc vào đường dùng, hoạt chất, có nghĩa là kháng thể, phân tử miễn dịch tiếp hợp, hoặc phân tử có hai vị trí đặc hiệu, có thể được phủ trong vật liệu để bảo vệ hợp chất này khỏi sự tác động của axit và các điều kiện tự nhiên khác mà có thể gây bất hoạt hợp chất này.

Dược phẩm theo sáng chế cũng chứa chất chống oxi hóa được dụng. Ví dụ về chất chống oxi hóa được dụng bao gồm: chất chống oxi hóa tan trong nước, như là axit ascorbic, xystein hydroclorua, natri bisulfat, natri metabisulfite, natri sulfit và tương tự; chất chống oxi hóa tan trong dầu, như là ascorbyl palmitat, hydroxylanisol được butyl hóa (BHA), hydroxytoluen được butyl hóa (BHT), lexithin, propyl galat, anphatocopherol, và tương tự; và chất tạo chelat kim loại, như là axit xitric, axit etylendiamin tetraacetic (EDTA), sorbitol, axit tartaric, axit phosphoric, và tương tự.

Ví dụ về chất mang chứa nước và chất mang không chứa nước thích hợp có thể được sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế bao gồm nước, etanol, polyol (như là glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol, và tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng, dầu thực vật, như là dầu oliu, và este hữu cơ dùng cho tiêm, như là etyl oleat. Trạng thái lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng chất bao phủ, như là lexithin, bằng cách duy trì kích thước hạt yêu cầu trong trường hợp thể phân tán, và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt.

Các chế phẩm này cũng có thể chứa chất trợ như là chất bảo quản, chất thẩm ướt, chất tạo nhũ tương và chất phân tán. Việc phòng ngừa sự có mặt của vi sinh vật có thể được đảm bảo bởi cả các quy trình khử trùng, supra, và cả bao gồm nhiều chất kháng khuẩn và kháng nấm, ví dụ, paraben, clobutanol, axit phenol sorbic, và tương tự. Chế phẩm này cũng được mong muốn bao gồm cả chất đẳng trương, như là đường, natri clorua, và tương tự vào trong chế phẩm này. Ngoài ra, sự hấp thu kéo dài của dạng dược phẩm dùng cho tiêm có thể được tạo ra bằng cách bao gồm các chất trì hoãn sự hấp thu như là, nhôm monostearat và gelatin.

Chất mang được dụng bao gồm dung dịch chứa nước khử trùng hoặc dạng bột phân tán và khử trùng cho chế phẩm chuẩn bị ngay lúc sử dụng dạng dung dịch tiêm khử trùng hoặc dạng phân tán. Sử dụng các môi trường và chất này cho các hoạt chất cho ngành dược được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trừ khi nếu môi trường hoặc chất thông thường bất kỳ không phù hợp với hoạt chất này, việc sử dụng chúng trong

được phẩm theo sáng chế đã được dự định trong sáng chế. Các hoạt chất bổ sung cũng có thể được kết hợp vào trong chế phẩm này.

Chế phẩm điều trị thông thường phải vô trùng và ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản. Chế phẩm này có thể được bào chế ở dạng dung dịch, vi nhũ tương, hạt mỡ, hoặc cấu trúc trúc được chỉ định khác thích hợp với nồng độ được phẩm cao. Chất mang này có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán bao gồm, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol dạng lỏng, và tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng. Trạng thái lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng chất phủ như là lecithin, bằng cách duy trì kích thước hạt yêu cầu trong trường hợp thể phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Trong nhiều trường hợp, chế phẩm có thể bao gồm chất đẳng trương, ví dụ, đường, rượu đa chức như là manitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong chế phẩm này. Việc kéo dài sự hấp thụ các chế phẩm dùng cho tiêm có thể được thực hiện bằng cách bao gồm trong chế phẩm này chất trì hoãn sự hấp thụ, ví dụ, các muối monostearat và gelatin.

Dung dịch dùng cho tiêm khử trùng có thể được điều chế bằng cách kết hợp hoạt chất theo sáng chế theo lượng được yêu cầu trong dung môi thích hợp với một hoặc một tổ hợp các chất được liệt kê trên đây, nếu được yêu cầu, sau đó, kết hợp hoạt chất này cùng với chất dẫn thuốc khử trùng chứa môi trường bazơ giúp phân tán và các chất được yêu cầu khác từ những chất được liệt kê trên đây. Trong trường hợp dạng bột khử trùng để điều chế dung dịch dùng cho tiêm khử trùng, các phương pháp để điều chế và làm khô trong chân không và làm khô đông lạnh (đông khô) để tạo ra hoạt chất dạng bột cộng thêm chất bổ sung được mong muốn bất kỳ từ dung dịch đã được lọc khử trùng trước đó của nó.

Lượng hoạt chất có thể được kết hợp với vật liệu chất mang để tạo ra dạng liều dùng một lần sẽ biến đổi phụ thuộc vào đối tượng được điều trị, và chế độ dùng cụ thể. Lượng hoạt chất mà có thể được kết hợp với vật liệu chất mang để tạo ra dạng liều dùng một lần thường sẽ là lượng chế phẩm tạo ra tác dụng điều trị. Thông thường, ngoài giá trị 100%, lượng này sẽ nằm trong khoảng từ 0,01% đến khoảng 99% hoạt chất, từ 0,1% đến khoảng 70%, hoặc từ 1% đến khoảng 30% hoạt chất kết hợp với chất mang được dùng.

Phác đồ liều lượng được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng tối ưu được mong muốn (ví dụ, đáp ứng điều trị). Ví dụ, liều lớn dùng một lần có thể được sử dụng, các liều được chia thành nhiều lần có thể được sử dụng theo thời gian hoặc liều dùng này có thể được giảm hoặc tăng theo tỷ lệ như được chỉ định bởi mức độ cấp bách của tình trạng điều trị. Điều này là đặc biệt hữu ích để bào chế chế phẩm ở dạng đơn vị liều để dễ dàng sử dụng và sự thống nhất của liều dùng. Dạng đơn vị liều như được sử dụng ở đây dùng để chỉ các đơn vị riêng biệt về mặt vật lý thích hợp làm các liều dùng đơn vị cho các đối tượng được điều trị bệnh; mỗi đơn vị chứa một lượng định trước của hoạt chất được tính toán để tạo ra tác động điều trị mong muốn trong sự kết hợp với dược chất mang được yêu cầu. Quy cách dùng dạng đơn vị liều theo sáng chế được quy định bởi và phụ thuộc trực tiếp vào các đặc điểm đặc thù của hoạt chất này và tác động điều trị cụ thể cần đạt được, và vào những hạn chế hiện hữu trong lĩnh vực hóa hợp hoạt chất này để điều trị sự miễn cảm ở từng cá thể.

Lượng có hiệu quả điều trị của polypeptit trong phạm vi dùng biến thể của IGF-1 theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa các biến thể của IGF-1 đã nêu, nằm trong khoảng từ 0,001mg/kg đến 100mg/kg, hoặc 0,01mg/kg đến 30mg/kg, và thường xuyên hơn là 0,1mg/kg đến 10mg/kg trọng lượng cơ thể vật chủ. Ví dụ, liều lượng có thể là khoảng 0,1mg/kg trọng lượng cơ thể, có thể là khoảng 0,2mg/kg trọng lượng cơ thể, có thể là khoảng 0,3mg/kg trọng lượng cơ thể, có thể là khoảng 1mg/kg trọng lượng cơ thể, có thể là khoảng 3mg/kg trọng lượng cơ thể, có thể là khoảng 5mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc khoảng 10mg/kg trọng lượng cơ thể. Người có hiểu biết trong lĩnh vực này biết cách xác định liều có hiệu quả thích hợp sẽ thay đổi tùy thuộc vào đường dùng (ví dụ, dùng trong tĩnh mạch hoặc dùng dưới da). Một phác đồ điều trị ví dụ yêu cầu dùng một ngày một lần, một tuần một lần, hai tuần một lần, ba tuần một lần, bốn tuần một lần hoặc một tháng một lần. Sự áp dụng này có thể được thực hiện ở trong tĩnh mạch hoặc dưới da. Phác đồ liều lượng của biến thể IGF-1 theo sáng chế bao gồm 0,1mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc 0,2mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc 0,3mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc 0,5mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc 1mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc 3mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc 10mg/kg trọng lượng cơ thể bằng cách dùng trong tĩnh mạch. Theo một khác khác, chế phẩm này có thể là chế phẩm bào chế giải phóng duy trì, trong trường hợp tần suất sử dụng ít hơn được yêu cầu. Liều lượng và tần suất thay đổi tùy thuộc vào thời gian bán hủy của kháng thể điều trị bên trong bệnh nhân. Liều lượng và tần suất

thay đổi tùy thuộc vào sự điều trị này là phòng bệnh hay điều trị bệnh. Trong các ứng dụng phòng bệnh, liều lượng tương đối thấp được sử dụng ở những khoảng thời gian tương đối không thường xuyên qua giai đoạn dài. Một số bệnh nhân tiếp tục nhận điều trị trong phần còn lại cuộc sống của họ. Trong các ứng dụng điều trị bệnh, liều lượng tương đối cao ở các khoảng thời gian tương đối ngắn đôi khi được yêu cầu cho đến khi sự tiến triển của bệnh giảm xuống hoặc kết thúc hoặc cho đến khi bệnh nhân này cho thấy sự thuyên giảm một phần hoặc toàn bộ cả triệu chứng của bệnh. Sau đó, bệnh nhân này có thể được sử dụng phác đồ liều lượng phòng bệnh.

Các mức liều lượng thực tế của hoạt chất trong dược phẩm theo sáng chế có thể được thay đổi để thu được lượng hoạt chất là có hiệu quả để đạt được đáp ứng điều trị mong muốn với bệnh nhân cụ thể, chế phẩm, và chế độ sử dụng, không trở nên độc với bệnh nhân. Mức liều lượng chọn lọc sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố dược động học khác nhau bao gồm hoạt tính của chế phẩm cụ thể theo sáng chế được sử dụng, hoặc este, muối hoặc amit của nó, đường dùng, thời gian sử dụng, tốc độ bài tiết hợp chất cụ thể được sử dụng, khoảng thời gian điều trị, các thuốc khác, và/hoặc các chất được sử dụng kết hợp với chế phẩm cụ thể được sử dụng này, tuổi tác, giới tính, cân nặng, tình trạng, sức khỏe tổng quát và lịch sử y tế trước đó của bệnh nhân được điều trị bệnh, và các yếu tố tương tự được biết rõ trong lĩnh vực y tế.

Sử dụng liều có hiệu quả điều trị của biến thể của IGF-1 trong chế phẩm theo sáng chế có thể dẫn đến giảm độ nghiêm trọng các triệu chứng của bệnh, tăng tần suất và khoảng thời gian của chu kỳ không có triệu chứng của bệnh, hoặc sự ngăn chặn sự suy yếu hoặc mất khả năng do những ảnh hưởng của bệnh có nghĩa là sự tăng khối lượng cơ và/hoặc chức năng hoặc giảm/thu nhỏ diện tích thương tổn ở các bệnh nhân bị bỏng.

Các bệnh nhân sẽ nhận lượng có hiệu quả của hoạt chất là polypeptit có nghĩa lượng có hiệu quả để phát hiện, điều trị, làm thuyên giảm, hoặc phòng bệnh hoặc rối loạn được đã nêu. Các tác động điều trị cũng có thể bao gồm sự giảm các triệu chứng thể chất. Lượng có hiệu quả và nồng độ tối ưu của protein để điều trị cho đối tượng cụ thể bất kỳ sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm sức khỏe, vóc dáng, tuổi tác và/hoặc giới tính của bệnh nhân, tính chất và mức độ của tình trạng bệnh, hoạt tính của protein điều trị cụ thể, tốc độ thanh thải protein điều trị này của cơ thể, và còn phụ

thuộc vào liệu pháp điều trị bất kỳ có thể được dùng kết hợp với protein điều trị này. Lượng có hiệu quả cần được vận chuyển với trường hợp cụ thể có thể được xác định bằng thử nghiệm thông thường và nằm trong sự phán đoán của bác sĩ lâm sàng. Liệu dùng có thể là lịch trình liệu dùng một lần hoặc lịch trình liệu dùng nhiều lần.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng bằng một hoặc nhiều đường dùng bằng cách sử dụng một hoặc nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng đường dùng và/hoặc chế độ dùng sẽ thay đổi phụ thuộc vào các kết quả muốn đạt được. Các đường dùng của protein cho điều trị theo sáng chế bao gồm dùng trong tĩnh mạch, dùng trong cơ, dùng nội bì, dùng trong màng bụng, dùng dưới da, dùng ở tủy sống hoặc các đường dùng ngoài tiêu hóa khác, ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền. Cụm từ “dùng ngoài đường tiêu hóa” khi được sử dụng ở đây có nghĩa là các chế độ dùng không phải là dùng theo đường ruột và không phải là dùng trên bề mặt cơ thể, thường là bằng cách tiêm, và bao gồm, không chỉ giới hạn ở, tiêm và truyền trong tĩnh mạch, trong bắp, trong động mạch, nội tủy mạc, trong vỏ capsul, trong ổ mắt, trong tim, nội bì, trong màng bụng, qua khí quản, dưới da, dưới lớp cutin, trong lớp cutin, dưới capsul, dưới màng nhện não, trong tủy sống, trên màng cứng và trong xương ức. Theo một phương án, kháng thể được bao gồm trong chế phẩm được dùng cho tiêm tĩnh mạch. Theo một phương án khác kháng thể này được sử dụng cho tiêm dưới da.

Theo cách khác, biến thể IGF-1 được bao gồm trong chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng qua đường không phải đường tiêu hóa, như là đường dùng trên bề mặt cơ thể, trên bề mặt da hoặc trên bề mặt cơ, ví dụ, trong mũi, qua đường miệng, qua âm đạo, qua trực tràng, dùng dưới lưỡi hoặc dùng tại chỗ.

Hoạt chất theo sáng chế có thể được bào chế cùng với các chất mang để bảo vệ hợp chất này khỏi sự giải phóng nhanh, như là chế phẩm giải phóng kiểm soát, bao gồm thiết bị cấy dưới da, miếng dán qua da, và các hệ thống vận chuyển được vi bao gói. Các polyme có khả năng phân giải trong cơ thể, thích hợp về mặt sinh học có thể được sử dụng, như là etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Nhiều phương pháp bào chế các chế phẩm này đã được cấp bằng sáng chế hoặc thường là đã được biết bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem

trong, ví dụ, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Chế phẩm điều trị có thể được dùng với các thiết bị y tế đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, theo một phương án, chế phẩm điều trị theo sáng chế có thể được dùng với thiết bị cho tiêm dưới da không có kim chọc, như là các thiết bị được trình bày trong các bằng sáng chế Mỹ số 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 hoặc 4,596,556. Các ví dụ về các thiết bị cấy dưới da và các modun hữu ích trong sáng chế này bao gồm: Bằng sáng chế Mỹ số 4,487,603, bộc lộ bơm truyền siêu nhỏ có thể cấy vào được để phân tán dược phẩm ở tốc độ được kiểm soát; bằng sáng chế Mỹ số 4,486,194, bộc lộ thiết bị cho điều trị để sử dụng các dược phẩm qua da; Bằng sáng chế Mỹ số 4,447,233, bộc lộ bơm truyền dược phẩm để vận chuyển dược phẩm ở tốc độ truyền chính xác; bằng sáng chế Mỹ số 4,447,224, bộc lộ bộ máy truyền có thể cấy vào được có thể điều chỉnh dòng chảy để vận chuyển thuốc liên tục; bằng sáng chế Mỹ số 4,439,196, bộc lộ hệ thống vận chuyển thuốc thẩm thấu có các ngăn đa phòng; và bằng sáng chế Mỹ số 4,475,196, bộc lộ hệ thống vận chuyển thuốc thẩm thấu. Nhiều thiết bị cấy vào cơ thể, hệ thống vận chuyển, và modun đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm các thiết bị được tạo ra bởi hãng MicroCHIPSTM (Bedford, MA).

Theo các phương án cụ thể, biến thể IGF-1 của người được bao gồm trong chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế để đảm bảo sự phân bố chính xác *in vivo*. Ví dụ, hàng rào máu-não bộ (blood-brain barrier- BBB) loại trừ nhiều hợp chất rất ưa nước. Để đảm bảo hợp chất theo sáng chế vượt qua BBB (nếu được mong muốn); chúng có thể được bào chế, ví dụ, trong các hạt mỡ. Với các phương pháp sản xuất hạt mỡ, xem, ví dụ, các bằng sáng chế Mỹ số 4,522,811; 5,374,548; và 5,399,331. Các hạt mỡ này có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc được vận chuyển chọn lọc vào trong các tế bào hoặc cơ quan đặc hiệu, vì thay thế tăng cường sự vận chuyển thuốc có định hướng (xem, ví dụ, V.V. Ranade, 1989 J. Clin Pharmacol. 29:685). Các gốc định hướng điển hình bao gồm folat hoặc biotin (xem, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ 5,416,016); mannosit (Umezawa et al., 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); kháng thể (P.G. Bloeman et al., 1995 FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al., 1995 Antimicrob. Agents Chernother. 39:180); chất hoạt động bề mặt thụ thể protein A (Briscoe et al., 1995 Am. J.

Physiol.1233:134); p120 (Schreier et al., 1994 J. Biol. Chem. 269:9090); cũng xem tài liệu của K. Keinanen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBSLett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273.

Các bệnh và rối loạn đích

Sáng chế đề xuất polypeptit, axit nucleic hoặc dược phẩm theo sáng chế để sử dụng trong điều trị. Sáng chế còn đề xuất polypeptit, axit nucleic hoặc dược phẩm theo sáng chế để sử dụng trong điều trị rối loạn bệnh lý. Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng polypeptit, axit nucleic hoặc dược phẩm theo sáng chế trong việc bào chế dược phẩm để điều trị rối loạn bệnh lý. Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc rối loạn bệnh lý bao gồm dùng lượng có hiệu quả điều trị của polypeptit, axit nucleic hoặc dược phẩm theo sáng chế với bệnh nhân đã nêu.

Rối loạn bệnh lý này có thể là bệnh hoặc rối loạn cơ xương, như là bệnh teo cơ. Có nhiều nguyên nhân gây bệnh teo cơ, bao gồm do sự điều trị bằng glucocorticoid như là cortisol, dexametason, betametason, prednison, metylprednisolon, hoặc prednisolon. Bệnh teo cơ cũng có thể là do sự cắt bỏ dây thần kinh dẫn đến chấn thương dây thần kinh hoặc dẫn đến bệnh thần kinh suy thoái, bệnh thần kinh do chuyển hóa hoặc bệnh thần kinh do viêm (ví dụ, hội chứng Guillian-Barré, bệnh thần kinh ngoại biên, hoặc phơi nhiễm với môi trường độc hại hoặc các loại dược phẩm khác).

Ngoài ra, bệnh teo cơ cũng có thể là kết quả của bệnh về cơ, như là bệnh loạn lực cơ; bệnh cơ bẩm sinh, bao gồm bệnh cơ nổi sợi cơ, bệnh cơ đa lõi/lõi nhỏ và bệnh cơ do ống cơ (nhân trung tâm); bệnh cơ ty thể; liệt chu kỳ do di truyền; bệnh cơ do chuyển hóa, như là gây ra bởi bệnh tích lũy lipid hoặc glycogen; dermatomyositis; polymyositis; myositis thể vùi; myositis ossificans; rhabdomyolysis và myoglobinurias.

Theo phương án khác của sáng chế, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh Kennedy Disease hoặc bệnh thận mạn tính.

Bệnh cơ có thể có thể gây ra bởi hội chứng loạn dưỡng cơ, như là hội chứng Duchenne, hội chứng Becker, hội chứng trương lực cơ, hội chứng cơ mặt vai cánh tay, hội chứng Emery-Dreifuss, hội chứng hầu họng, hội chứng vai cánh tay, hội chứng đai vai, hội chứng Fukuyama, hội chứng loạn dưỡng cơ bẩm sinh, hoặc bệnh cơ xa di

truyền. Bệnh cơ xương này cũng có thể là bệnh loãng xương, bệnh gãy xương, chứng vóc dáng thấp, hoặc chứng còi cọc.

Ngoài ra, bệnh teo cơ này có thể là kết quả của bệnh neuron vận động ở tuổi trưởng thành như là bệnh xơ cứng teo cơ một bên; bệnh teo cơ cột sống ở tuổi nhỏ, bệnh teo cơ cột sống tuổi thiếu niên, bệnh thần kinh vận động tự miễn do bị khóa chất dẫn truyền, bệnh liệt do đột quỵ hoặc tổn thương dây sống, sự bất động xương do chấn thương, do thời gian trên giường bệnh kéo dài, do không vận động tự nguyện, do không vận động không tự nguyện, do áp lực chuyển hóa hoặc suy dinh dưỡng, bệnh ung thư, bệnh AIDS, nhịn đói, rối loạn tuyến yên hoặc tuyến thượng thận hoặc tuyến giáp, bệnh tiểu đường, giảm trương lực cơ bẩm sinh lạnh tính, bệnh lõi trung tâm, các bệnh về gan (ví dụ, như là chứng xơ hóa gan, bệnh xơ gan), bệnh nhiễm trùng máu, suy thận, suy tim xung huyết, du hành trong không gian hoặc có thời gian ở trong môi trường không trọng lực.

Theo phương án cụ thể, được phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị cho các bệnh nhân bị bỏng bao gồm các thương tổn do bỏng ở người trưởng thành và trẻ nhỏ, bị mất trọng lượng nạc cơ thể và/hoặc suy mòn cơ.

Các ví dụ về các tình trạng liên quan đến tuổi mà có thể được điều trị bao gồm bệnh sarcopenia, bệnh suy mòn da, bệnh suy mòn cơ, bệnh suy mòn não, bệnh xơ vữa thành động mạch, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh phổi khí phế thũng, bệnh loãng xương, bệnh viêm xương khớp, bệnh thiếu năng miễn dịch, huyết áp cao, chứng mất trí, bệnh Huntington, bệnh Alzheimer, bệnh đục thủy tinh thể, bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, chứng đột quỵ, tuổi thọ bị suy giảm, chứng dễ bị tổn thương, mất trí nhớ, nếp nhăn do tuổi già, chức năng thận suy giảm, và mất thính giác do tuổi già; rối loạn chuyển hóa, bao gồm bệnh tiểu đường Typ II, hội chứng chuyển hóa, tăng đường huyết, và béo phì.

Theo phương án cụ thể, được phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chronic obstructive pulmonary disease-COPD).

Theo phương án khác của sáng chế được phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh teo cơ. Theo phương án cụ thể sáng chế đề cập đến được phẩm để

điều trị bệnh teo cơ, trong đó nhóm bệnh suy mòn cơ này được chọn từ nhóm bao gồm bệnh sarcopenia do béo phì, bệnh sarcopenia, và bệnh teo cơ do tiểu đường.

Các tình trạng khác có thể được điều trị bao gồm bệnh hoặc suy giảm thận cấp tính và/hoặc mạn tính, chứng xơ hóa gan hoặc bệnh xơ gan, bệnh ung thư như là bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư dạ dày ruột (bao gồm thực quản, dạ dày, và đại tràng), bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh u lympho, hoặc bệnh ung thư vú; bệnh Parkinson; các tình trạng liên quan đến sự chết neuron, như là bệnh ALS (bệnh xơ cứng teo cơ một bên), bệnh suy mòn não, hoặc bệnh sa sút trí tuệ và bệnh thiếu máu não; bệnh do xâm nhiễm mạn tính như là bệnh lao phổi, có thể gây ra bởi Mycobacteria hoặc bởi mycobacteria không điển hình; bệnh do nấm xâm nhiễm mạn tính; và bệnh do xâm nhiễm cơ hội trong giai đoạn hình thành sự ức chế miễn dịch, có thể do điều trị hoặc do nhiễm bệnh AIDS.

Các tình trạng khác bao gồm chứng suy mòn, chứng suy mòn liên quan đến viêm khớp dạng thấp và chứng suy mòn liên quan đến ung thư.

Theo một phương án khác sáng chế mô tả phương pháp điều trị rối loạn cơ, phương pháp này bao gồm dùng lượng có hiệu quả điều trị bệnh, như nêu trên, của các polypeptit theo sáng chế. Nhu cầu điều trị bằng polypeptit theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa nó để làm tăng trọng lượng cơ có thể là từ đối tượng mắc một trong những tình trạng nêu trên, cụ thể là hậu quả của bệnh hoặc rối loạn cơ xương, như là bệnh teo cơ, trong đó rối loạn cơ này là bệnh teo cơ được chọn từ nhóm bao gồm bệnh sarcopenia do béo phì, bệnh sarcopenia, và bệnh teo cơ do tiểu đường.

Ngoài ra, sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị tổn thương do bỏng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), tình trạng liên quan đến tuổi già như là bệnh sarcopenia, bệnh Kennedy, hoặc bệnh thận mạn tính, bao gồm việc dùng lượng có hiệu quả điều trị, như nêu trên, của các polypeptit theo sáng chế cho bệnh nhân.

Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp làm tăng trọng lượng cơ. Theo phương án cụ thể, sáng chế mô tả phương pháp làm tăng trọng lượng cơ cho bệnh nhân cần điều trị rối loạn này. Nhu cầu làm tăng trọng lượng cơ có thể là từ đối tượng mắc một trong những tình trạng nêu trên, cụ thể là hậu quả của bệnh hoặc rối loạn cơ xương, như là bệnh teo cơ. Nhu cầu làm tăng trọng lượng cơ có thể là từ đối tượng bị

tổn thương do bỏng, tình trạng phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), tình trạng liên quan đến tuổi già như là bệnh sarcopenia, bệnh Kennedy, hoặc bệnh thận mạn tính.

Sự sử dụng cho bệnh nhân

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho bệnh nhân. Sự sử dụng thông thường là thông qua một ống tiêm. Do đó, sáng chế đề xuất dụng cụ vận chuyển (ví dụ, ống tiêm) bao gồm dược phẩm theo sáng chế.

Nhiều hệ thống vận chuyển được biết và có thể được dùng cho người sử dụng polypeptit theo sáng chế, ví dụ, sự bao bọc trong các hạt mỡ, các vi hạt, vi capxun, tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện protein này, nhập bào nhờ trung gian thụ thể (xem, ví dụ, Wu và Wu, J Biol Chem 262:4429-4432, 1987), thiết kế axit nucleic thành bộ phận của vectơ retrovirut, vectơ virut kết hợp với adenovirut, vectơ adenovirut, vectơ virut gây bệnh đậu mùa (ví dụ, vectơ virut gây bệnh đậu mùa ở gia cầm, cụ thể là vectơ virut gây bệnh đậu gà) hoặc vectơ khác, v.v. Các phương pháp đưa vào có thể là theo đường tiêu hóa hoặc ngoài đường tiêu hóa và bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở đường dùng nội bì, đường dùng trong bắp, đường dùng trong màng bụng, đường dùng trong tĩnh mạch, đường dùng dưới da, đường dùng qua phổi, đường dùng trong mũi, đường dùng trong mắt, đường dùng trên màng cứng, và đường miệng. Các polypeptit có thể được dùng theo đường dùng thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách truyền hoặc tiêm nhanh, bằng cách hấp thu qua biểu mô hoặc lớp lót niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc dạ dày và ruột, v.v) và có thể được sử dụng cùng với hoạt chất sinh học khác. Việc dùng có thể là theo hệ thống hoặc cục bộ. Ngoài ra, việc dùng có thể được mong muốn để vận chuyển dược phẩm theo sáng chế vào hệ thần kinh trung ương bằng đường dùng thích hợp bất kỳ, bao gồm tiêm trong tâm thất và tiêm trong tâm nhĩ; việc tiêm trong tâm nhĩ có thể được tạo điều kiện bằng một ống thông trong tâm nhĩ, ví dụ, gắn với khoang chứa, như là khoang chứa Ommaya. Theo phương án cụ thể, người dùng có thể mong muốn dùng dược phẩm theo sáng chế cục bộ ở khu vực cần được điều trị, điều này có thể đạt được, ví dụ, và không giới hạn ở, bằng cách truyền cục bộ trong suốt quá trình phẫu thuật, áp dụng tại chỗ, ví dụ, bằng cách sử dụng ống thông, hoặc bằng cách sử dụng thiết bị cấy trong cơ thể, thiết bị cấy này có thể làm từ vật liệu xốp rỗng, vật liệu không phải vật liệu xốp rỗng, hoặc vật liệu gelatin, bao gồm màng, như là màng sialastic, màng sợi, hoặc vật liệu thay thế da thương mại.

Theo phương án khác, dược phẩm này có thể được vận chuyển trong nang, cụ thể là liposom (xem Langer, Science 249:1527-1533, 1990). Theo phương án khác, hoạt chất này có thể được vận chuyển trong một hệ thống giải phóng được kiểm soát. Theo một phương án, bơm có thể được sử dụng.

Các nhóm bệnh nhân

Các bệnh nhân có thể được lợi ích từ chất điều trị đề được xuất này bao gồm các bệnh nhân đang hồi phục từ bệnh cấp tính hoặc nghiêm trọng yêu cầu sự chăm sóc tăng cường hoặc việc điều trị tại bệnh viện kéo dài (hơn 1 tuần); các bệnh nhân cao tuổi dễ bị tổn thương bởi sarcopenia; bệnh nhân trẻ đang hồi phục từ chấn thương nghiêm trọng, như là tai nạn xe cộ, bỏng nghiêm trọng, bị thương do chiến đấu, và các tổn thương chấn thương khác; các bệnh nhân mắc các bệnh mạn tính đã biết nguyên nhân là do chứng suy mòn, như được liệt kê trên đây; và các bệnh nhân mắc bệnh cơ, như được liệt kê trên đây. Do mất cơ là biến chứng chung ở phần lớn các bệnh nghiêm trọng hoặc kéo, đã được dự đoán trước rằng sự đảo ngược suy mòn cơ sẽ tăng tốc độ hồi phục và trở về chức năng của bệnh nhân trải qua sự mất cơ bất kể nguyên nhân sâu xa của sự mất cơ này.

Liệu pháp kết hợp

Việc điều trị này có thể được kết hợp với việc điều trị bất kỳ nhằm vào nguyên nhân chính của quá trình suy mòn cơ. Sự kết hợp này có thể bao gồm chất corticosteroid, chất ức chế miễn dịch, chất kháng xytokin, chất kháng ung thư; yếu tố sinh trưởng như là erythropoietin, G-CSF, GM-CSF, hoặc các yếu tố khác; thuốc được dùng để điều trị bệnh tiểu đường (bao gồm insulin và chất hypoglycemic đưa vào qua đường miệng), thuốc kháng bệnh lao phổi, và thuốc kháng sinh. Sự kết hợp này có thể bao gồm cả các chất phân tử nhỏ và chất phân tử sinh học.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng như là hoạt chất riêng lẻ hoặc dùng kết hợp với, ví dụ, như một chất trợ hoặc trong sự kết hợp với, các thuốc khác, ví dụ, kháng thể ActRIIB, kháng thể ActRIIA, chất bất chức giả ActRIIB hòa tan được, kháng thể kháng myostatin, tiền peptit của myostatin, protein giả myostatin gắn kết ActRIIB nhưng không hoạt hóa nó, chất chủ vận beta 2, chất chủ vận Ghrelin, chất chủ vận/chất bất chức SARM, GH hoặc follistatin. Ví dụ, thuốc theo sáng chế có thể được

sử dụng bất hợp với kháng thể ActRIIB như được bộc lộ trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2010125003.

Trình tự

SEQ ID NO.	ADN/ PROT.	Mô tả	Trình tự
1	PROT.	hIGF-1 không chứa trình tự dẫn đầu	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA
2	PROT.	Peptit Ea	RSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYRM
3	PROT.	Peptit Eb	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNTKSQRRKGWPKTHPGGEQKEGTEASLQIRGKKKEQRREIGSARNECRGKKGK
4	PROT.	Peptit Ec	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNTKSQRRKGSTFEERK
5	PROT.	IGF-1-Ea kiểu đại không chứa trình tự dẫn đầu	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYRM
6	PROT.	miền hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVRAQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYRMGSDKTHTCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	PROT.	miền hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVRAQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYRMGSDKTHTCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMDKTHTCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
9	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV

			DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG K
10	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGDKT HTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
12	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAG NKNYQMDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLS LSPGK
13	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAG NKNYQMCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGDKTH TCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	ADN	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E	acgctctgcggggctgagctgggtgatgctctcagttcgtgtgtggagacaggggctttattcaacaagc ccacagggatggtcctcagcagtcaggcggcgctcagacaagcatcgtggatgagtgctgctccggag ctgtgatctaaggaggctggagatgtattgcgcacccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacacc gacatgcccaagaccagaaggaagtacattgaagaacgcaagtagaggagtgagggaacaagaac taccagatggacaaaactcacatgccaccgtgccagcacctgaagcagcggggggaccgtcagctct tcctctcccccaaaaccaagacaccctcatgatctccggacccctgaggtcacatgctggtggtgg acgtgagccacgaagacctgaggtcaagttaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatccaa gacaaagccgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcacca

			ggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaa accatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccgggaggag atgaccaagaaccaggtcagcctgacctggtcaaaaggcttatcccagcgacatcgccgtggagtg ggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgctcccgctgctggactccgacggctcctt cttctctacagcaagctaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat gcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
16	ADN	hIgF1-Ea- Fc_mut 13/2_A	acgctctcgccgggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggctttatttcaacaagc ccacagggtatggctccagcagtcagggcgccctcagacaagcatcgtggatgagtgtgcttccggag ctgtgatctaaggaggctggagatgtattgcgacccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacacc gacatgcccagaccagaaggaggtacatttgaagaacgcaagtagaggagtgtaggaaacaagaac taccagatgtgccaccgtgccagcacctgaagcagcggggggaccgtcagttcttcttcccccaaa acccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaa gaccctgagggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgagg gaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatg gcaaggagtacaagtgaaggctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagc caaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccgggaggagatgaccaagaacc aggctcagcctgacctgcctgggtcaaaaggcttatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgg gcagccgggagaacaactacaagaccacgcctccgtgctggactccgacggctccttctctctacagca agctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
17	ADN	hIgF1-Ea- Fc_mut 13/2_C	acgctctcgccgggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggctttatttcaacaagc ccacagggtatggctccagcagtcagggcgccctcagacaagcatcgtggatgagtgtgcttccggag ctgtgatctaaggaggctggagatgtattgcgacccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacacc gacatgcccagaccagaaggaggtacatttgaagaacgcaagtggggtcccaccgtgccagcacct gaagcagcggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggac ccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtgg acggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtg gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggttccaacaa agccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgta cacctgccccatccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaaggcttc tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggcagccgggagaacaactacaagaccacgcct cccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca ggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccct gtctccgggtaaa
18	ADN	hIgF1-Ea- Fc_mut 13/2_F	acgctctcgccgggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggctttatttcaacaagc ccacagggtatggctccagcagtcagggcgccctcagacaagcatcgtggatgagtgtgcttccggag ctgtgatctaaggaggctggagatgtattgcgacccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacacc gacatgcccagaccagaaggaggtacatttgaagaacgcaagtggggacaaaactcacacatgcccc cgtgcccagcacctgaagcagcggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacacc tcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaa gttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaa cagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaag tgcaaggttccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccc gagaaccacaggtgtacacctgccccatccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggagccgggagaaca actacaagaccacgcctccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggaca agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg cagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

19	ADN	hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E	acgctctcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggctttatttcaacaagc ccacagggatggtccagcagtcgggaggcgctcagacaagcatcgtggatgagtgctgctccggag ctgtgatctaaggaggtgagatgtattgcgacccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacacc gacatgcccagaccagaaggagtagatattgaagaacgcaagtagaggagtgagcagaaacaagaac taccagatggacaaaactcacatgcccaccgtgccagcacctgaagcagcggggggaccgtcagctct tcctctcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtgg acgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtagcggcgtggaggtgcataatgccaa gacaaagccgaggaggagcagtagacaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctaccgtcctgcacca ggactggtgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctcaacaaagccctccagccccatcgagaaa accatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccggaggag atgaccaagaaccaggtcagcctgacgtgctgtaaaaggcttctatccagcgacatcgccgtgagtg ggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggctcctt cttctctacagcaagctaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat gcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
20	ADN	hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A	acgctctcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggctttatttcaacaagc ccacagggatggtccagcagtcgggaggcgctcagacaagcatcgtggatgagtgctgctccggag ctgtgatctaaggaggtgagatgtattgcgacccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacacc gacatgcccagaccagaaggagtagatattgaagaacgcaagtagaggagtgagcagaaacaagaac taccagatgtgcccaccgtgccagcacctgaagcagcggggggaccgtcagcttctctcccccaaa acccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaa gaccctgaggtcaagttcaactggtagcggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgagg gaggagcagtagacaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctaccgtcctgcaccaggactggctgaatg gcaaggagtacaagtgaaggtctcaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaagc caaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccggaggagatgaccaagaacc agggtcagcctgacgtgcctgggtcaaaaggcttctatccagcgacatcgccgtgagtgaggagagcaatgg gcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggctccttctctctacagca agctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
21	ADN	hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F	acgctctcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggctttatttcaacaagc ccacagggatggtccagcagtcgggaggcgctcagacaagcatcgtggatgagtgctgctccggag ctgtgatctaaggaggtgagatgtattgcgacccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacacc gacatgcccagaccagaaggagtagatattgaagaacgcaagtaggggacaaaactcacatgccc ccgtgcccagcacctgaagcagcggggggaccgtcagcttctctcccccaaaaccaaggacacc tcctgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaa gttcaactggtagcggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccggaggagcagtagaca cagcacgtaccgggtggtcagcgtcctaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaag tgcaaggtctcaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagcccc gagaaccacaggtgtacaccctgccccatccggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaca actacaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggaca agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg cagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
22	PROT.	bản lẻ 1	CPPCPA
23	PROT.	bản lẻ 2	DKTHTCPPCPA
24	PROT.	bản lẻ 3	EPKSCDKTHTCPPCPA
25	PROT.	peptit Ea đột biến 1	VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASG

26	PROT.	peptit Ea đột biến	VQAQQHTDMPKTQKYQPPATNKNTKSQRRKGS
27	PROT.	hIgF1-Ea-mut 03	GPTLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDEC CFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNAS RGSAGNKNYRM
28	ADN	hIgF1-Ea-mut 03	ggaccgacgctctcggggctgagctggatgctcttcagttcgtgtggagacaggggctttatttc aacaagcccacagggatgctccagcagtcggcgccgctcagacagggcatcgtggatgagctgctgct tccggagctgtgatctaaggaggctggagatgtattgcgcacccctcaagcctgccaagtcagctgtccgtg cccagcgccacaccgacatgcccaagaccagaaggaagtacattgaagaacgcaagtagaggagtg caggaaacaagaactacaggatg
29	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 02	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASR GSAGNKNYQMGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
30	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 04	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTGIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASR GSAGNKNYQMGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
31	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 13	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTGIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASR GSAGNKNYQMGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
32	PROT.	Ví dụ 8	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRG SAGNKNYRM
33	PROT.	Ví dụ 9	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRG SAGNKNYRM
34	PROT.	Ví dụ 10	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRG SAGNKNYRM
35	PROT.	Ví dụ 11	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRG SAGNKNYRM

36	PROT.	Ví dụ 12	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRG SAGNKNYRM
37	PROT.	Ví dụ 13	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRG SAGNKNYRM
38	PROT.	Ví dụ 14	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLPAKSAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRG SAGNKNYRM
39	PROT.	Ví dụ 15	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLPAKSAVQAQHTDMPKTQKEVHLKNASR GSAGNKNYRM
40	PROT.	Ví dụ 16	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLPAKSAVQAQHTDMPKTQKEVHLKNASR GSAGNKNYQM
41	PROT.	Ví dụ 17	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLPAKSAVRAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGS AGNKNYRM
42	PROT.	Ví dụ 18	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLPAKSAVQAQHTDMPKTQKEVHLKNASRGS AGNKNYRM
43	PROT.	Ví dụ 19	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLPAKSAVQAQHTDMPKTQKEVHLKNASRGS AGNKNYQM
44	PROT.	Ví dụ 20	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLPAKSAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRG SAGNKNYRM
45	PROT.	Ví dụ 21	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLPAKSAVQAQHTDMPKTQKEVHLKNASR GSAGNKNYRM
46	PROT.	Ví dụ 22	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLPAKSAVQAQHTDMPKTQKEVHLKNASR GSAGNKNYQM
47	PROT.	Ví dụ 23	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLPAKSAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGS AGNKNYRM
48	PROT.	Ví dụ 24	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLPAKSAVQAQHTDMPKTQKEVHLKNASRGS AGNKNYRM
49	PROT.	Ví dụ 25	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLPAKSAVQAQHTDMPKTQKEVHLKNASRGS AGNKNYQM
50	PROT.	Ví dụ 26	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCF

			RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRG SAGNKNYRM
51	PROT.	Ví dụ 27	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVQAQHTDMPKTQKEVHLKNASR GSAGNKNYRM
52	PROT.	Ví dụ 28	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVQAQHTDMPKTQKEVHLKNASR GSAGNKNYRM
53	PROT.	Ví dụ 29	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVQAQHTDMPKTQKEVHLKNASR GSAGNKNYQM
54	PROT.	Ví dụ 30	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSAVQAQHTDMPKTQKEVHLKNASR GSAGNKNYQM
55	PROT.	Ví dụ 31	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAG NKNYRM
56	PROT.	Ví dụ 32	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLKPAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGN KNYRM
57	PROT.	Ví dụ 33	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAG NKNYRM
58	PROT.	Ví dụ 34	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLKPAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGN KNYRM
59	PROT.	Ví dụ 35	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAQVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGN KNYRM
60	PROT.	Ví dụ 36	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAG NKNYRM
61	PROT.	Ví dụ 37	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAG NKNYRM
62	PROT.	Ví dụ 38	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGN KNYRM
63	PROT.	Ví dụ 39	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGN KNYQM
64	PROT.	Ví dụ 40	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAG

			NKNYRM
65	PROT.	Ví dụ 41	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA NKNYRM
66	PROT.	Ví dụ 42	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA NKNYQM
67	PROT.	Ví dụ 43	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA NKNYRM
68	PROT.	Ví dụ 44	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
69	PROT.	Ví dụ 45	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
70	PROT.	Ví dụ 46	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA NKNYRM
71	PROT.	Ví dụ 47	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA NKNYRM
72	PROT.	Ví dụ 48	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA NKNYQM
73	PROT.	Ví dụ 49	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA NKNYRM
74	PROT.	Ví dụ 50	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
75	PROT.	Ví dụ 51	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYRM
76	PROT.	Ví dụ 52	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
77	PROT.	Ví dụ 53	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
78	PROT.	miền hIGF1- Ea-D1-3, R36Q, D68-	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTGIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM

		72, R74Q, R77Q, R104Q -fc	
79	PROT.	miền hIGF1- Ea-D1-3, R36Q, G42A, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSSQAAPQTAIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
80	PROT.	miền hIGF1- Ea-D1-3, R36Q, G42Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSSQAAPQTQIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
81	PROT.	miền hIGF1- Ea-D1-3, R36Q, G42P, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSSQAAPQTPIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
82	PROT.	miền hIGF1- Ea-D1-3, R36Q, G42K, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSSQAAPQTKIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
83	PROT.	miền hIGF1- Ea-D1-3, R36Q, G42E, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSSQAAPQTEIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
84	PROT.	miền hIGF1- Ea-D1-3, R36Q, G42I, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSSQAAPQTIIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
85	PROT.	miền hIGF1- Ea-D1-3, R36Q, G42Y, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSSQAAPQTYIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA GNKNYQM
86	PROT.	miền hIGF1- Ea-D1-3, R36Q, D42,	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSSQAAPQTIVDECCFR SCDLRRLEMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA

		D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc	NKNYQM
87	PROT.	hIGF1-Ea (delGPE, R37A)	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNAS RGSAGNKNYRM
88	ADN	mũi xuôi của hIGF1-Ea- hFc_mut2	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
89	ADN	mũi ngược hIGF1-Ea- hFc_mut2	TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGCTTGTCTGAGG CGCCGCCC
90	ADN	mũi xuôi hIGF1-Ea- hFc_mut3	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
91	ADN	mũi ngược hIGF1-Ea- hFc_mut3	TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGGGTGTCTGAGG CGCCGCCC
92	ADN	mũi xuôi hIGF1-Ea- hFc_mut4	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
93	ADN	mũi ngược hIGF1-Ea- hFc_mut4	TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGCCTGTCTGAGG CGCMNNCCGACTGCTGGAGCCATACCCTGTGG
94	ADN	mũi xuôi hIGF1-Ea- hFc_mut12	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
95	ADN	mũi ngược hIGF1-Ea- hFc_mut12	TGTCTGAGGCGCCCGCGCACTGCTGGAGCCATACCCTGTGGGC
96	ADN	mũi xuôi hIGF1-Ea- hFc_mut13	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
97	ADN	mũi ngược hIGF1-Ea- hFc_mut13	TGTCTGAGGCGCCGCTGACTGCTGGAGCCATACCCTGTGG
98	ADN	mũi đột biến G42	CGGTACGTGCTGGCGTACTGCTCCTCCCGCGGCTTTG
99	ADN	dòng biến thể 1 của CHOK1: sao chép Δ2	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAG GCAGCTGCCATACACCTGACGACAACAACCTGTGTGGCCTGC CGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCACCT GGCACCTAC(Δag)GTTTCGAGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATT TCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGC TTTGTTCATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGG

			CTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCCCCA TCCAGGAGGTGAATCTTGTTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCAC CCAGAGGTTTCATCCAG
100	ADN	Dòng biến thể 2 tắt gen của CHOK1: sao chép Δ5	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAG GCAGCTGCCATACACCTGACGACAACAACCTGTGTGGCCTGC CGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCACCT GGCACCTACAG(Δgttcg)AGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGGATTT CTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCT TTGTCATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGC TTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCCCCAT CCAGGAGGTGAATCTTGTTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCAC CAGAGGTTTCATCCAG
101	ADN	Dòng biến thể 3 tắt gen của CHOK1: sao chép Δ2	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAG GCAGCTGCCATACACCTGACGACAACAACCTGTGTGGCCTGC CGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCACCT GGCACCTAC(Δag)GTTTCGAGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATT TCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGC TTTGTTCATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGG CTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCCCCA TCCAGGAGGTGAATCTTGTTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCAC CCAGAGGTTTCATCCAG
102	ADN	Dòng biến thể 2 tắt gen của CHOK1: sao chép Δ22	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAG GCAGCTGCCATACACCTGACGACAACAACCTGTGTGGCCTGC CGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCACCT GGC(Δacctacaggttcgagggtggc)GCTGTGTGGACCGGATTTCTGCGCC AACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTTCAT CCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCC GCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCCCCATCCAGGA GGTGAATCTTGTTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCACCCAGAGG TTCATCCAG
103	ADN	Dòng biến thể 1 tắt gen của CHOK11: sao chép 14 nucleotit được thay thế và 18 nucleotit thêm vào	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAG GCAGCTGCCATACACCTGACGACAACAACCTGTGTGGCCTGC CGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCACCT GGtgaggtatagacagtattatagaggtggggcAGGGCTGGCGCTGTGTGGACCG CGATTTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAG ATGGCTTTGTTCATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCT CAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCC CCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTTCATATTCCATGATTGTAGGAA CCACCCAGAGGTTTCATCCAG
104	ADN	Dòng biến thể tắt gen CHOK13: sao chép Δ114	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGC(Δctag gcagctgccatacacctgacgacaacaacacctgtgtggcctgccgacactactactacaaggcgtgtgt gtgctgtgctgccacacctggcacctacaggttcgagggc)TGGCGCTGTGTGGACCGCG ATTTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGAT GGCTTTGTTCATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTC AGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCC CCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTTCATATTCCATGATTGTAGGAAC CACCCAGAGGTTTCATCCAG

105	ADN	Dòng tế bào biến thể tất gen CHO-DUXB11: trình tự Δ22	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAG GCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGC CGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCACCT GG(Δcacctacaggttcgagggtgg)CGCTGTGTGGACCGGATTCTGCGCC AACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTTCAT CCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCC GCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCATCCAGGA GGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCCAGAGG TTCATCCAG
106	ADN	Dòng tế bào biến thể tất gen CHO-DUXB11: trình tự Δ7	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAG GCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGC CGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCACCT GGCACCTACA(Δgggttcga)GGGCTGGCGCTGTGTGGACCGGATTTC TGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTT TGTCATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCT TCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCATCC CAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCCAG AGAGGTTCATCCAG
107	ADN	Vị trí nhận biết của nucleaza ngón tay kềm trên CHO IGF1R và vị trí cắt	CCCACCTGGCACCTACAGGT/TCGAGGGCTGGCGCTGTGTGG
108	ADN	Trình tự mỗi xuôi CHO IGF1R (trong intron 2-3)	CTAGCCTGTCTCTGGGACAC
109	ADN	Trình tự mỗi ngược CHO IGF1R (trong intron 3-4)	CTGGATGAACCTCTGGGTGG
110	ADN	exon 3 của CHO IGF1R	TGTGCCCAAGTGTGTGCGGAAAGCGAGCGTGCACCGAGAACAAC GAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGA CGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAG GCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCACCTGGCACCTACAGGT/TCGAG GGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTCTGCGCCAACATCCCCAA CGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTTCATCCACGATGGCG AGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCC CAGAG
111	ADN	exon 3 và các intron liền kề của CHO IGF1R	AAACTTAACGGCACATCCCATAGCAAACCATTTTCATAAGAAAGG ACTTGGCATGTGTTGTGTCTTTCCAGTGTGGGCTTCACAGATG GTATTACCTGTGCAGATTTTCAGAGAAAGTGTGTTTTTCCTAGCCT GTCTCTGGGACACCATTTAGTGCTGGTTGTGGCAGCAGATGACCC TGGGGAGGCTGTGTAGTCTCTTCATCTCACCACCTCCTCCCCCTG TTCCACAGTGTGCCCAAGTGTGTGCGGAAAGCGAGCGTGCACC GAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCA TACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACT

			ACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCCACCTGGCACCTAC AGGT/TCGAGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAA CATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCC ACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGC AACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCCTCCATCCAGGAGG TGAATCTTGTTCATATTCATGATTGTAGGAACCAACCCAGAGGTT CATCCAGATGGGGAGGCTGTTGGAGGGTGCTGACTAAGCTTGTT TTTATGAGAATCTTGGAATGGCTGGTCTGTTCAATTTCTTTGTTTGT TGGCTTGCTTTGTTGTCTTTGAAAGTGCCTTGCTAGCCCTAGAGA GGAAGAATTAGCCTGCTG
112	ADN	Trình tự Kozak	CCCGCCCGCCCACC
113	Prot.	hIGF1-Ea- del1-3, R37A, del71-72, R74Q, R77Q, R104Q-fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASR GSAGNKNYQMGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
114	PROT.	hIGF1-Ea- hFc_mut03	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTPIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASR GSAGNKNYQMGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
115	PROT.	peptit Ea đột biến 1	VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
116	PROT	hIGF1-Ea- hFc_mut 12	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCF RSCDLRRLEMYCAPLPAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASR GSAGNKNYQMGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
117	PROT.	IGF-1 (G42S)	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTSIVDEC CFRSCDLRRLEMYCAPLPAKSA
118	PROT.	hIGF1-Ea-mut 03-G42S	GPTLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDEC CFRSCDLRRLEMYCAPLPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNAS RGSAGNKNYRM

Cách thức thực hiện sáng chế

Cần hiểu rằng, sáng chế được mô tả chỉ bằng cách đưa ví dụ và các cải biến có thể được thực hiện mà vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế bộc lộ các biến thể của IGF-1 tái tổ hợp có ái lực với thụ thể giống như protein kiểu dại (Fig. 1), nhưng cho thấy đặc tính được động học *in vivo* tốt hơn IGF-1 kiểu dại (Fig. 7) và có thể được dùng để ngăn chứng teo cơ với việc sử dụng thường xuyên ít hơn (Fig. 8). Đối lập với các biến thể IGF-1 trước đó trong lĩnh vực kỹ thuật này, kích thích sự phosphoryl hóa thụ thể insulin (InsR) dẫn đến nguy cơ hạ đường huyết, sự bộc lộ của các protein tiền chất của IGF-1 được đột biến ở vị trí G42 (sự xóa hoặc sự thay thế đặc hiệu) cho thấy khả năng kích thích sự phosphoryl hóa thụ thể insulin (InsR) giống với kiểu dại, với sự giảm thiểu nguy cơ hạ đường huyết đã nêu (fig. 5/6/19). Hơn nữa, đối lập với hIGF-1 kiểu dại hoặc các biến thể của nó có trước đó trong lĩnh vực kỹ thuật này, sáng chế bộc lộ các biến thể của IGF-1 có thể được tạo ra với hàm lượng cao và không bị phân rã trong các hệ thống tế bào động vật có vú, cho phép sản xuất ở quy mô công nghiệp.

Phần A: Hệ thống phương pháp tổng quát

A1 Chất phản ứng

IGF-1 của người tái tổ hợp là của hãng Novartis AG và insulin của người tái tổ hợp được mua của hãng Promocell (#C-60212).

A2 Thiết kế vectơ

Một số sự lắp ráp vectơ theo gợi ý của sáng chế là khả thi. Do các yếu tố riêng lẻ của vectơ này đã được biết trước đó trong lĩnh vực kỹ thuật này, các vectơ thích hợp có thể được lắp ráp, ví dụ, bằng phương pháp giải trình tự hoặc khuếch đại và tách dòng các yếu tố di truyền cơ bản cách thích hợp và biểu hiện casset theo hướng mong muốn. Các phương pháp tách dòng tương ứng là phương pháp cốt yếu trong lĩnh vực kỹ thuật này và trình tự của các yếu tố di truyền được mô tả trên đây cũng được mô tả trước đó trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sau đó, sự tạo thành của các cấu trúc vectơ được mô tả bằng cách ví dụ. Tuy nhiên, những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này

hiểu rằng các phương án và các cách để thu được các vector tương ứng khác là thích hợp và có sẵn cách nhanh chóng. Tất cả các vector biểu hiện trong động vật có vú (ví dụ, pBW679) được mô tả trong phần này được dựa trên các vector biểu hiện trong động vật có vú được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2009080720. Phần ví dụ thực hiện sáng chế của đơn sáng chế quốc tế số WO2009080720, cụ thể là Fig. 1, bảng 1 và phần ví dụ II: thiết kế vector (trang 21031) được kết hợp ở đây bằng cách tham chiếu.

Việc tổng hợp mới hIGF1-Ea-delGPE-R37A) (SEQ ID NO.: 87) được đặt của hãng The Blue Heron Biotech giới hạn hai bên bằng Kozak đầu 5' (CCCGCCCGCCCAACC) (SEQ IDs NO.:112) và các vị trí giới hạn của HindIII/BamHI đầu 5' và EcoRI đầu 3' được vận chuyển trong vector pUC Blue Heron. Tách dòng lại vào vector pcDNA3.1 (Invitrogen, Life Technologies) được hoàn thành bằng phản ứng nối với các vị trí tách dòng thích hợp của BamHI đầu 5' và EcoRI đầu 3'. Cấu trúc được kiểm chứng toàn bộ trình tự sử dụng các môi đặc hiệu T7 và BGHA. Sau đó, phản ứng tạo đột biến điểm định hướng (Quick Change II site directed Mutagenesis Kit, Stratagene) được thực hiện để loại bỏ hai gốc R71 và S72 sử dụng cấu trúc hIGF1-Ea-delGPE-R37A/pCDNA3.1 trước đó. Cấu trúc hIGF1-Ea-delGPE-R37A-delRS thu được được dùng để tái tách dòng hIGF1-Ea (delGPE, R37A, delRS) vào vector biểu hiện trong động vật có vú pRS5a (Vector độc quyền của Novartis, NPL000961). pRS5a là vector biểu hiện trong động vật có vú dưới điều kiện promoter CMV, vị trí gắn đuôi polyadenyl từ gen BGH (hormon sinh trưởng của bò) và kháng ampicillin. hIGF1-Ea (delGPE, R37A, delRS)/pRS5a được bảo quản là NPL009759 (Vector độc quyền của Novartis).

hIGF1-Ea (del GPE, R37A, del RS) được khuếch đại từ NPL009759. Sản phẩm PCR được cắt bằng HindIII đầu 5'/BamHI đầu 3' và được tách dòng vào vector pRS5a-hIgG1 LALA (NPL012935, Vector độc quyền của Novartis). Một số vòng tạo đột biến điểm định hướng như được mô tả trên đây được thực hiện để chuyển plasmid này thành hIGF1-Ea (delGPE, R37A, delRS)-[R74Q-R78Q -R104Q] (NPL017580, Vector độc quyền của Novartis). Plasmid này được sử dụng làm cơ sở cho các quy trình nhân dòng tiếp theo được mô tả dưới đây.

Plasmid hIGF1-Ea-hFc_mut2: Khuếch đại phân đoạn PCR chứa các đột biến G42S từ NPL017580 sử dụng các oligo gây đột biến gen (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (SEQ ID NO.: 88) và

(5'TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGCTTGTCTGAGGCGCCGCC 3') (SEQ ID NO.: 89). Sử dụng vị trí enzym cắt giới hạn endonucleaza BlnI và BspEI để tách dòng phân đoạn PCR tạo ra này trở lại NPL017580.

Plasmit hIGF1-Ea-hFc_mut3: Khuếch đại phân đoạn PCR chứa các đột biến G42P từ NPL017580 sử dụng các oligo gây đột biến gen (5' TGACACTATAGAATAACATCCA CTTTGCC 3') (SEQ ID NO.: 90) và (5' TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGGGTGTCTGAGGCGCCGCC C 3') (SEQ ID NO.: 91). Sử dụng vị trí enzym cắt giới hạn endonucleaza BlnI và BspEI để tách dòng phân đoạn PCR tạo ra này trở lại NPL017580.

Plasmit hIGF1-Ea-hFc_mut4: Khuếch đại phân đoạn PCR chứa các đột biến A37E được khuếch đại từ NPL017580 sử dụng các oligo gây đột biến gen (5' TGACACTATAGAATAACATCCA CTTTGCC 3') (SEQ ID NO.: 92) và (5' TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGCCTGTCTGAGGCGCMNNC CGACTGCTGGAGCCATACCCTGTGG) (SEQ ID NO.: 93). Codon linh hoạt được đưa ra trong danh pháp IUPAC, trong đó M là ký hiệu cho các bazơ A hoặc C và N là ký hiệu cho các bazơ A, C, G hoặc T. Oligo này sau đó sẽ mang một codon linh hoạt cho vị trí 37. Sử dụng vị trí enzym cắt giới hạn endonucleaza BlnI và BspEI để tách dòng phân đoạn PCR tạo ra này trở lại NPL017580. Chọn lọc đột biến thay thế A37E bằng cách giải trình tự.

Plasmit hIGF1-Ea-hFc_mut12: Khuếch đại phân đoạn PCR mà chứa đột biến R36A-A37R từ NPL017580 sử dụng các oligo gây đột biến gen (5' TGACACTATAGAATAAC AT CCACTTTGCC 3') (SEQ ID NO.: 94) và (5' TGTCTGAGGCGCCCGCGCACTGCTGGA GCCATACCCTGTGGGC 3') (SEQ ID NO.: 95). Sử dụng vị trí nhận biết của enzym cắt giới hạn endonucleaza BlnI và SfoI để nhân dòng phân đoạn PCR tạo ra này trở lại NPL017580.

Plasmit hIGF1-Ea-hFc_mut13: Khuếch đại phân đoạn PCR mà chứa R36Q được khuếch đại từ NPL017580 (Vector độc quyền của Novartis) sử dụng các oligo gây đột biến gen (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (SEQ ID NO.: 96) và (5' TGTCTGAGGCGCCCGCCTGACTGCTG GAGCCATACCCTGTGG 3') (SEQ ID NO.: 97); Sử dụng vị trí nhận biết của enzym cắt giới hạn endonucleaza BlnI và SfoI để nhân dòng phân đoạn PCR tạo ra này trở lại NPL017580.

Cải biến các biến thể hIGF1-Ea-hFc mut4 và mut13 để đưa vào phân tử nổi khác (có nghĩa là SEQ ID 22 và 23): đã chọn lọc các trình tự của phân tử nổi từ vị trí cắt giới hạn của BspEI endonucleaza (tương ứng với gốc F49-R50 của IGF1) với AleI (trong phần Fc) được đặt mua của Geneart. Tách dòng các phân tử nổi bằng các phản ứng cắt và nối tiêu chuẩn để thu các plasmid hIGF1-Ea-hFc_mut4_E, hIGF1-Ea-hFc_mut13_E và hIGF1-Ea-hFc_mut13_A. Trong bước kế tiếp, đột biến G42S được đưa vào.

Plasmid hIGF1-Ea-hFc_mut4/2_E và hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_E: Khuếch đại phân đoạn PCR chứa các đột biến G42S từ plasmid hIGF1-Ea-hFc_mut2 sử dụng các oligo (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (SEQ ID No.: 88) và (5' CGGTACGTGC TGGCGTACTGCTCCTCCCGCGGCTTTG 3') (SEQ ID No.: 98). Sử dụng các trình tự cắt của enzym giới hạn endonucleaza BspEI và SfoI để nhân dòng phân đoạn PCR tạo ra này thành các plasmid hIGF1-Ea-hFc_mut4_E và hIGF1-Ea-hFc_mut13_E.

Plasmid hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_A: Khuếch đại phân đoạn PCR chứa các đột biến G42S-R36Q từ hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_E sử dụng các oligo (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (SEQ ID No.: 88) và (5' CGGTACGTGC TGGCGTACTGCTCCTCCCGCGGCTTTG 3') (SEQ ID No.: 98). Sử dụng vị trí cắt của enzym giới hạn endonucleaza BspEI và SfoI để nhân dòng phân đoạn PCR tạo ra này thành plasmid hIGF1-Ea-hFc_mut13_A.

A3 Sản xuất protein tái tổ hợp

Sản xuất quy mô nhỏ:

Sử dụng hai phương pháp chuyển nhiễm khác nhau, dựa trên FuGene và polyetylenimin (PEI), để tạo ra các biến thể IGF1-Fc.

Chuyển nhiễm (PEI) vào 100ml dung dịch nuôi cấy 293F HEK theo các bước dưới đây: Pha loãng 100µg ADN plasmid trong nước, trong 7ml môi trường biểu hiện FreeStyle (GIBCO, Cat. 12338026) trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Pha loãng 300µg PEI (từ dung dịch PEI gốc nồng độ 1mg/mL) trong 7ml môi trường biểu hiện FreeStyle ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, trộn dung dịch ADN và PEI này với nhau và ủ trong thời gian 15 phút trước khi bổ sung 36ml dung dịch nuôi cấy tế bào 293F HEK ở mật độ khoảng $1,4 \times 10^6$ tế bào/mL trong bình nuôi lắc dung tích 500ml. Ủ

môi dung dịch nuôi cấy này trong thiết bị Kuehner-Shaker ISF1-X (Kuehner) cài đặt tốc độ quay ở 100 vòng/phút, nồng độ CO₂ là 6%, và nhiệt độ 37°C trong thời gian 6 ngày. Sau đó, tinh sạch các biến thể IGF1-Fc từ dịch nổi trong của dung dịch nuôi cấy tế bào bằng sắc ký protein A sử dụng cột HiTrap MabSelect Sure thể tích 1ml (GE Healthcare) trên hệ thống Avant AKTA (GE Healthcare). Sau khi rửa đường nền bằng PBS, chất liệu đã gắn trên cột được chiết bằng xitrat nồng độ 50mM, độ pH là 3,0, NaCl nồng độ 150mM và ngay lập tức được trung hòa.

Chuyển nhiễm FuGENE HD Transfection Reagent (Roche) vào 100ml dung dịch nuôi cấy HEK 293F theo các bước dưới đây: Pha loãng 100µg ADN plasmit trong nước, trong 1ml môi trường biểu hiện FreeStyle (GIBCO, Cat. 12338026) được giữ ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung thêm 400µl FuGENE vào dung dịch ADN pha loãng và ủ hỗn hợp này trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, bổ sung 98,6ml dung dịch nuôi cấy tế bào 293F HEK (Invitrogen) có mật độ tế bào khoảng $0,5 \times 10^6$ tế bào/mL vào 1,4ml hỗn hợp ADN-FuGENE này trong bình thót cổ dung tích 500ml. Ủ dung dịch nuôi cấy này trong thiết bị Kuehner-Shaker ISF1-X (Kuehner) cài đặt tốc độ quay ở 100 vòng/phút, nồng độ CO₂ là 6%, và nhiệt độ 37°C trong thời gian 7 ngày. Sau đó, tinh sạch các biến thể IGF1-Fc sau đó từ dịch nổi trong của dung dịch nuôi cấy tế bào bằng sắc ký protein A sử dụng cột HiTrap MabSelect Sure thể tích 1ml (GE Healthcare) trên hệ thống Avant AKTA (GE Healthcare). Chất liệu đã gắn trên cột được chiết bằng xitrat nồng độ 50mM, độ pH là 3,0, NaCl nồng độ 150mM và ngay lập tức được trung hòa.

Sản xuất quy mô trung bình:

Chuyển nhiễm polyetylenimin (PEI) vào 9,5L dung dịch nuôi cấy HEK 293 theo các bước như sau: ủ 10mg ADN plasmit trong dung dịch đệm TE trong 250ml môi trường OptiMEM1 ở nhiệt độ trong phòng [Gibco Cat. No # 11058-021] trong thời gian 5 phút. Bổ sung 250ml môi trường OptiMEM1 ở nhiệt độ trong phòng (Gibco Cat.no# 11058-021) vào 20mg Polyetylenimin (PEI) (từ dung dịch PEI gốc nồng độ 1mg/mL). Sau đó trộn các dung dịch ADN và PEI này với nhau và ủ trong thời gian 15 phút. Bổ sung thêm 9,5L môi trường HEK ở nồng độ trong khoảng $0,75 \times 10^6$ tế bào/mL và $1,25 \times 10^6$ tế bào/mL vào 500ml hỗn hợp ADN-PEI. Nuôi cấy các tế bào đã chuyển nhiễm ở nhiệt độ 37°C trong túi tế bào Wave dung tích 20L (GE Healthcare, # CB0020L10-03). Đặt túi tế bào này trong hệ thống Wave System 20/50 EHT cài đặt ở tốc độ lắc 25

vòng/phút, góc lắc 7°, nồng độ CO₂ là 7%, lưu lượng không khí 0,50L/phút, và nhiệt độ 37°C. Các cấu trúc dung hợp Fc được bắt giữ từ dịch nổi môi trường nuôi cấy cô đặc bằng sắc ký protein A. Sau khi rửa đường nền bằng PBS, chất đã gắn được rửa giải bằng xitrat nồng độ 50mM, pH 2,7, NaCl nồng độ 140mM và được trung hòa ngay lập tức. Sau đó, cô đặc phân đoạn đã trung hòa này bằng sắc ký siêu lọc và sắc ký kích thước qua cột Superdex 200 trong PBS để loại bỏ các kết cụm nhiễm. Độ tinh sạch của chất này là >95% được kiểm chứng bằng cả phân tích điện di SDS-PAGE và phân tích LC-MS.

A4 Đánh giá mức độ kết cụm bằng SEC-MALS

Kiểm tra mức độ kết cụm các biến thể IGF-1-Fc đã tinh sạch bằng Protein A bằng các phép đo sắc ký loại bỏ kích thước cùng với máy phát hiện phân tán ánh sáng đa góc (SEC-MALS) được thực hiện trên hệ thống HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies) được nối với máy phát hiện phân tán ánh sáng ba góc (miniDAWN Treos, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA). Nồng độ của mẫu thử nghiệm được theo dõi trực tuyến bằng máy đo khúc xạ tán xạ (Optilab rEX, Wyatt Technology) sử dụng giá trị độ lớn của chỉ số khúc xạ đặc hiệu (dn/dc) là 0,186mL/g. 50ul thể tích mẫu được nạp lên cột Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). Ghi lại dữ liệu và xử lý bằng phần mềm ASTRA V (Wyatt Technology). Để xác định các thể tích làm chậm máy phát hiện và các hệ số chuẩn hóa cho máy phát hiện MALS, sử dụng mẫu BSA (Sigma, A8531) làm tham chiếu. Không áp dụng sự khử xung hay mở rộng dải điều chỉnh.

A5 Nuôi cấy tế bào

Thu nhận các tế bào cơ xương của người (skMC) từ hãng Cambrex (#CC-2561). Nguyên bào cơ sơ cấp của người được nuôi cấy trong môi trường sinh trưởng [SkGM chứa 20% huyết thanh nhau thai bò (FBS, # 2-01F40-1, Amimed) và 0,1% gentamycin]. Sau 4-5 ngày (ở nhiệt độ 37°C, nồng độ CO₂ là 5% CO₂ và độ ẩm là 95%), các tế bào được phân tán trong môi trường sinh trưởng ở mật độ 150.000 tế bào/giếng và sinh trưởng (ở nhiệt độ 37°C, nồng độ CO₂ là 5% CO₂ và độ ẩm là 95%). Vào ngày thứ 3 sau khi phân tán nguyên bào cơ skMC được sử dụng cho các thí nghiệm truyền tín hiệu. NIH3T3-IGF-1R và NIH3T3-InsR được bảo quản trong D-MEM chứa 10% FBS, 100U/ml penicillin, và 100µg/ml streptomycin. Nguyên bào cơ sơ cấp của cynomolgus

được phân lập từ cơ sinh đôi của *Macaca fascicularis*, khỉ đuôi dài *cynomolgus*. Các tế bào được nuôi cấy trong SkBM chứa 20% huyết thanh nhau thai bò (FBS, # 2-01F40-1, Amimed) và 0,1% gentamycin (Life Technologies, #15750-037). Tế bào tạo mỡ 3T3-L1 và tế bào C2C12 nhận được từ American Type Culture collection (tương ứng là ATCC-CL-173 và ATCC; #91031101). Các tế bào tạo mỡ được cất giữ trong DMEM, Glucoza cao, 1,5g/L NaHCO₃ (ATTC # 30-2002) và sự biệt hóa được khởi đầu bằng sự bổ sung thêm DMEM, chứa 10% FCS, 1% penixilin/streptomycin, 0,5mM IBMX, 1 μ M dexamethason. Các nguyên bào cơ C2C12 được biệt hóa ở ngày thứ 3 sau khi được phân tán. Để làm như vậy, các tế bào được rửa bằng môi trường biệt hóa (DM) bao gồm DMEM được bổ sung 2% huyết thanh ngựa bất hoạt bằng nhiệt (HS; #US 14-403F, Cambrex), 1% penixilin/streptomycin và 1% glutamin và sau đó ủ trong DM trong thời gian 72 giờ ở nhiệt độ 37°C, nồng độ CO₂ là 5% và độ ẩm là 95%.

A6 Biacore

Xác định đặc điểm của các tính chất gắn kết bằng SPR sử dụng thiết bị Biacore T200 ở nhiệt độ 25°C. Ba con chip CM5 (GE, BR-1005-30) được chuẩn bị bằng cách áp dụng quy trình kết cặp amit tiêu chuẩn. Dòng tế bào chảy 1 được cố định để trống để làm đối chứng, trong khi IGF-1 và hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A được cố định trên dòng tế bào chảy đo lường 2 và 3. Mức độ cố định được biến đổi theo từng tương tác riêng lẻ và nằm trong khoảng từ 20RU–143RU (IGF-1) và từ 32RU–113RU (hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A). Chuẩn bị các dải pha loãng của IGF-1R của người tái tổ hợp (R&D Systems, 391-GR) trong dung dịch đệm chạy, HBS-EP+ 1x (Teknova, H8022) chứa xitrat 30mM và 0,05% BSA, và được nạp vào chip ở tốc độ chảy là 50 μ l/phút. Các khoảng nồng độ chất phân tích được thay đổi với từng tương tác riêng lẻ và nằm trong khoảng từ 1000nM–3,9nM (IGF-1R). Các phối tử được tái tạo bằng cách nạp từ từ dung dịch đệm rửa giải Ag/Ab (Thermo Scientific, 21027) trong thời gian 90 giây ở tốc độ 50 μ l/phút. Các hằng số tốc độ động học và KD được tính toán bằng các khớp đồ thị sensorgram tham chiếu hai lần với một mô hình gắn kết 1:1.

A7 ELISA

Để phân tích mức độ phosphoryl hóa IGF-1R, trải các tế bào lên các đĩa 6-giếng nuôi cấy trong môi trường sinh trưởng trong thời gian 24 giờ (với NIH3T3-IGF-1R) hoặc 72 giờ (với nguyên bào cơ sơ cấp của người và khỉ đuôi dài *cynomolgus*). Các tế

bào bị bỏ đói trong thời gian 24 giờ (với NIH3T3-IGF-1R) hoặc 4 giờ (với nguyên bào cơ sơ cấp của người và khỉ đuôi dài cynomolgus) và sau đó được kích thích với các peptit chỉ thị trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 37°C. Ly giải các tế bào bằng dung dịch đệm PhosphoSafe (Cell Signaling) chứa nhiều loại chất ức chế proteaza và làm sạch bằng ly tâm ở tốc độ 14,000g trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 4°C và phân tích mức độ phosphoryl hóa IGF-1R bằng ELISA sử dụng kit DuoSet IC human phosphor-IGF-1R kit (R&D Systems).

Để phân tích mức độ phosphoryl hóa thụ thể insulin, trải các tế bào NIH3T3-InsR lên đĩa 6 giếng với mật độ $0,2 \times 10^6$ tế bào/giếng và được nuôi cấy trong môi trường sinh trưởng trong thời gian 24 giờ. Các tế bào thử nghiệm bị bỏ đói trong thời gian 18 giờ trong môi trường không chứa huyết thanh và sau đó được kích thích với các phối tử khác nhau ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 10 phút. Ly giải tế bào theo như được mô tả trên đây và phân tích mức độ phosphoryl hóa InsR bằng ELISA sử dụng kit DuoSet IC human phosphor-InsR ELISA (R&D Systems).

A8 Hấp thụ glucoza

Để đo sự hấp thụ glucoza, phân tán các tế bào tạo mỡ 3T3-L1 và tế bào ống cơ C2C12 vào các đĩa 24 giếng và được nuôi cấy trong môi trường DMEM không có huyết thanh trong thời gian 4 giờ. Thay thế môi trường DMEM không có huyết thanh với dung dịch đệm KRP (130mM NaCl, 1,3mM MgSO₄, 1,3mM CaCl₂, 5mM KCl và 10mM Na₂HPO₄) hoặc HBS (140mM NaCl, 2,5mM MgSO₄, 1,0mM CaCl₂, 5mM KCl và 10mM Hepes) tương ứng cho các tế bào tạo mỡ 3T3-L1 và các tế bào C2C12. Các tế bào được xử lý với các peptit đặc hiệu trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sự hấp thụ glucoza được đo bằng việc bổ sung 0,4μCi (tế bào sinh mô mỡ) hoặc 0,8μCi (C2C12) [3H] 2-deoxy-D-glucoza và 0,1mM (tế bào tạo mỡ) hoặc 0,01mM (C2C12) 2-deoxy-D-glucoza trong thời gian 10 phút (tế bào tạo mỡ) hoặc 5 phút (C2C12) ở nhiệt độ trong phòng. Hút bỏ môi trường khỏi đĩa thử nghiệm và thử nghiệm này được kết thúc bằng việc bổ sung thêm dung dịch đệm KRP hoặc HBS chứa 1μM xytochalsin B. Sau đó, rửa các tế bào thử nghiệm bằng PBS trong đá lạnh và ly giải sử dụng NaOH nồng độ 0,2M và độ phóng xạ được phân tích bằng cách đếm sự nhấp nháy (xem các Fig. 5/6).

A9 Biểu đồ thử nghiệm được động học

Chuột đực hoàn chỉnh (n=3 con/nhóm) đã nhận hIGF-1-Ea-Fc_mut 13/2_A hoặc hIGF-1-Ea-Fc_mut 04/2_E ở nồng độ 10mg/kg hoặc hIGF-1 (1mg/kg) bằng cách truyền trong tĩnh mạch (i.v.) nhanh hoặc tiêm dưới da. Các mẫu máu theo chuỗi liên tiếp được thu ở 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 168 giờ và 336 giờ sau khi dùng các biến thể của IGF-1 hoặc 0,083 giờ, 0,25 giờ, 0,5 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ và 24 giờ sau khi dùng hIGF-1. Nồng độ của các protein tái tổ hợp trong huyết thanh được xác định bằng ELISA.

A10 Tác động của hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A đối với hiện tượng teo cơ cảm ứng bởi dexamethason.

Pha loãng dexamethasone (Dex) trong PBS để đạt đến liều lượng chứa 0,075mg/kg/ngày với mô hình 2ML2 Alzet trong thời gian 28 ngày. Kết hợp Dex với hIGF-1 có liều lượng 3,8mg/kg/ngày trong nhóm C trong các bơm siêu nhỏ. Kết hợp điều trị Dex cách ngày với điều trị dưới da của hIGF1-Ea-Fc_13/2_A trong các nhóm D, E và F ở các liều lượng chứa tương ứng là 3mg/kg, 10mg/kg và 30mg/kg. Các bơm được nạp dung dịch này và được giữ trong vài giờ ở nhiệt độ 37°C trong PBS cho đến khi cấy ghép bằng phẫu thuật. Chuột thử nghiệm được điều trị dưới da với Temgesic ở liều lượng là 0,02mg/kg với thể tích là 1mL/kg ít nhất là 30 phút trước phẫu thuật, và sau đó các bơm đã điền dung dịch được đề cập trên đây được cấy dưới da vào phần lưng của chuột thử nghiệm được gây mê bằng isofluran nồng độ là 3%. Temgesic được dùng dưới da cho chuột thử nghiệm ở thời điểm 24 giờ và 48 giờ sau phẫu thuật. Chuột thử nghiệm trong các nhóm A, B và C được điều trị PBS tiêm dưới da hằng ngày. Trọng lượng cơ thể được đo hai lần/tuần. Bốn tuần sau khi điều trị chuột thử nghiệm được gây chết êm dịu bằng CO₂, và các cơ của chúng được phân lập và đo trọng lượng.

Phần B: Các ví dụ thực hiện

Phân tử có trước đó trong lĩnh vực kỹ thuật này chứa peptide Ea, trong đó các gốc protein E3, R71 và S72 được xóa đi và axit amin R37 được thay thế bằng alanin (hIGF1-Ea-Fc-mut 3) (SEQ ID NO.: 27) được tạo ra và kiểm thử.

Ví dụ 1: Sự chế tạo các vector biểu hiện ADN

1.1. Vector biểu hiện ADN mã hóa polypeptit tiền chất của hIGF-1-Ea chứa các cải biến sau đây được xây dựng như được mô tả trước đó: hIGF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (bao gồm

phần Fc từ hIgG1 mang đột biến L234A L235A ("LALA") làm im lặng chức năng hiệu ứng (SEQ ID No.: 9); trong đó xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R36 bằng glutamin (Q), thay thế R37 bằng alanin và xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74, R77 và R104 thành glutamin (Q); và nối vector này với vùng Fc LALA của IgG1.

Kết quả này trong trình tự protein tiết dưới đây:

(SEQ ID NO.: 9)

TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRL
 EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMCPPCPAPE
 AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

1.2 Vector biểu hiện ADN mã hóa polypeptit tiền chất của hIGF-1-Ea chứa các cải biến sau đây được xây dựng như được mô tả trong phần A2 nêu trên:

hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (bao gồm vùng Fc LALA hIgG1): protein tiền chất của IGF-1 người, trong đó xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng axit glutamic (E) và xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74, R77 và R104 thành glutamin (Q); và nối với vùng Fc LALA của IgG1.

Kết quả trong trình tự protein tiết dưới đây:

(SEQ ID NO.: 12)

TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRL
 EMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMDKTHTCPP
 CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK

Trên cơ sở các nguyên tắc đã vạch ra trên đây, các protein khác dưới đây đã được tạo ra:

Ví dụ 54 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E; SEQ ID NO.:8)

Ví dụ 56 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C; SEQ ID NO.: 10)

Ví dụ 50 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F; SEQ ID NO.: 11)

Ví dụ 58 (hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A; SEQ ID NO.: 13)

Ví dụ 59 (hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F; SEQ ID NO.: 14)

1.3. Vector biểu hiện ADN mã hóa polypeptit hIGF-1 chứa các biến đổi sau được xây dựng sử dụng các phương pháp xây dựng vector ADN/các phương pháp thao tác ADN đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này: hIgF1 G42S (SEQ ID No.: 117);

Kết quả trong trình tự protein dưới đây:

(SEQ ID NO.: 117)

GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTSIVDECCFRSCDL
RRLEMYCAPLKPAKSA

1.4. Vector biểu hiện ADN mã hóa polypeptit hIGF-1 chứa các cải biến sau được xây dựng sử dụng các phương pháp xây dựng vector ADN/các phương pháp thao tác ADN đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này: hIGF1-Ea-mut 03-G42S (SEQ ID No.: 118);

Kết quả trong trình tự protein dưới đây:

(SEQ ID NO.: 118)

GPTLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLR
RLEMYCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYRM

Ví dụ 2: Sự thách thức Proteaza của các biến thể IGF-1-Fc

Các protein đã tạo ra trong các hệ thống biểu hiện trong tế bào động vật có vú, như là, ví dụ, CHO, có thể chống chịu sự thủy phân của các protein phân giải trong suốt quá trình biểu hiện. Để đánh giá hiệu quả tiềm năng độ nhạy với proteaza trong suốt quá trình sản xuất tiêu chuẩn, chúng tôi đã phát triển thử nghiệm thách thức proteaza sử dụng protein tinh sạch và môi trường điều kiện từ dịch nuôi tế bào CHO. So sánh thử nghiệm này với kiểu phân cắt quan sát được của biến thể IGF-1-Fc được tạo ra trong tế bào CHO cung cấp sự thẩm định phép thử. Tóm lại, các tế bào CHO được nuôi cấy (nhiệt độ 37°C, nồng độ CO₂ là 6%, độ ẩm tương đối là 85%, tốc độ quay 90-150 vòng/phút) trong môi trường CHODM122 từ mật độ 2E5 tế bào/ml lên đến 1E7 tế

bào/ml. Dịch nổi trong cung cấp môi trường điều kiện được sử dụng trong thử nghiệm này. Các biến thể IGF-1-Fc được tinh sạch như được mô tả trên đây (A3) và được châm vào trong môi trường điều kiện hoặc trong PBS làm đối chứng ở nồng độ là 100ug/ml. Sau khi lọc khử trùng, ủ các mẫu thử nghiệm ở nhiệt độ 37°C lên đến 20 ngày và lấy các mẫu cần được phân tích ở các mốc thời gian khác nhau. Các sản phẩm có độ phân hủy khác nhau có thể được phân lập tốt bằng các kỹ thuật SDS-PAGE tiêu chuẩn (NuPAGE Bis-Tris, Invitrogen) và cường độ các băng của sự phân cắt được định lượng theo tỷ trọng. Các kết quả này được cho thấy ở Fig. 17.

Ví dụ 3: Ái lực gắn kết cao của hIGF-1 và tương tự với IGF-1R của người tái tổ hợp

Ái lực gắn kết cao của hIGF-1 và các biến thể của IGF-1 với rhIGF1R được đo bằng cách sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt (Biacore). Thực hiện thử nghiệm gắn kết trực tiếp. Cố định IGF-1-Ea_Fc_Mut_13/2_A của người và hIGF-1 trên chip và thụ thể IGF-1 cung cấp vai trò của chất phân tích trong dung dịch. Các đồ thị sensorgram thu được được khớp với mô hình tương tác 1:1 để tính toán các hằng số phân ly cân bằng (KD). Các kết quả này cho thấy rằng sự gắn kết của hIGF-1-Ea_Fc_Mut_13/2_A với IGF-1R là tương đương với hIGF-1 (Fig. 1).

Ví dụ 4: Cảm ứng phosphoryl hóa IGF-1R

Khả năng hIGF-1 và các biến thể của hIGF-1 để kích thích sự phosphoryl hóa IGF-1R được đánh giá trước tiên trong các tế bào NIH3T3 biểu hiện quá mức IGF-1R của người (NIH3T3-IGF-1R) bằng thử nghiệm ELISA. Trong các tế bào này sự phosphoryl hóa IGF-1R được cảm ứng theo phương thức phụ thuộc nồng độ bằng tất cả các peptit kiểm thử. Khớp số liệu trung bình của thử nghiệm ELISA với đường cong sinh trưởng cho thấy rằng tính hiệu lực (EC₅₀) của hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-Fc và hIGF1-Ea -Fc_mut_04/2_E bị giảm so với hIGF-1 (Fig. 2A-B). Tuy nhiên khớp số liệu trung bình của thử nghiệm ELISA với đường cong sinh trưởng đã mang lại một giá trị đáp ứng khá tương đương của tất cả các peptit kiểm thử (Fig. 2C-D). Khả năng của các biến thể của hIGF-1 và hIGF-1 để kích thích sự phosphoryl hóa IGF-1R nội sinh được đánh giá trong nguyên bào cơ sơ cấp của người và trong nguyên bào cơ sơ cấp của khỉ đuôi dài cynomolgus. Trong các tế bào này sự phosphoryl hóa IGF-1R được cảm ứng theo phương thức phụ thuộc nồng độ của tất cả các peptit kiểm thử (Fig. 4B-C). Đường cong sinh trưởng khớp với số liệu ELISA trung bình cho thấy rằng tính

hiệu lực (EC_{50}) của các biến thể của hIGF-1 là E bị giảm so với hIGF-1 (Fig. 4A). Tuy nhiên, đường cong sinh trưởng khớp dữ liệu ELISA trung bình tạo ra giá trị đáp ứng tối đa có thể so sánh được của tất cả các peptit kiểm thử (Fig. 4).

Ví dụ 5: Tính đặc hiệu với thụ thể insulin

Để kiểm tra các biến đổi axit amin của các biến thể của IGF-1 ảnh hưởng đến tính đặc hiệu thụ thể, phân tích các tác động của các peptit biến thể IGF-1 lên sự phosphoryl hóa InsR trong NIH3T3 biểu hiện quá mức InsR của người bằng ELISA. Chúng tôi xử lý các thể biến nạp của tế bào NIH3T3-InsR với các nồng độ khác nhau của biến thể IGF-1, hIGF-1 và insulin. Các nồng độ đẳng mol của các peptit đã đề cập này được sử dụng. Kết quả của các thí nghiệm này được biểu diễn trong Fig. 3/18. Các cải biến đã ảnh hưởng đến độ đặc hiệu thụ thể của hầu hết các biến thể của IGF-1 ngoại trừ các biến thể mang đột biến G42S (hIGF1-Ea -Fc_mut_02, hIGF1-Ea -Fc_mut_03, hIGF1-Ea -Fc_mut_04/2_E và hIGF1-Ea -Fc_mut_13/2_A) được cho thấy là giữ được độ đặc hiệu thụ thể và là chất cảm ứng yếu sự phosphoryl hóa InsR thậm chí ở các nồng độ mà insulin sẽ cho các đáp ứng tối đa. Ngạc nhiên là, hIGF1-Ea Fc_mut_13/2_A và hIGF1-Ea Fc_mut_04/2_E đã cho thấy hiệu lực kém hơn đáng kể so với IGF-1 lên các chức năng tác động điều khiển bằng cách nhanh chóng gắn kết thụ thể insulin (ví dụ, hấp thụ glucoza trong tế bào tạo mỡ biệt hóa) như được trình bày trong Fig. 5B và D và trong Fig. 6. Ngược lại, hIGF1-Ea Fc_mut_13/2_A và hIGF1-Ea Fc_mut_04/2_E và hIGF-1 là đẳng thay thế với các chức năng trung gian bởi IGF-1R như là hấp thụ glucoza trong các tế bào ống cơ C2C12 (Fig. 5A và C). Đưa đột biến G42S vào protein IGF-1 (thu được trong biến thể G42S IGF-1 có SEQ ID NO.:117) cũng như đưa vào protein hIGF1-Ea-mut 03 (thu được trong biến thể hIGF1-Ea-mut 03- G42S có SEQ ID NO.:118) làm giảm sự phosphoryl hóa InsR (Fig. 18) trong các tế bào NIH3T3-InsR này. Hơn thay thế nữa, các đột biến đã nêu có sự tác động lên sự hấp thụ glucoza tương ứng trong tế bào tạo mỡ và các tế bào ống cơ C2C12 (Fig. 19).

Ví dụ 6: Sự xác định nồng độ huyết thanh

Các nồng độ hIGF1-Ea-Fc-mut_13/2_A huyết thanh và hIGF1-Ea.Fc_mut_04/2_E huyết thanh sau khi dùng đơn liều i.v. và đơn liều s.c. trong chuột đực Fischer thử nghiệm (n=3) đã được xác định bằng ELISA đặc hiệu cho hIGF-1Ea 3mut (với các chi tiết như trong phần A5 nêu trên). Các kết quả của các thí nghiệm này

được trình bày trong các Fig. 7-A và 7-B. Thời gian bán rã tương ứng là khoảng 75,3 giờ và 50,1 giờ. Nồng độ tối đa được đạt đến tương ứng là sau 8 giờ và 24 giờ (T_{max}) với sử dụng liều lượng s.c.. Ngược lại, sau khi dùng trong tĩnh mạch, hIGF-1 (1,0mg/kg), các nồng độ của hIGF-1 có thể định lượng được qua một khoảng thời gian từ 0-8 giờ. Sau T_{max} (0,083 giờ) được đạt đến một sự giảm nhanh chóng nồng độ huyết thanh của peptit đã được quan sát thấy thu được trong thời gian bán rã biểu kiến là 1,81 giờ. Sau khi dùng hIGF-1 (1,0mg/kg) dưới da, các nồng độ huyết thanh là có thể định lượng được lên tới 8 giờ sau khi dùng liều và nồng độ cao nhất được quan sát thấy là ở 0,5 giờ sau khi dùng liều lượng này. Vì vậy, các chất tương tự IGF-1 biểu diễn biểu đồ thử nghiệm được động học cải thiện hơn nhiều so với IGF-1 của người.

Ví dụ 7: Các tác động của hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A đối với hiện tượng teo cơ cảm ứng bởi dexamethason

Do IGF-1 đã được chứng minh là kích thích sự tổng hợp protein và ức chế sự phân rã protein trong cơ xương, chúng tôi đã kiểm tra việc dùng hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A cho chuột thử nghiệm được xử lý với dexamethason có thể ngăn cản chứng teo cơ. Chuột đực Wistar thử nghiệm được truyền liên tục 75µg dexamethason/kg/ngày có thể là dùng một mình hoặc cùng với chất dẫn thuốc (PBS), hoặc hIGF-1 thông qua bơm Alzet. Nhóm các động vật thử nghiệm ngoài được truyền dexamethasone như được mô tả trên đây còn nhận hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A bằng cách tiêm dưới da cách ngày. Tất cả các động vật được điều trị trong hai mươi tám ngày và sau đó bị làm chết. Trọng lượng cơ thể được giám sát vào lúc bắt đầu thí nghiệm này và sau đó là vào ngày thứ 28 sau khi tiêm.

Như đã dự đoán, sự giảm đáng kể trọng lượng cơ thể và trọng lượng cơ đã được quan sát thấy trong chuột thử nghiệm điều trị dexamethason khi so sánh với chuột điều trị bằng chất dẫn thuốc đối chứng (Fig. 8). Việc tiêm hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A đã làm giảm đáng kể sự mất trọng lượng cơ thể và trọng lượng cơ (Fig. 8).

Ngoài các biến thể polypeptit tiền chất của hIGF-1-Ea được mô tả trên đây, các biến thể protein khác dưới đây có thể được tạo ra và được sử dụng theo như sáng chế:

Ví dụ 8

(2b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R36 bằng glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin và xóa các axit amin R71 và S72.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqke
vhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:32).

Ví dụ 9

(4b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng axit glutamic (E), thay thế G42 bằng serin và xóa các axit amin R71 và S72.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqke
vhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:33).

Ví dụ 10

(5b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng alanin, thay thế G42 bằng serin và xóa các axit amin R71 và S72.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqke
vhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:34).

Ví dụ 11

(6b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng prolin (P), thay thế G42 bằng serin và xóa các axit amin R71 và S72.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqke
vhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:35).

Ví dụ 12

(8b) xóa G1, P2, E3, thay thế cả hai axit amin R36 và R37 bằng glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin và xóa các axit amin R71 và S72.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqk
evhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:36).

Ví dụ 13

(9b) G1, P2, E3 xóa, thay thế axit amin R36 bằng glutamin (Q), thay thế R37 bằng alanin, thay thế G42 bằng serin và xóa các axit amin R71 và S72.

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqke
vhlknsargsagnknyrm (SEQ ID NO.:37).

Ví dụ 14

(13b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R36 bằng glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến axit amin R74 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqrhtdmpktqk
evhlknsargsagnknyrm (SEQ ID NO.:38).

Ví dụ 15

(14b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R36 bằng glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74 và R77 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqk
evhlknsargsagnknyrm (SEQ ID NO.:39).

Ví dụ 16

(15b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R36 glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74, R77 và R104 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqk
evhlknsargsagnknyqm (SEQ ID NO.:40).

Ví dụ 17

(16b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng axit glutamic (E), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến axit amin R77 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrappqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqqhtdmpktqke
vhlknsargsagnknyrm (SEQ ID NO.:41).

Ví dụ 18

(17b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng axit glutamic (E), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74 và R77 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplpaksavqaqqhtdmpktqk
evhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:42).

Ví dụ 19

(18b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng axit glutamic (E), thay thế G42 bằng serin, các xóa axit amin R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74, R77 và R104 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplpaksavqaqqhtdmpktqk
evhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.:43).

Ví dụ 20

(19b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng alanin (A), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến axit amin R74 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplpaksavqaqrhtdmpktqke
vhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:44).

Ví dụ 21

(20b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng alanin (A), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74 và R77 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplpaksavqaqqhtdmpktqk
evhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:45).

Ví dụ 22

(21b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng alanin (A), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74, R77 và R104 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplpaksavqaqqhtdmpktqk
evhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.:46).

Ví dụ 23

(22b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng prolin (P), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến axit amin R74 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplpaksavqaqrhtdmpktqk
evhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:47).

Ví dụ 24

(23b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng prolin (P), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74 và R77 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplpaksavqaqqhtdmpktqk
evhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:48).

Ví dụ 25

(24b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng prolin (P), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74, R77 và R104 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplpaksavqaqqhtdmpktqk
evhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.:49).

Ví dụ 26

(25b) xóa G1, P2, E3, thay thế cả hai axit amin R36 và R37 bằng glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến axit amin R74 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplpaksavqaqrhtdmpktqk
evhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:50).

Ví dụ 27

(26b) xóa G1, P2, E3, thay thế cả hai axit amin R36 và R37 bằng glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74 và R77 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplpaksavqaqqhtdmpktqk
evhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:51).

Ví dụ 28

(27b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R36 bằng glutamin (Q), thay thế R37 bằng alanin, thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74 và R77 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqk
evhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:52).

Ví dụ 29

(28b) xóa G1, P2, E3, thay thế cả hai axit amin R36 và R37 bằng glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74, R77 và R104 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqk
evhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.:53).

Ví dụ 30

(29b) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R36 bằng glutamin (Q), thay thế R37 bằng alanin, thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74, R77 và R104 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqk
evhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.:54).

Ví dụ 31

(2c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R36 bằng glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72.

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraqrhtdmpktqkevhl
knasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:55).

Ví dụ 32

(4c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng axit glutamic (E), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72.

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraqrhtdmpktqkevhl
knasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:56).

Ví dụ 33

(5c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 alanin, thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72.

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrpaqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraqrhtdmpktqkevhl
knasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:57).

Ví dụ 34

(6c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng prolin (P), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72.

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraqrhtdmpktqkevhl
knasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:58).

Ví dụ 35

(8c) xóa G1, P2, E3, thay thế cả hai axit amin R36 và R37 bằng glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin và xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72.

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaqvraqrhtdmpktqkev
hlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:59).

Ví dụ 36

(9c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R36 bằng glutamin (Q), thay thế R37 bằng alanin, thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72.

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraqrhtdmpktqkevhl
knasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:60).

Ví dụ 37

(13c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R36 bằng glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin và xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến axit amin R74 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqrhtdmpktqkevhl
knasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:61).

Ví dụ 38

(14c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R36 bằng glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin và xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74 và R77 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevh
lknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:62).

Ví dụ 39

(15c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R36 bằng glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74, R77 và R104 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevh
lknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.:63).

Ví dụ 40

(16c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng axit glutamic (E), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến axit amin R74 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqrhtdmpktqkevh
knasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:64).

Ví dụ 41

(17c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng axit glutamic (E), Thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74 và R77 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevh
lknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:65).

Ví dụ 42

(18c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng axit glutamic (E), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74, R77 và R104 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevh
lknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.:66).

Ví dụ 43

(19c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng alanin (A), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến axit amin R74 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqrhtdmpktqkevhl
knasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:67).

Ví dụ 44

(20c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng alanin (A), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74 và R77 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhl
lknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:68).

Ví dụ 45

(21c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng alanin (A), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74, R77 và R104 thành glutamin

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhl
lknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.:69).

Ví dụ 46

(22c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng prolin (P), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến axit amin R74 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygssrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqrhtdmpktqkevhl
knasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:70).

Ví dụ 47

(23c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng prolin (P), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 72 và gây đột biến các axit amin R74 và R77 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:71).

Ví dụ 48

(24c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R37 bằng prolin (P), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74, R77 và R104 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.:72).

Ví dụ 49

(25c) xóa G1, P2, E3, thay thế cả hai axit amin R36 và R37 bằng glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến axit amin R74 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:73).

Ví dụ 50

(26c) xóa G1, P2, E3, axit amin R36 và R37 are both substituted by glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74 và R77 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:74).

Ví dụ 51

(27c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R36 bằng glutamin (Q), thay thế R37 bằng alanin, thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74 và R77 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO.:75).

Ví dụ 52

(28c) xóa G1, P2, E3, thay thế cả hai axit amin R36 và R37 bằng glutamin (Q), thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74, R77 và R104 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkev
hlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.:76).

Ví dụ 53

(29c) xóa G1, P2, E3, thay thế axit amin R36 bằng glutamin (Q), thay thế R37 bằng alanin, thay thế G42 bằng serin, xóa các axit amin K68, S69, A70, R71 và S72 và gây đột biến các axit amin R74, R77 và R104 thành glutamin (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkev
lknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO.:77).

Ví dụ 54: Sự biểu hiện của IGF-1 tái tổ hợp trong các dòng tế bào CHO mất chức năng thụ thể IGF-1.

Sự biểu hiện của IGF-1 tái tổ hợp trong dòng tế bào CHO dẫn đến ức chế sinh trưởng tế bào và hàm lượng thấp. Trong fig. 11 các giá trị đo hàm lượng hIGF-1Ea 3mut (SEQ ID NO.: 27) trong quá trình diễn ra trong bể phản ứng sinh học được biểu diễn. Giá trị đo hàm lượng lớn nhất của hIGF-1Ea 3mut là 8 ug/ml tương ứng với hàm lượng kháng thể là 100mg/L (dựa trên khối lượng mol). Các giá trị đo hàm lượng trung bình của kháng thể tái tổ hợp trong quá trình diễn ra trong bể phản ứng sinh học là khoảng 3g/L. Một nguyên nhân của hàm lượng IGF-1 thấp là sự giảm sinh trưởng tế bào và khả năng sống sót tế bào của các tế bào biểu hiện IGF-1 là thấp. Trong suốt quá trình biểu hiện kháng thể, các tế bào của dòng tế bào biến thể CHO-K1 sinh trưởng lên tới $2,5 \times 10^7$ tế bào/ml và khả năng sống sót tế bào là hơn 97% trong suốt 230-260 giờ đầu tiên của thời gian nuôi cấy. Ngược lại, các tế bào biến thể CHO-K1 biểu hiện IGF-1 chỉ tăng đến $0,5-0,9 \times 10^7$ tế bào/ml và khả năng sống sót tế bào đã giảm mạnh xuống dưới 97% sau 80 giờ (xem Fig. 11).

Sự giảm sinh trưởng tế bào cũng có thể được phát hiện trong quá trình đồng nuôi cấy các tế bào thuộc dòng tế bào biến thể CHO-K1 không chuyển nhiễm với IGF-1. Fig. 12 cho thấy rằng các tế bào biến thể CHO-K1 nguyên bản sinh trưởng lên đến $2,5 \times 10^7$ tế bào/ml. Trong suốt quá trình đồng nuôi cấy các tế bào biến thể CHO-K1 với IGF-1 kiểu

dại hoặc hIGF-1Ea 3mut (50mg/L), sự sinh trưởng tế bào cũng bị ức chế đáng kể ($0,9 \times 10^7$ tế bào/ml).

Trong bước tiếp theo, bổ sung chất ức chế tyrosin kinaza IGF-IR đặc hiệu (NVPAEW541 (tài liệu *In vivo antitumor activity of NVPAEW541- A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase*; Carlos García-Echeverría et al.; Cancer Cell; được công bố trực tuyến ngày 26 tháng 2 năm 2004 DOI: 10.1016/S1535610804000510) trong suốt quá trình thí nghiệm đồng nuôi cấy IGF-1 trong các tế bào biến thể CHO-DUXB11. Sự ức chế sinh trưởng tế bào có thể được ngăn ngừa (xem Fig. 13). Thử nghiệm này khẳng định rằng IGF-1-R kích hoạt tín hiệu đến tế bào tạo ra sự ức chế sinh trưởng tế bào.

Trong bước tiếp theo là làm tắt chức năng IGF-1R sử dụng kỹ thuật nucleaza ngón tay kẽm (zinc finger nuclease-ZFN) được thực hiện trong tế bào biến thể CHO-K1 và các dòng tế bào biến thể CHO-DUXB11. ZFN là vị trí đặc hiệu gắn kết trong vùng exon 3 của IGF-1R đã được thiết kế. Hai plasmit, mỗi trong số chúng mã hóa cho một tiểu phần của ZFN đặc hiệu IGF-1R, được đồng biến nạp trong tế bào biến thể CHO-K1 hoặc các tế bào biến đổi CHO-DUXB11. Mỗi tiểu phần của ZFN gắn kết đặc hiệu với các trình tự dài 18 cặp bazơ; vì thay thế toàn bộ trình tự dài 36bp được nhận biết đặc hiệu (tránh việc cắt ngẫu nhiên trên các vị trí khác của hệ gen). Miền endonucleaza của FokI này được tái thiết kế để có chức năng chỉ như dimer từ đó phân cắt ADN. Dimer ZFN tạo ra sự bẻ gãy trên cả hai mạch đích ở exon 3 của IGF-1R. Trải qua quá trình thiên về hướng gây lỗi của tế bào của sự gắn kết đầu không tương đồng, sự đứt gãy trên cả hai mạch này có thể dẫn đến sự biến đổi trình tự ADN và do đó tạo ra sự làm tắt chức năng của gen đích. Với tế bào biến thể CHO-K1, ba dòng làm tắt chức năng đã được tạo ra (làm tắt cả các đột biến alen và cả các đột biến dịch khung): Dòng 1: $\Delta 2$ (SEQ ID NO.: 99), dòng 2: $\Delta 5$ (SEQ ID NO.: 100) và dòng 3: $\Delta 2$ (SEQ ID NO.: 101), Dòng 1: +18 (và thay thế 14bp) (SEQ ID NO.: 103), dòng 2: $\Delta 22$ (SEQ ID NO.: 102) và dòng 3: $\Delta 114$ (SEQ ID NO.: 104).

Dòng tế bào biến thể CHO-DUXB11 khác với tế bào biến thể CHO-K1 đa dòng và tế bào biến thể CHO-K1 đa bội đã thách thức làm tắt IGF-1R (nhiều hơn hai bản sao của IGF-1R/hệ gen phải bị làm tắt). Chúng tôi đã tạo ra một số dòng tắt chức năng gen độc nhất với đột biến dịch khung và đã đánh giá kiểm định hai trong số chúng bằng tách

dòng TOPO và giải trình tự. Dòng 12: $\Delta 7$ (50%) (SEQ ID NO.: 106)/ $\Delta 22$ (50%) (SEQ ID NO.: 105), dòng 19: $\Delta 7$ (14.5%) / $\Delta 16$ (44%) / $\Delta 22$ (18%) / $\Delta 22\text{mut}$ (15%). Các giá trị phần trăm trong ngoặc được dựa trên tần suất mà đột biến này xuất hiện bên ngoài 32 khuôn lác đã biết trình tự. Với dòng 19, có thể giả thiết rằng 6 alen của IGF-1R là tồn tại ($3 \times \Delta 16$, $1 \times \Delta 7$, $1 \times \Delta 22$, $1 \times \Delta 22\text{mut}$). Ba dòng tế bào biến thể CHO-K1 KO IGF-1R đã tạo ra được đồng nuôi cấy với IGF-1 và không sự ức chế sinh trưởng tế bào nào được phát hiện (xem fig. 14).

Hai dòng tế bào biến thể CHO-DUXB11 KO IGF-1R được tạo ra cũng được nuôi cấy với có/không có IGF-1. Giống như các dòng CHO-K1 KO IGF-1R, một sự cải thiện về sinh trưởng tế bào có thể được phát hiện ở các dòng KO này khi so sánh với các tế bào biến thể CHO-DUXB11 kiểu dại (xem Fig. 15). Một trong các dòng KO đã cho thấy không có sự ức chế sinh trưởng tế bào khi có mặt IGF-1 và các dòng KO khác có sự ức chế khi có mặt cùng lượng IGF-1 tối đa. Đếm các tế bào sống sót là tế bào biến thể CHO-DUXB11 mà không đồng nuôi cấy với IGF-1.

Chiến lược tách dòng vector pBW806 (hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A).

Vector pBW806, mã hóa hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A, được tạo ra theo hai bước nhân dòng nối tiếp. Trong bước đầu tiên, thủy phân plasmit 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (vector độc quyền của Novartis) bằng XbaI và AscI để phân tách vùng Fc tổng hợp mới. Đồng thời, thủy phân pBW679 (vector độc quyền của Novartis) bằng AscI và XbaI để tạo ra mảnh xương sống tương ứng mang các yếu tố điều hòa phiên mã và các yếu tố điều hòa dịch mã cũng như chỉ thị chọn lọc/khuếch đại G418/DHFR. Tất cả các yếu tố đã thủy phân được nối với các đầu tương ứng của chúng thay thế được vector trung gian pBW805. Trong bước thứ hai, plasmit 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A_pMA-T (Vector độc quyền của Novartis) được thủy phân bằng XbaI và Sse232I để phân tách vùng đầu N của protein dung hợp hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A. Đồng thời, thủy phân vector trung gian pBW805 tiếp đó bằng Sse232I và XbaI vận chuyển phân đoạn xương sống mong muốn mà cuối cùng nối với mảnh 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A_pMA-T tạo ra vector biểu hiện cuối cùng pBW806.

Chiến lược tách dòng vector pBW807 (hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C).

Vector pBW807, mã hóa hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C, được tạo ra theo hai bước tách dòng liên tiếp. Trong bước thứ nhất, thủy phân plasmit 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (vector độc quyền của Novartis) bằng XbaI và AscI để phân tách vùng Fc tổng hợp mới. Đồng thời, thủy phân pBW679 (vector độc quyền của Novartis) bằng AscI và XbaI để tạo ra mảnh xương sống tương ứng mang các yếu tố điều hòa phiên mã và các yếu tố điều hòa dịch mã cũng như chỉ thị chọn lọc/khuếch đại G418/DHFR. Tất cả các yếu tố đã thủy phân được nối với các đầu tương ứng của chúng thay thế được vector trung gian pBW805. Trong bước thứ hai, thủy phân plasmit 11AARNWC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C_pMA-T (vector độc quyền của Novartis) đã bằng XbaI và Sse232I để tách chiết vùng đầu N của protein dung hợp hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C. Đồng thời, thủy phân vector trung gian pBW805 tiếp đó bằng Sse232I và XbaI vận chuyển phân đoạn xương sống mong muốn mà cuối cùng nối với mảnh 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C_pMA-T (vector độc quyền của Novartis) tạo ra vector biểu hiện cuối cùng pBW807.

Chiến lược tách dòng vector pBW808 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F).

Vector pBW808, mã hóa hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F (Vector độc quyền của Novartis), đã được tạo ra theo hai bước nhân dòng kế tiếp. Trong bước thứ nhất, thủy phân plasmit 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (Vector độc quyền của Novartis) bằng XbaI và AscI nhằm phân tách vùng Fc được tổng hợp mới. Đồng thời, thủy phân pBW679 (Vector độc quyền của Novartis) bằng AscI và XbaI để tạo ra mảnh xương sống tương ứng mang các yếu tố điều hòa phiên mã và dịch mã cũng như chỉ thị chọn lọc/khuếch đại G418/DHFR. Tất cả các yếu tố sau thủy phân được nối bằng các đầu tương thích của chúng để tạo ra vector trung gian pBW805. Trong bước thứ hai, thủy phân plasmit 11AARNYC_hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F_pMA-T (Vector độc quyền của Novartis) bằng XbaI và Sse232I để tách chiết vùng đầu N của protein dung hợp hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_Fc. Đồng thời, thủy phân vector trung gian pBW805 tiếp sau đó bằng Sse232I và XbaI vận chuyển phân đoạn xương sống mà cuối cùng nối với mảnh 11AARNUC_hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F_pMA-T (Vector độc quyền của Novartis) để tạo ra vector biểu hiện cuối cùng pBW808.

Chiến lược tách dòng vector pBW809 (hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E).

Vector pBW809, mã hóa trình tự dung hợp hIGF1-Ea-Fc_MUT 04/2_E Fc, đã được tạo ra theo hai bước nhân dòng kế tiếp. Trong bước thứ nhất, thủy phân plasmit 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (Vector độc quyền của Novartis) bằng XbaI và AscI nhằm phân tách vùng Fc được tổng hợp mới. Đồng thời, thủy phân pBW679 (Vector độc quyền của Novartis) bằng AscI và XbaI để tạo ra mảnh xương sống tương ứng mang các yếu tố điều hòa phiên mã và dịch mã cũng như chỉ thị chọn lọc/khuếch đại G418/DHFR. Tất cả các yếu tố sau thủy phân được nối bằng các đầu tương thích của chúng để tạo ra vector trung gian pBW805. Trong bước thứ hai, thủy phân plasmit 11AARN2C_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E_pMA-T (Vector độc quyền của Novartis) bằng XbaI và Sse232I để tách chiết vùng đầu N của protein dung hợp hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E. Đồng thời, thủy phân vector trung gian pBW805 tiếp sau đó bằng Sse232I và XbaI vận chuyển phân đoạn xương sống mà cuối cùng nối với 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E_pMA-T (Vector độc quyền của Novartis) để tạo ra vector biểu hiện cuối cùng pBW809.

Chiến lược tách dòng vector pBW810 (hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A).

Vector pBW810, mã hóa hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A, đã được tạo ra theo hai bước nhân dòng kế tiếp. Trong bước thứ nhất, thủy phân plasmit 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (Vector độc quyền của Novartis) bằng XbaI và AscI nhằm phân tách vùng Fc được tổng hợp mới. Đồng thời, thủy phân pBW679 (Vector độc quyền của Novartis) bằng AscI và XbaI để tạo ra mảnh xương sống tương ứng mang các yếu tố điều hòa phiên mã và dịch mã cũng như chỉ thị chọn lọc/khuếch đại G418/DHFR. Tất cả các yếu tố sau thủy phân được nối bằng các đầu tương thích của chúng để tạo ra vector trung gian pBW805. Trong bước thứ hai, thủy phân plasmit 11AARN2C_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A_pMA-T (Vector độc quyền của Novartis) bằng XbaI và Sse232I để tách chiết vùng đầu N của protein dung hợp hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A. Đồng thời, thủy phân vector trung gian pBW805 tiếp sau đó bằng Sse232I và XbaI vận chuyển phân đoạn xương sống mà cuối cùng nối với mảnh 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A_pMA-T (Vector độc quyền của Novartis) để tạo ra vector biểu hiện cuối cùng pBW810.

Chiến lược tách dòng vector pBW410 (hIGF-1Ea 3mut).

Thủy phân vector 0610900pGA4 (Vector độc quyền của Novartis), mã hóa trình tự hIGF-1Ea 3mut bằng XbaI và mLuI nhằm phân tách trình tự mã hóa IGF được tổng hợp mới. Đồng thời, thủy phân pBW165 (Vector độc quyền của Novartis) bằng mLuI và XbaI để tạo ra mảnh xương sống tương ứng mang các yếu tố điều hòa phiên mã và dịch mã cũng như chỉ thị chọn lọc/khuếch đại G418/DHFR. Tất cả các thành phần sau thủy phân được nối bằng các đầu tương thích của chúng tạo ra vector biểu hiện cuối cùng pBW410.

Chiến lược tách dòng vector pBW664 (miền hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc).

Thủy phân vector 0905915 (Vector độc quyền của Novartis), mã hóa trình tự miền hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc bằng XbaI và AscI nhằm phân tách trình tự mã hóa IGF được tổng hợp mới. Đồng thời, thủy phân pBW596 (Vector độc quyền của Novartis) bằng AscI và XbaI để tạo ra mảnh xương sống tương ứng mang các yếu tố điều hòa phiên mã và dịch mã cũng như chỉ thị chọn lọc/khuếch đại G418/DHFR. Tất cả các thành phần sau thủy phân được nối bằng các đầu tương thích của chúng tạo ra vector biểu hiện cuối cùng pBW664.

Chiến lược tách dòng vector pBW666 (miền hIGF1-Ea- Δ 1-3, R37A, Δ 71-72, R77Q-fc).

Thủy phân vector 0950919 (Vector độc quyền của Novartis), mã hóa trình tự miền hIGF1-Ea- Δ 1-3, R37A, Δ 71-72, R77Q-fc bằng XbaI và AscI nhằm phân tách trình tự mã hóa IGF được tổng hợp mới. Đồng thời, thủy phân pBW596 (Vector độc quyền của Novartis) bằng AscI và XbaI để tạo ra mảnh xương sống tương ứng mang các yếu tố điều hòa phiên mã và dịch mã cũng như chỉ thị chọn lọc/khuếch đại G418/DHFR. Tất cả các thành phần sau thủy phân được nối bằng các đầu tương thích của chúng tạo ra vector biểu hiện cuối cùng pBW666.

Dòng tế bào biến thể Δ 5/ Δ 22 CHO-K1 KO IGF-1R cũng như dòng tế bào IGF-1R KO biến đổi từ Δ 7/ Δ 22 CHO-DUXB11 được chuyển nhiễm với 5 đại diện IGF-FC dung hợp khác nhau (xem Fig. 15). Sự tăng hàm lượng 5-17 lần của protein IGF-1-FC tái tổ hợp có thể được phát hiện trong mức độ tích lũy so sánh tế bào biến thể CHO-K1 kiểu dại/dòng tế bào chuyển nhiễm được biến đổi từ tế bào CHO-DUXB11 với một đại diện dung hợp IGF-1-FC khác.

Hai trong số các đại diện dung hợp IGF-1-FC (hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A và hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E) mà được biểu hiện trong tế bào biến thể CHO-K1 KO IGF1R hoặc các dòng tế bào KO IGF1R biến đổi từ CHO-DUXB11 được nuôi cấy trong hệ thống bể phản ứng sinh học dạng sóng dung tích 100L (quá trình cung cấp dinh dưỡng cho bể nuôi cấy và chuyển dịch nhiệt độ). Cho các tập hợp biến thể tế bào CHO-K1 Ko IGF1R biểu hiện hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A/4 sinh trưởng đến tối đa. Mật độ tế bào sống sót là 3×10^7 tế bào/ml, cao hơn quá trình AB trung bình (mật độ tế bào trung bình là $2,2 \times 10^7$ tế bào/ml). So sánh với các tế bào biến đổi từ CHO-K1 kiểu đại biểu hiện IGF-1 có sự tăng 3-6 lần số tế bào sống sót (xem Fig. 11). Cho các tế bào KO IGF1 biến đổi từ CHO-DUXB11 biểu hiện hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A/4 sinh trưởng đến tối đa. Mật độ tế bào là $1,5-2 \times 10^7$ tế bào/ml là cao hơn giá trị cao nhất. So sánh mật độ tế bào với dòng tế bào biến thể CHO-DUXB11 kiểu đại.

Chọn một tế bào KO IGF1R biến đổi từ CHO-DUXB11 biểu hiện hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A và hàm lượng bể nuôi cấy trong 24 giếng trong 50ml dịch nuôi cấy bể nuôi cấy được xác định. Trong fig. 15, hàm lượng 24 giếng của 30 dòng biến đổi từ CHO-DUXB11 kiểu đại biểu hiện miền hIGF-1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc được biểu diễn; trong Fig. 16, hàm lượng bình nuôi lắc của 15 dòng tốt nhất của mỗi nhóm được biểu diễn. Toàn bộ các dòng KO IGF-1R biến đổi từ tế bào CHO-DUXB11 có hàm lượng 24 giếng cao hơn 8 lần và có hàm lượng bình nuôi lắc cao hơn 7 lần.

Ví dụ 55: Nuôi cấy các tế bào CHO chuyển nhiễm biểu hiện IGF-1 bằng bể phản ứng sinh học.

Áp dụng quá trình cung cấp dinh dưỡng bể nuôi cấy để nuôi cấy các tế bào chuyển nhiễm biểu hiện IGF-1 bằng bể phản ứng sinh học. Các sự kiện của quá trình này bắt đầu cấp dinh dưỡng và chuyển dịch nhiệt độ được cài đặt sẵn thời điểm để hỗ trợ sinh trưởng tế bào và để kéo dài pha sản xuất bằng cách duy trì khả năng sống sót (Niraj Kumar, Patrick Gammell, Martin Clynes (2007) Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture; Cytotechnology (2007) 53:33–46).

Ví dụ 56: Thu IGF-1 từ các tế bào CHO.

Với quy trình thu, áp dụng các kỹ thuật phân tách tế bào tiêu chuẩn với sự lọc kỹ sau đó là lọc khử trùng. Nuôi cấy các tế bào CHO này và thu theo các phương pháp tiêu chuẩn được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, Curr. Protoc. Protein Sci. 2001 May; Chapter 5: Unit 5.10. Production of recombination proteins in mammalian cells. Chen S, Gray D, Ma J, Subramanian S; (Mahesh Prashada, Klaus Tarrach (2006) Depth filtration: Cell clarification of bể phản ứng sinh học offloads, Filtration & Separation Volume 43, Issue 7, September 2006, Pages 28–30).

Ví dụ 57: Thiết kế/sản xuất và sử dụng các ZFN mà đặc hiệu với exon 3 của IGF-1R:

Exon 3 của IGF-1R và các intron hai bên sườn được giải trình tự trong các dòng tế bào CHO của chúng tôi (SEQ ID NO.: 110/111). Đầu tiên, exon 3 được giải trình tự sử dụng ADN contig của chuột hamster bao phủ một phần cADN của IGF01R mà chứa exon 3, cũng như trình tự gen IGF-1 của chuột. Thiết kế các mồi cho PCR trên các phần bảo thủ và giải trình tự các sản phẩm PCR thu được. Gửi trình tự exon 3 thu được tới hãng Sigma để giải trình tự các intron hai bên sườn của exon 3 cũng như để thiết kế hai ZFN nhân tạo có đích tác động là exon 3 của IGF-1R. Mỗi ZFN nhắm đích và gắn với 18 nucleotit trên ADN mạch ngược (trên đầu 5') tương ứng với ADN mạch xuôi (trên đầu 3'). Hai vị trí gắn kết này được phân tách bởi năm nucleotit của vị trí cắt (SEQ ID NO.: 107). Mô tả sản phẩm và các phương pháp là có sẵn của hãng Sigma trong tài liệu '74188 CompoZr Custom ZFN Tech Bulletin'. Sigma cũng thiết kế các mồi xuôi PCR và mồi ngược PCR trong các trình tự xung quanh intron (SEQ ID NO.: 108 và 109) để khuếch đại exon 3 IGF-1R trong gDNA này, nhân lên một đoạn sản phẩm PCR dài 501bp. Sigma cung cấp bộ kit CompoZr™ (Custom Zinc Finger Nucleases, số sản phẩm CSTZFN-1KT, số lot 08021019MN) bao gồm 20-25µg hai vectơ ADN, mã hóa cho ZFN nhân tạo tương ứng nhận biết mạch ngược (pZFN1) và mạch xuôi (pZFN2).

Biến nạp một trong hai vectơ trên vào E.Coli theo các bước tiến hành biến nạp được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và trải lên các đĩa thạch aga chứa 25µg/ml Kanamycin. Với mỗi vectơ, nhặt 4 khuẩn lạc và nhân rộng số lượng khuẩn lạc. Đánh giá các trình tự ZFN của bốn mẫu plasmit ADN sau tinh sạch của mỗi pZFN bằng cách sử dụng mồi xuôi T7 và mồi ngược BHG và tập hợp lại. Biến nạp 6µg hoặc 10µg hỗn hợp đồng nhất của các vectơ tròn pZFN1 và pZFN2 vào tế bào biến thể CHO-K1 và các tế bào nguyên bản biến thể CHO-DUXB11, mỗi lần định lượng lặp lại ba lần sao cho sáu

tập hợp được tạo ra (cộng với đối chứng âm của bước biến nạp) với mỗi dòng tế bào. Để đo hiệu suất phân cắt của các ZFN trong tập hợp này, sử dụng thử nghiệm Surveyor Mutation Detection (Transgenomics, catalog 706025) ở ngày thứ 3 và ngày thứ 10 sau ngày biến nạp (tính là ngày số không), như được mô tả trong quy trình thực hiện tin cậy được cung cấp bởi hãng Sigma. ADN hệ gen của các tập hợp này được phân lập sử dụng kit GenElute Mammalian Genomic ADN Miniprep kit (Sigma, catalog G1N70-1KT), exon 3 được khuếch đại trong phản ứng PCR sử dụng các trình tự mỗi xuôi và mỗi ngược của IGF-1R nằm trong các trình tự intron hai bên sườn. Sản phẩm PCR sau đó được biến tính dưới điều kiện nhiệt độ cao. Khi nhiệt độ này từ từ được hạ xuống, một số ADN kiểu dại và ADN đột biến bắt cặp lại với nhau để tạo ra ADN sợi đôi với các điểm bắt cặp sai khác xung quanh vị trí cắt, mà được phân cắt bằng enzym được gọi là Surveyor®. Các sản phẩm cuối được phân tích sử dụng hệ thống điện di trên gel gọi là lab901. Với cả 6 tập hợp biến nạp, bên cạnh băng có kích thước 501bp khớp hoàn toàn với sản phẩm PCR, phát hiện hai băng nhỏ hơn có kích thước xấp xỉ là 277bp và 224bp, tương ứng với các đoạn ở hai phía của vị trí cắt, vì thế, chứng minh hoạt động của ZFN trong các tế bào của chúng tôi. Ngày thứ bảy sau khi chuyển gen, các tập hợp này được tạo dòng từ một tế bào trong mười đĩa 96 giếng.

Trong dòng tế bào biến thể CHO-K1 chuyển nhiễm pZFN, 507 dòng đã được phát sinh từ các đĩa 96 giếng và được đánh giá các đột biến sử dụng thử nghiệm phát hiện đột biến Surveyor đã được mô tả trên đây (ADN của toàn bộ hệ gen của các dòng được tách chiết trong các đĩa 96 giếng sử dụng kit Extract-N-Amp Blood PCR kit từ hãng Sigma, catalog XNAB2). 42 dòng là dương tính (đã phát hiện hai băng nhỏ hơn), có nghĩa là hệ gen của chúng chứa ít nhất một bản sao đột biến của exon 3, và sản phẩm PCR khuếch đại của exon 3 của IGF-1R được giải trình tự. Như dự đoán cho các dòng đã tạo ra dòng tế bào CHO-K1 giả lưỡng bội biến đổi từ CHO-K1, biểu đồ sắc ký trình tự ADN cho thấy hai đường tín hiệu gối lên nhau với cùng cường độ ở mức tín hiệu lớn nhất, chỉ ra hai bản sao của trình tự đích. 6 dòng có các đột biến trên cả hai bản sao, trong đó 3 dòng có các đột biến kích hoạt các codon kết thúc gần kề ở cả hai bản sao (SEQ ID NO.: 99 và 100) hoặc kích hoạt các codon kết thúc bên cạnh ở một bản sao và xóa nhiều nucleotit trên bản sao còn lại (SEQ ID NO.: 101). Xác định trình tự của hai bản sao trong 3 dòng trên bằng kỹ thuật tách dòng TOPO (kit tách dòng TA, hãng Invitrogen, cat. K4575-40; chọn 6 khuẩn lạc). Tất cả 3 dòng K.O. đều sinh trưởng với

mật độ tế bào cao hơn đáng kể so với các tế bào ban đầu, và khi chấm IGF-1 ('hIGF-1Ea 3mut' (SEQ ID NO.: 27) ở nồng độ 50mg/L vào môi trường tiêu chuẩn, ba dòng này sinh trưởng ở các mật độ cũng cao hơn các tế bào ban đầu (fig. 8). Chọn lọc dòng có kiểu gen $\Delta 5/\Delta 22$ (SEQ ID NO.: 100/102) để chuyển nhiễm protein Insulin giống yếu tố sinh trưởng 1, ví dụ, IGF-1 của người (SEQ ID NO.: 1 hoặc 5) hoặc biến thể của nó (ví dụ, các SEQ ID NO.: 8-14).

Trong dòng tế bào biến thể CHO-DUXB11 chuyển nhiễm pZFN, chỉ có 117 dòng sinh trưởng được trong các đĩa 96 giếng và được đánh giá các đột biến bằng thử nghiệm Surveyor. 28 dòng có ít nhất một bản sao đột biến của exon 3 (phát hiện hai băng nhỏ hơn), nhưng kết quả giải trình tự chỉ ra rằng tất cả các dòng này vẫn có các bản sao kiểu dại; trình tự kiểu dại có cường độ cao hơn trình tự đột biến trong biểu đồ sắc ký trình tự. Đột biến hóa và tạo đa dòng với dòng tế bào biến thể CHO-DUXB11; kiểu hình của nhân cho thấy lên đến tám bản sao của nhiễm sắc thể trong một số tế bào, đưa ra ước lượng số bản sao dự đoán của gen khó. Hai dòng, trong đó trình tự đột biến phát hiện được ($\Delta 22$ hoặc $\Delta 16$) kích hoạt các codon kết thúc gần kề, được chọn lọc từ vòng thứ hai của chuyển nhiễm các pZFN; 3 tập hợp/dòng ban đầu được tạo ra sử dụng 10 μ g hỗn hợp của các pZFN. Bảy ngày sau biến nạp, các tập hợp này được phân lập FACS trong 6 đĩa 96 giếng. 379 dòng đã sinh trưởng, 211 dòng trong số chúng được giải trình tự exon3 IGF-1R (không cần thử nghiệm Surveyor nữa vì các dòng này đã là trình tự đột biến) và phân tích các trình tự gôi bằng cách quan sát biểu đồ sắc ký. Hầu hết các dòng được giải trình tự là dị hợp tử với trình tự kiểu dại và trình tự đột biến dự đoán ($\Delta 22$ hoặc $\Delta 16$); ~20% số các dòng này có trình tự kiểu dại và hao trình tự đột biến (hầu hết là xóa nucleotit xung quanh vị trí cắt); trong hai dòng này, phát hiện 4 trình tự khác nhau (xác nhận bằng tách dòng TOPO, nhưng một trong số các trình tự này có trình tự hiệu dại hoặc chỉ có sự chèn thêm một nucleotit); 2 dòng này là các dòng K.O., phát hiện được trên cả hai dòng này 2 trình tự ($\Delta 16/\Delta 22$ và $\Delta 16/\Delta 5$), nhưng sự sinh trưởng của chúng khi có mặt IGF-1 là ít hơn rất nhiều so với dòng tế bào biến thể CHO-DUXB11 ban đầu. Do đó, ba dòng này, với kiểu gen $\Delta 22/\Delta 7$ /kiểu dại, $\Delta 16/\Delta 7$ /kiểu dại và $\Delta 16/\Delta 22$ /kiểu dại, được chọn lọc cho vòng chuyển nhiễm thứ ba với các trình tự pZFN (trình tự của chúng được xác nhận bằng tách dòng TOPO, mỗi dòng nhất và giải trình tự 32 khuẩn lạc). Trong số ba dòng này, mỗi dòng được chuyển nhiễm hai lần với 8 μ g pZFN. Thu lại một trong hai tập hợp của mỗi dòng (khả năng sống sót > 91%, sau

7-9 ngày), chúng được tập hợp lại và đồng nuôi cấy trong khoảng 6-8 tuần với sự có mặt của 50mg/l IGF-1 (để chọn lọc các tế bào chống chịu tốt hơn). Hai ngày trước khi tách dòng FACS, tách chúng khỏi IGF-1 (để cho phép gắn kết IGF-1-Cy5 và chọn lọc các tế bào phát huỳnh quang nhỏ hơn 5%). Ba tập hợp đã được tách dòng FACS trong tổng số 9 đĩa 96 giếng.

Thiết kế môi cho PCR gắn kết trình tự cắt kiểu đại trong exon 3 của IGF-1R, cho phép sự sàng lọc hiệu quả các dòng đột biến. Thực hiện phản ứng PCR cùng với trình tự môi xuôi cho IGF-1R; giả sử rằng phản ứng PCR luôn hoạt động, nếu một dòng có kết quả PCR âm, có thể là dòng đó không chứa trình tự ADN kiểu đại, hoặc dòng này không sinh trưởng tốt (quá ít ADN tách chiết được do các tế bào sinh trưởng kém). Từ 389 dòng đã phát triển này được sàng lọc, 58 dòng là âm tính và được giải trình tự. Trong số các dòng này, 30 dòng trong số chúng không phát hiện trình tự kiểu đại, và với 22 dòng có các đột biến là đột biến dịch khung (13 dòng với hai trình tự $\Delta 22/\Delta 7$, từ dòng $\Delta 22/\Delta 7$ /kiểu đại). Đánh giá sự sinh trưởng của chúng khi có và không có 50mg/l IGF-1, và chọn lọc dòng sinh trưởng tốt nhất khi có IGF-1 (cũng là dòng sinh trưởng tốt nhất khi không có IGF-1), với các trình tự $\Delta 22/\Delta 7$ (được xác định bằng phương pháp tách dòng TOPO), để chuyển nhiễm các cấu trúc ADN mã hóa cho các protein có SEQ ID No.: 8-14.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit chứa biến thể protein yếu tố tăng trưởng tương tự insulin 1 (IGF-1) của người là SEQ ID NO: 1, trong đó axit amin glyxin ở vị trí 42 được đột biến thành serin.
2. Polypeptit theo điểm 1, trong đó biến thể protein IGF-1 của người được dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch của IgG của người, tùy ý ở peptit vùng bản lề.
3. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit được glycosyl hóa.
4. Dược phẩm chứa polypeptit theo điểm 1 và chất mang dược dụng.
5. Polypeptit chứa biến thể protein IGF-1 của người là SEQ ID NO: 1, trong đó biến thể protein IGF-1 của người có những cải biến sau:
 - a. axit amin E3 được xóa,
 - b. axit amin G42 được đột biến thành serin, và
 - c. axit amin R37 được đột biến thành alanin.
6. Polypeptit chứa biến thể protein IGF-1 của người là SEQ ID NO: 1, trong đó biến thể protein IGF-1 của người chứa các cải biến sau:
 - a. axit amin G1, P2, E3 được xóa;
 - b. axit amin G42 được đột biến thành serin;
 - c. axit amin R36 được đột biến thành glutamin; và
 - d. axit amin R37 được đột biến thành alanin.
7. Dược phẩm chứa polypeptit theo điểm 6 và chất mang dược dụng.
8. Polypeptit theo điểm 6, trong đó biến thể protein IGF-1 của người được dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch của IgG của người, tùy ý ở peptit vùng bản lề.
9. Polypeptit chứa biến thể protein IGF-1 của người là SEQ ID NO: 1, trong đó biến thể protein IGF-1 của người có những cải biến sau:
 - a. axit amin G1, P2, E3 được xóa,
 - b. axit amin G42 được đột biến thành serin, và

c. axit amin R37 được đột biến thành alanin.

10. Dược phẩm chứa polypeptit theo điểm 9 và chất mang dược dụng.

11. Polypeptit theo điểm 9, trong đó biến thể protein IGF-1 của người được dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch của IgG của người, tùy ý ở peptit vùng bản lề.

12. Polypeptit chứa biến thể protein IGF-1 của người là SEQ ID NO: 1, trong đó axit amin G42 được thay thế bởi axit amin serin và trong đó axit amin là:

(a) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R36 được thay thế hoặc xóa; hoặc

(b) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R36 được thay thế bởi glutamin (Q); hoặc

(c) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R37 được thay thế hoặc xóa; hoặc

(d) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R37 được thay thế bởi axit glutamic (E); hoặc

(e) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R37 được thay thế bởi alanin; hoặc

(f) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R37 được thay thế bởi prolin (P); hoặc

(g) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R36 và R37 được thay thế hoặc xóa; hoặc

(h) G1, P2, E3 được xóa và axit amin R36 và R37 đều được thay thế bởi glutamin (Q); hoặc

(i) G1, P2, E3 được xóa, axit amin R36 được thay thế bởi glutamin (Q) và R37 được thay thế bởi alanin.

13. Dược phẩm chứa polypeptit theo điểm 12 và chất mang dược dụng.

14. Polypeptit theo điểm 12, trong đó biến thể protein IGF-1 của người được dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch của IgG của người, tùy ý ở peptit vùng bản lề.

Fig. 1:

K_D (nM)	hIGF1-Ea-Fc_mut_13/2_A	hIGF-1
IGF-1R	373	204

Fig. 2:

A

Phối tử	EC ₅₀ nM ± SEM
hIGF-1	1,8 ± 0,1
hIGF-1-Ea-Fc_mut_02	2,7*
hIGF-1-Ea-Fc_mut_03	9,8**
hIGF-1-Ea-Fc_mut_04	3,04*
hIGF-1-Ea-Fc_mut_12	3,81*
hIGF-1-Ea-Fc_mut_13	4,17*
hIGF-1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-Fc	5,26 0,7 [#]

*n=2; **n=1; [#]P<0,0001 với hIGF-1, chuẩn t

B

Phối tử	EC ₅₀ nM ± SEM
hIGF-1	1,8 ± 0,1
hIGF-1-Ea-Fc_mut_04/2_E	7,4 ± 1,3 [#]
hIGF-1-Ea-Fc_mut_04_E	5,5*
hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A	5,7*
hIGF-1-Ea-Fc_mut_13_A	4,1*

*n=2; [#]P<0,0001 với hIGF-1, chuẩn t

C

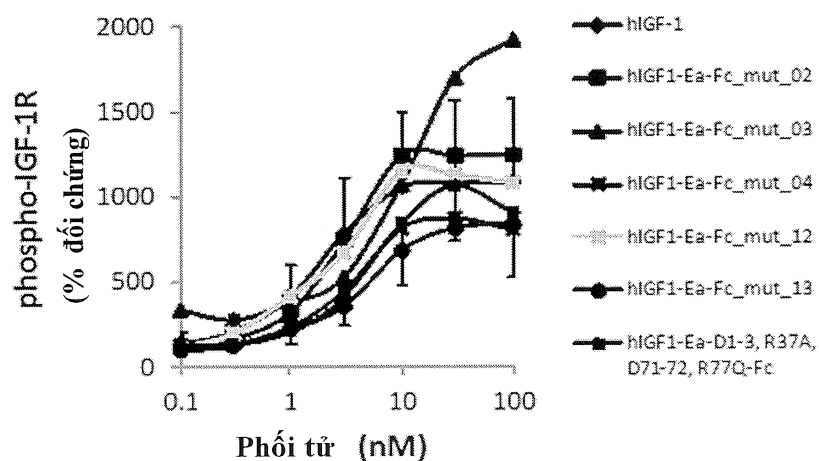


Fig. 2 tiếp theo:

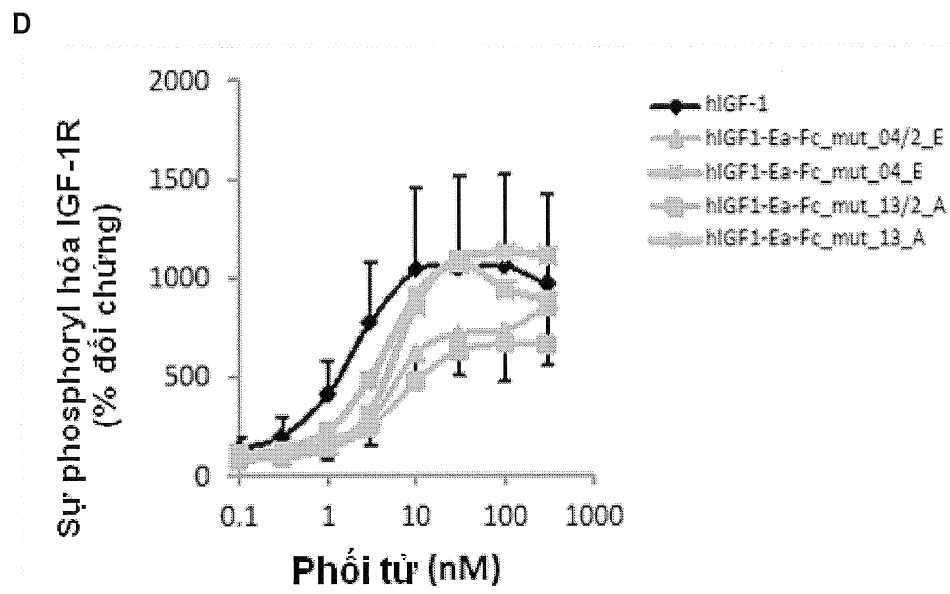


Fig. 3:

A

Phối tử	Giá trị trung bình số lần tăng tối đa gấp với đối chứng $\pm$ SD
Insulin	20,8 $\pm$ 6,1
hIGF-1	3,9 $\pm$ 0,8 [#]
hIGF1Ea-Fc_mut_02	5,9 $\pm$ 1,1 ^{#,\$}
hIGF1Ea-Fc_mut_03	8,6 [*]
hIGF1Ea-Fc_mut_04	12,5 [*]
hIGF1Ea-Fc_mut_12	21,9 [*]
hIGF1Ea-Fc_mut_13	15,2 [*]
hIGF1Ea-D1-3, R37A, D7172, R77Q Fc	18,8 $\pm$ 3,4

*n=2; [#]P<0,001 với insulin; ^{\$}P<0,05 với IGF-1

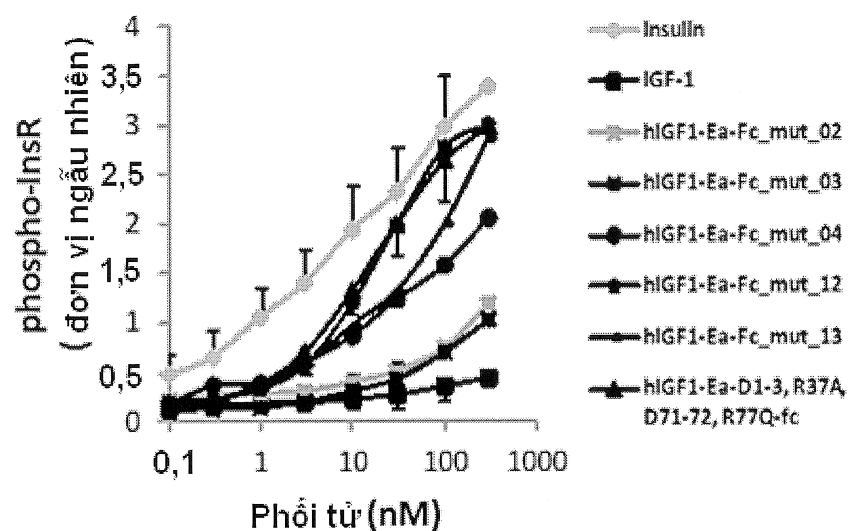
B

Phối tử	Giá trị trung bình số lần tăng tối đa gấp với đối chứng $\pm$ SD
Insulin	20,8 $\pm$ 6,1
hIGF-1	3,9 $\pm$ 0,8 [#]
hIGF1Ea-Fc_mut_04/2_E	5,2 [*]
hIGF1Ea-Fc_mut_04_E	9,4 [*]
hIGF1Ea-Fc_mut_13/2_A	5,4 [*]
hIGF1Ea-Fc_mut_13_A	12,4 [*]

*n=2; ; [#]P<0,001 với insulin

Fig. 3 tiếp theo:

C



D

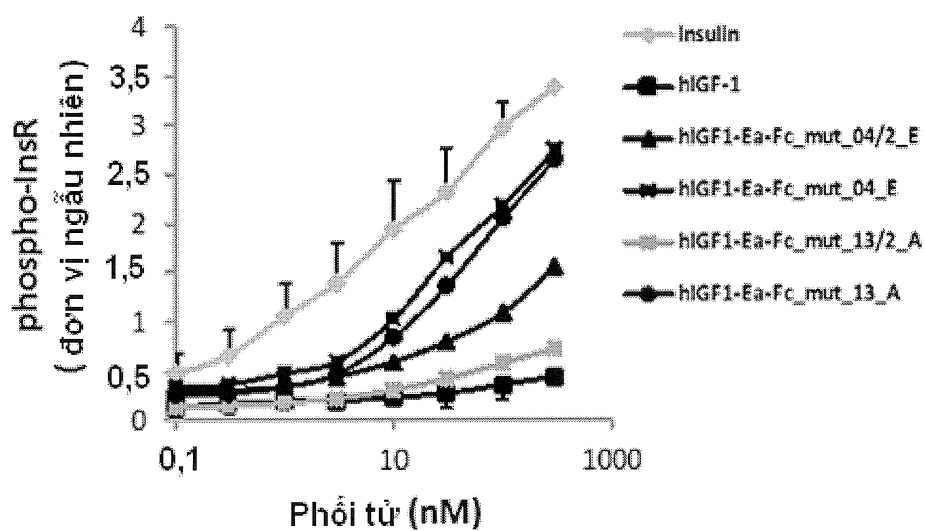


Fig. 4:

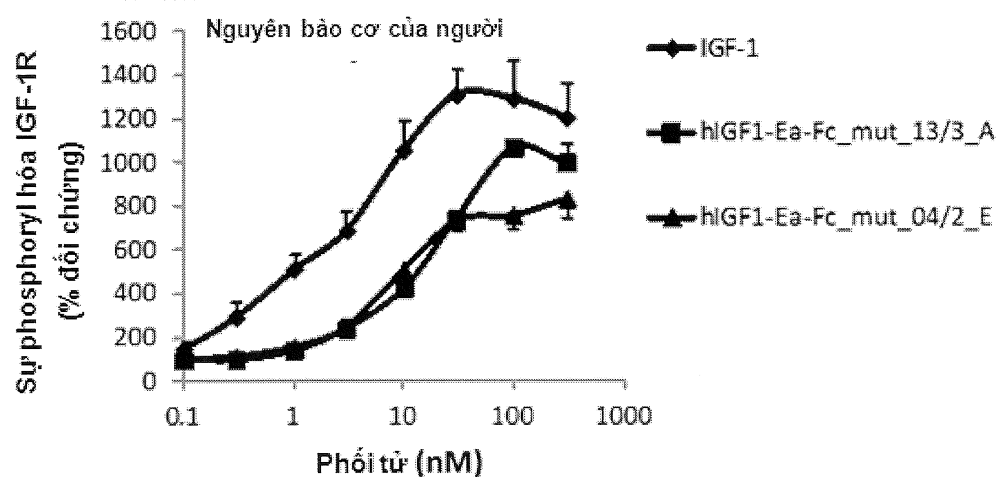
A

Peptit	Nguyên bào cơ của người		Nguyên bào cơ của Cynomolgus	
	EC ₅₀ (nM) ± SEM	E _{max} (% đối chứng) ± SEM	EC ₅₀ (nM) ± SEM	E _{max} (% đối chứng) ± SEM
hIGF-1	4,1 ± 1,4	1309 ± 119	5,1 ± 0,7	786 ± 182
hIGF1-Ea-Fc_mut_13/2_A	16,8 ± 3,1*	1069 ± 28	25,4 ± 4,0 [#]	779 ± 145
hIGF1-Ea-Fc_mut_04/2_E	10,6 ± 2,4	834 ± 83*	23,8 ± 2,0 [#]	724 ± 152

#P < 0,05 với nguyên bào cơ của người được tiếp xúc với hIGF-1,

#P < 0,05 với nguyên bào cơ của Cynomolgus được tiếp xúc với hIGF-1. Chuẩn Turkey, ANOVA

B



C

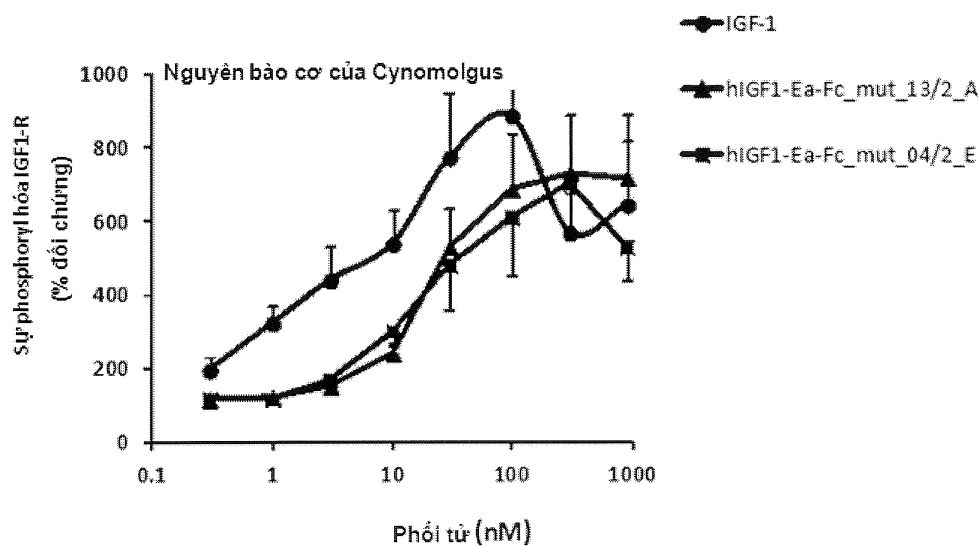


Fig. 5:

A

Phối tử	EC50 (nM) $\pm$ SD	Số lần tăng gấp đôi chứng tối đa $\pm$ SD
Insulin	11,5 $\pm$ 5,6**	1,37 $\pm$ 0,08
hIGF-1	1,3 $\pm$ 0,9	1,32 $\pm$ 0,06
hIGF1-Ea Fc_mut_13/2_A	4,3 $\pm$ 2,0	1,31 $\pm$ 0,11
hIGF1-Ea Fc_mut_04/2_E	3,7 $\pm$ 1,1	1,37 $\pm$ 0,10

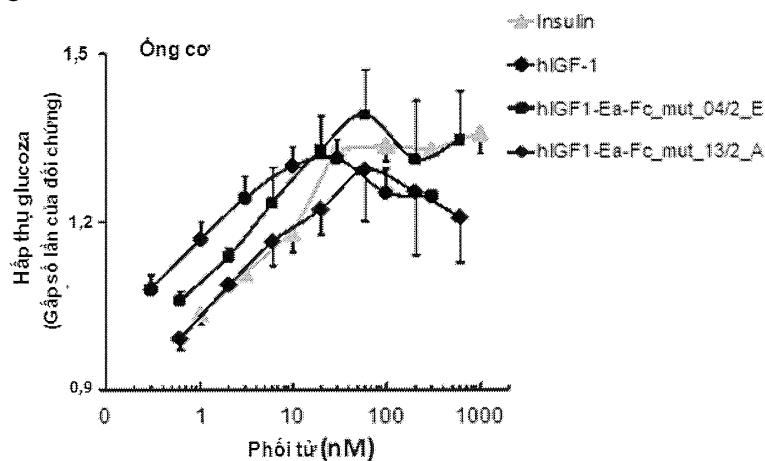
**P < 0,001 với IGF-1, chuẩn Turkey, ANOVA

B

Phối tử	EC50 (nM) $\pm$ SD	Số lần tăng gấp đôi chứng tối đa $\pm$ SD
Insulin	9,1 $\pm$ 3,7	5,2 $\pm$ 1,00
hIGF-1	5,0 $\pm$ 1,4	4,6 $\pm$ 0,68
hIGF1-Ea Fc_mut_13/2_A	49,9 $\pm$ 4,6***,***	3,2 $\pm$ 0,25#
hIGF1-Ea Fc_mut_04/2_E	49,0 $\pm$ 28,4**,***	4,0 $\pm$ 0,47

P < 0,05 và **P < 0,01 với Insulin; ***P < 0,001 với IGF-1 ANOVA, chuẩn Tukey

C



D

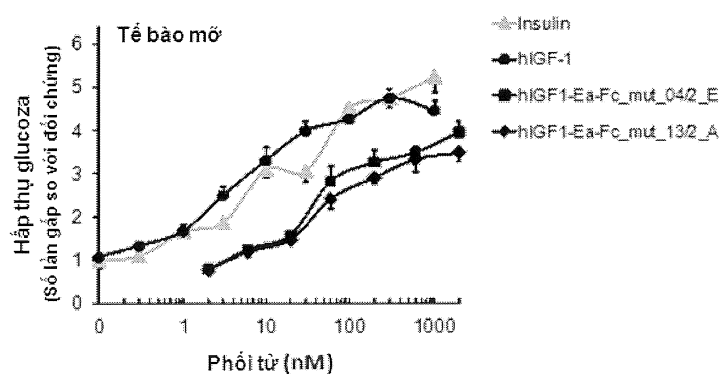


Fig. 6:

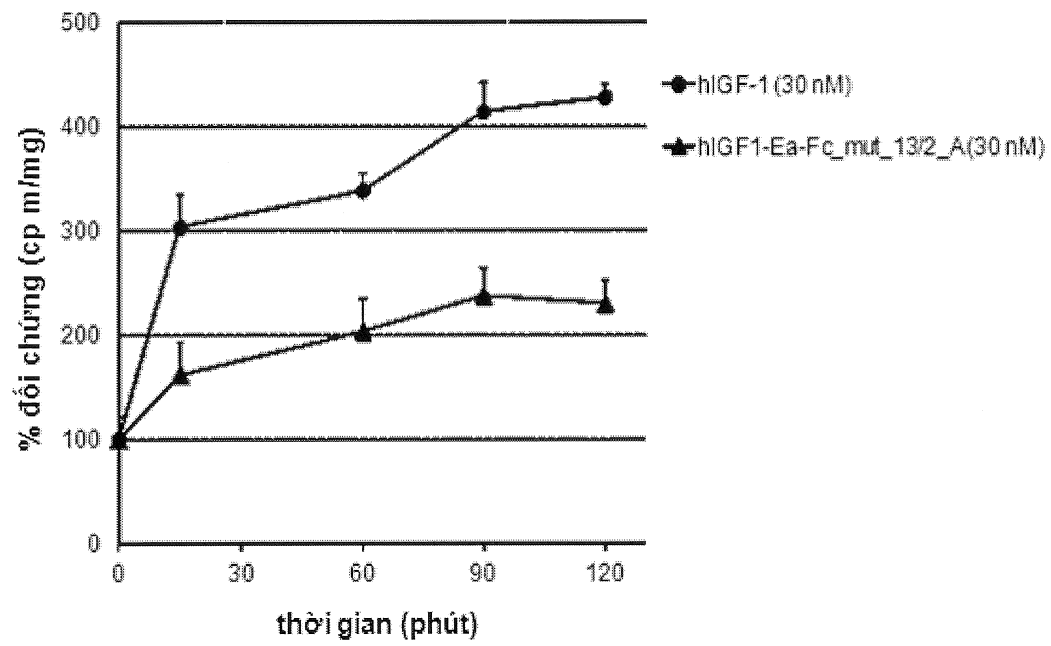


Fig.7:

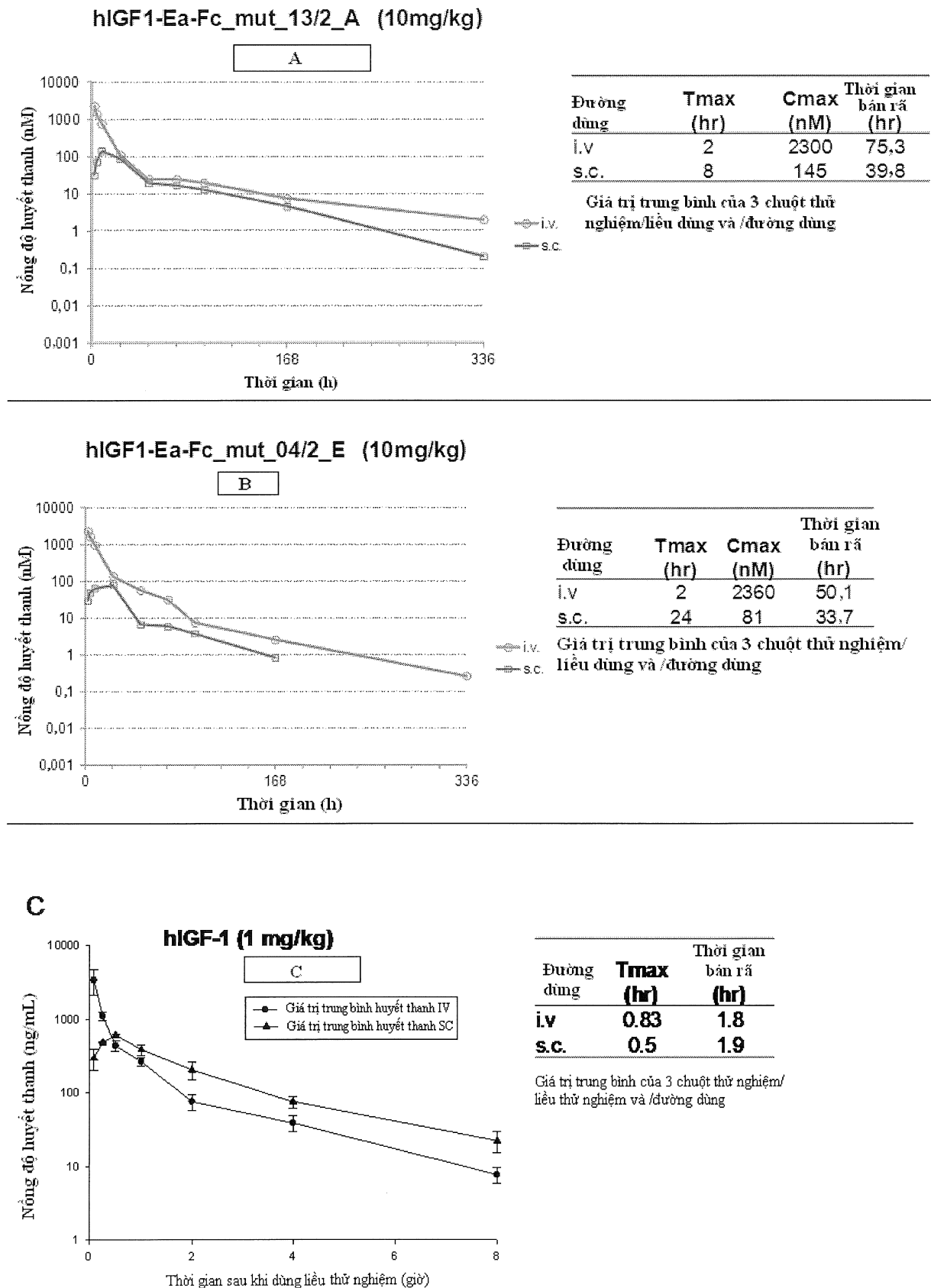


Fig. 8:

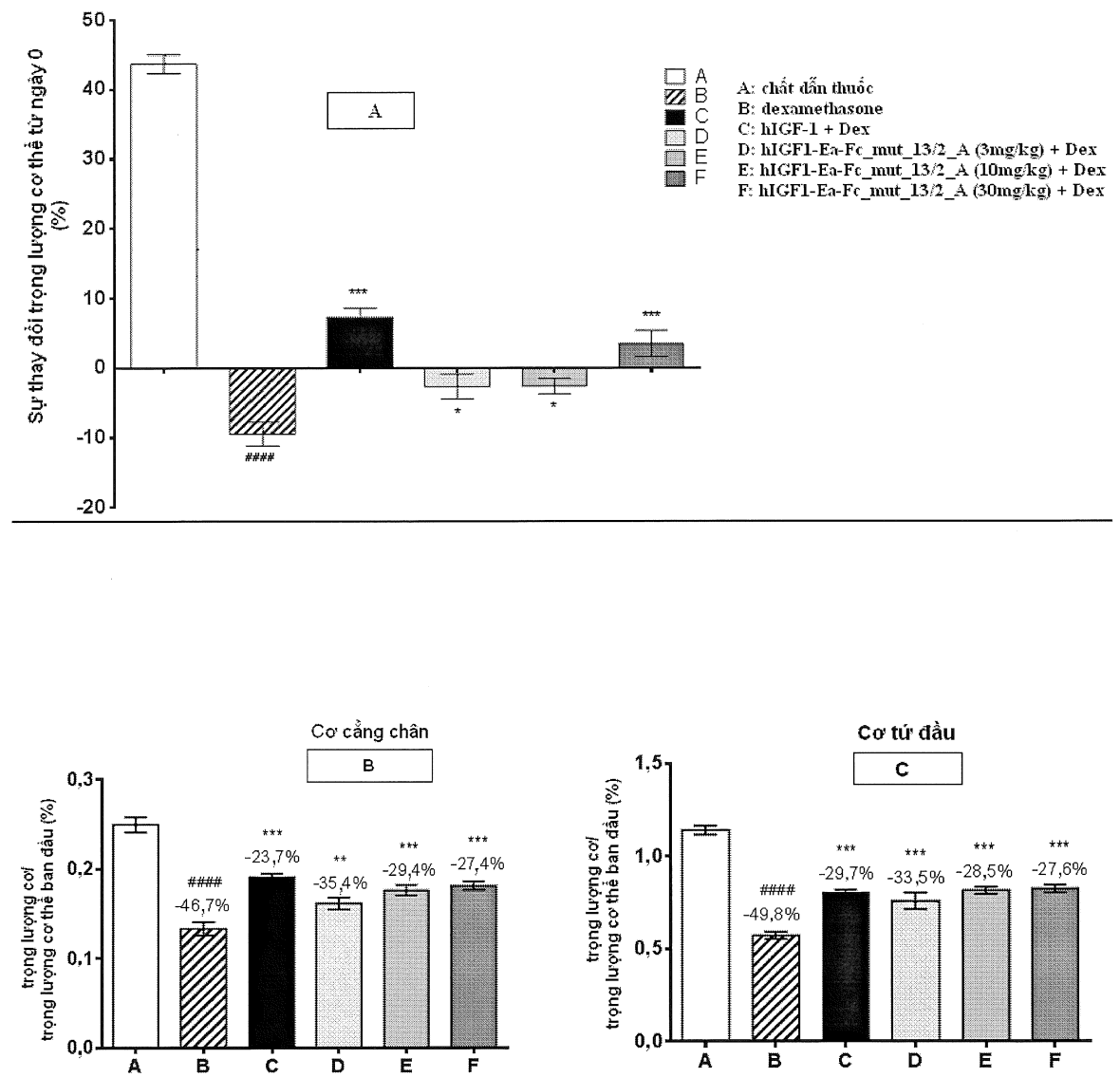


Fig. 9:

Tên	Hàm lượng trong dịch nối (mg/l)	Nồng độ (mg/ml)	Kết cụm (%)
miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc (SEQ ID NO.:78)	33	0,88	37,0
hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A: SEQ ID NO.: 9	83,1	1,65	9,8
miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42A, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc (SEQ ID NO.: 79)	11,79	0,49	37,4
miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc (SEQ ID NO.:80)	16,98	0,61	43,2
miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42P, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc (SEQ ID NO.: 81)	18,57	0,54	71,9
miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42K, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc (SEQ ID NO.:82)	21,6	0,56	53,8
miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42E, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc (SEQ ID NO.: 83)	26,97	0,84	49,4
miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42I, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc (SEQ ID NO.: 84)	8,7	0,4	85,5
miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Y, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc (SEQ ID NO.: 85)	13,38	0,41	48,5
miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D42, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc (SEQ ID NO.: 86)	78,6	1,96	21,0

D: xóa; miền fc: phần Fc từ hlgG1

Fig. 10:

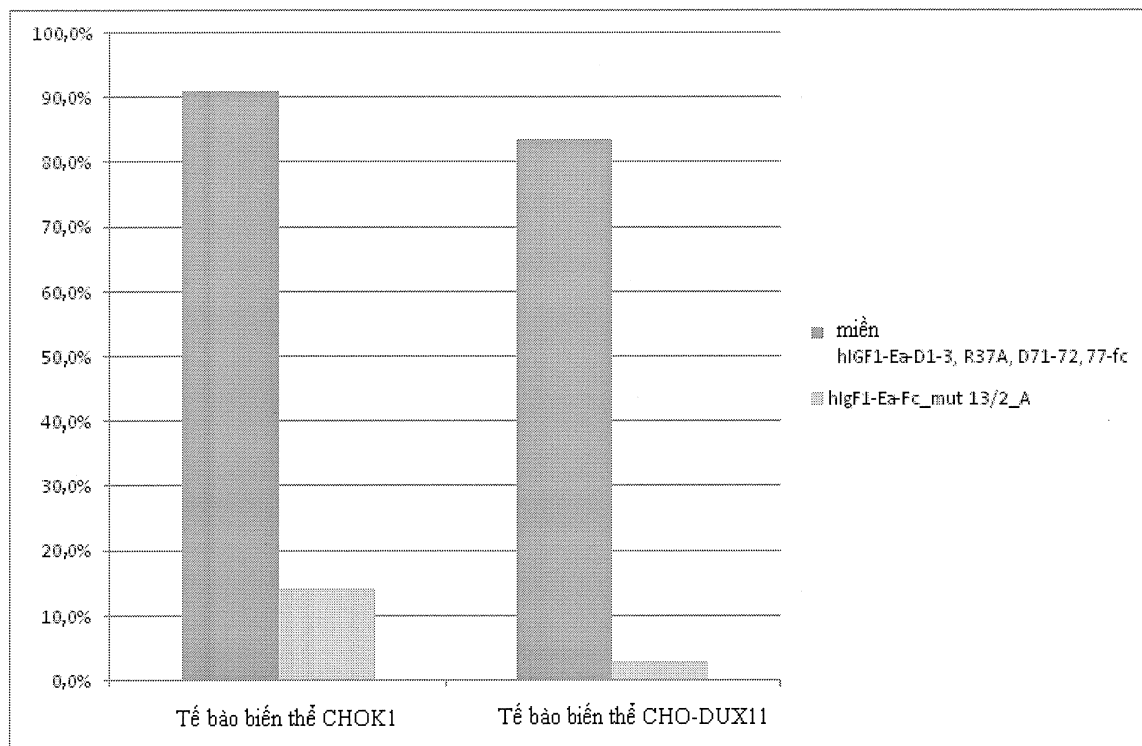
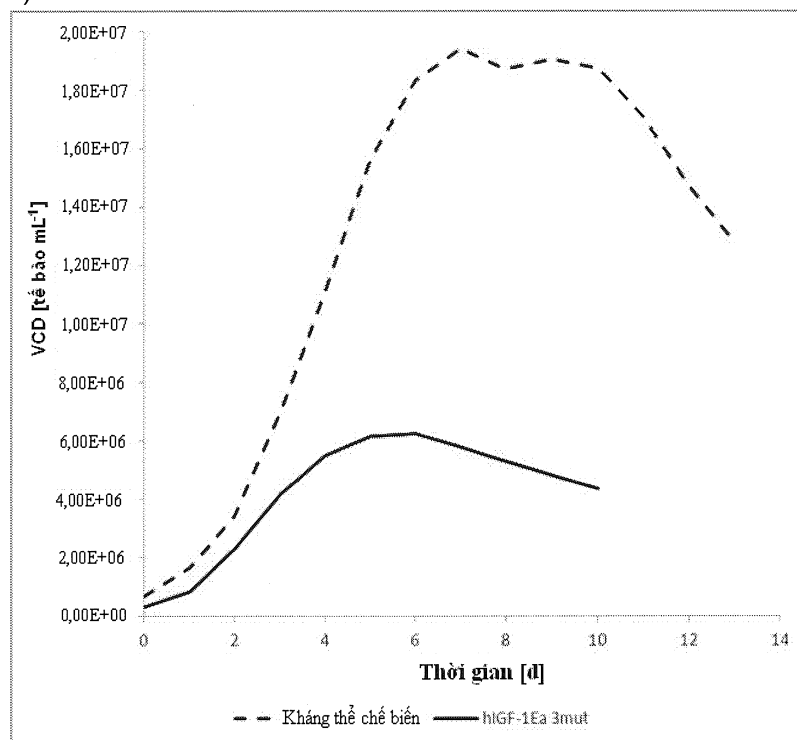


Fig. 11

A)



B)

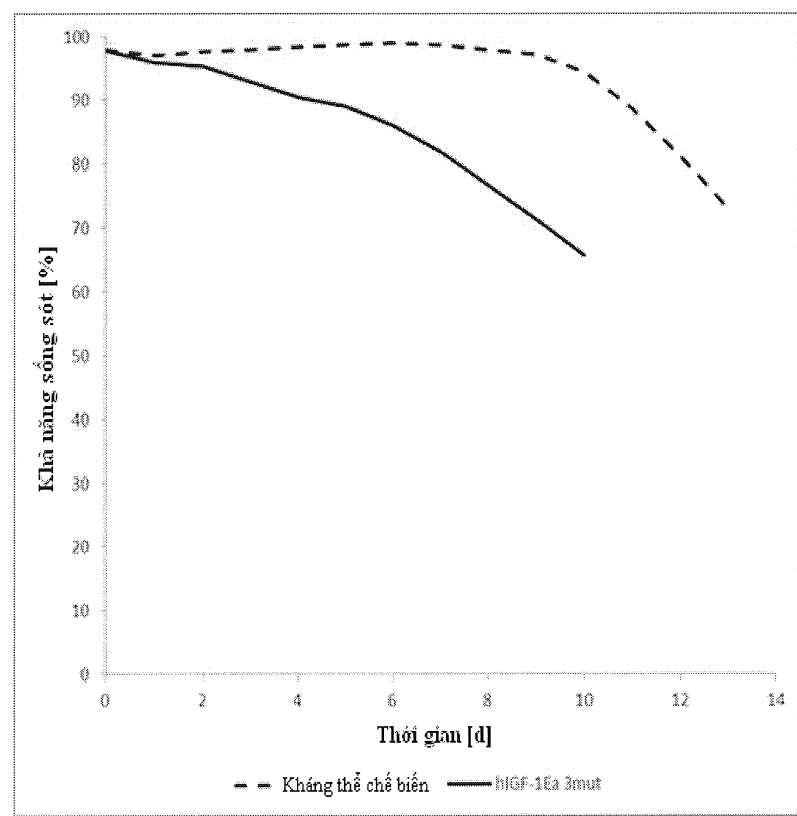
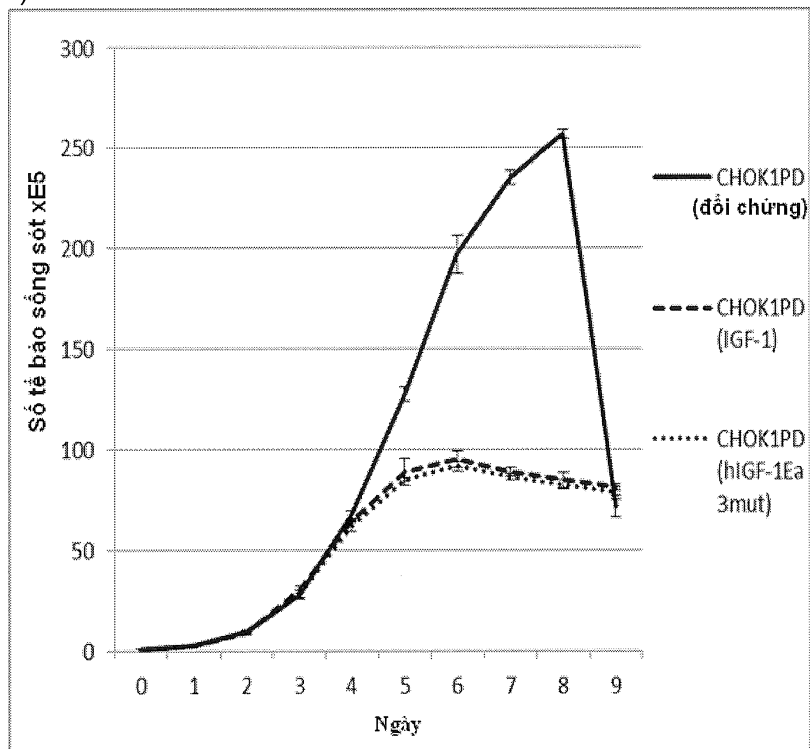


Fig. 12

A)



B)

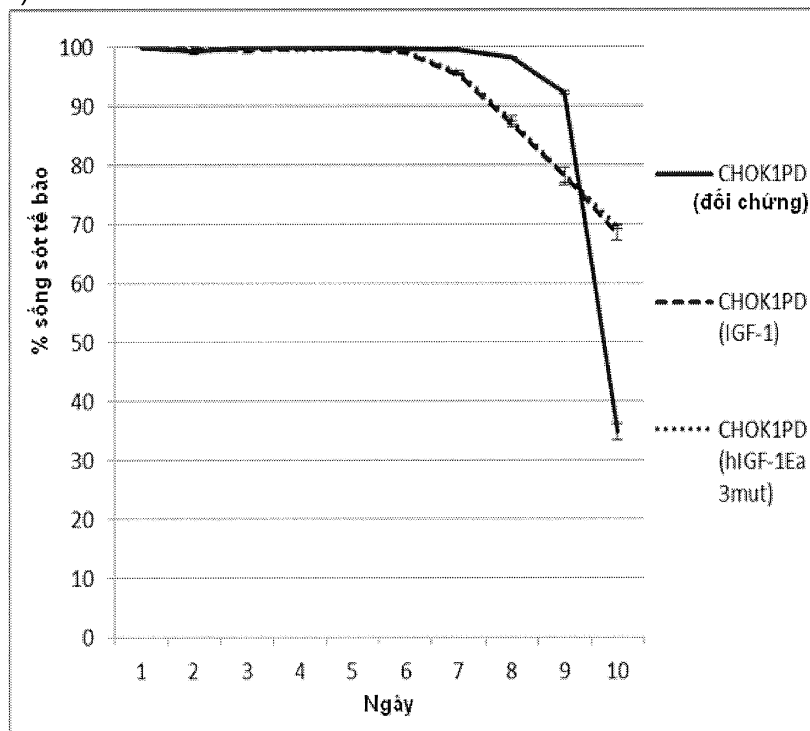


Fig. 13

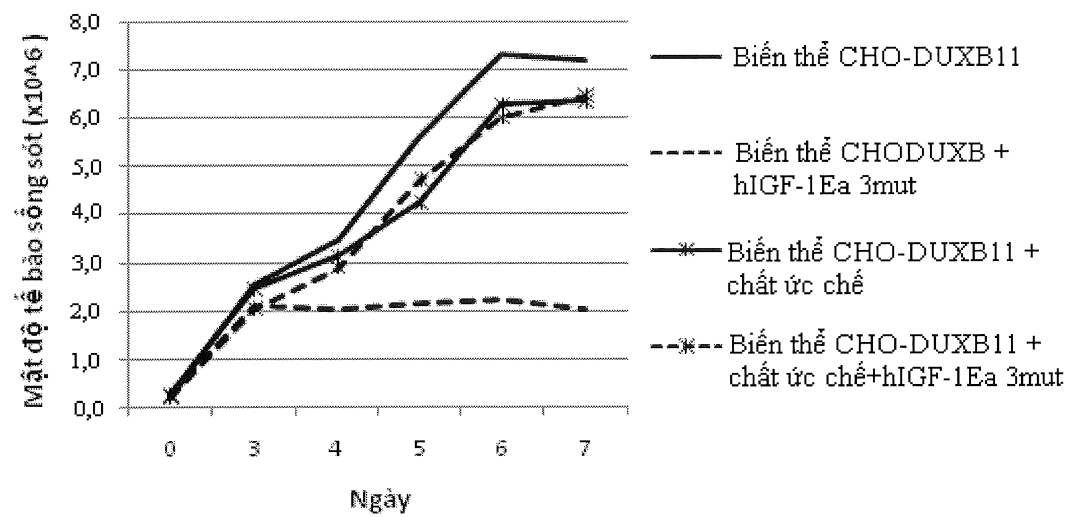


Fig. 14

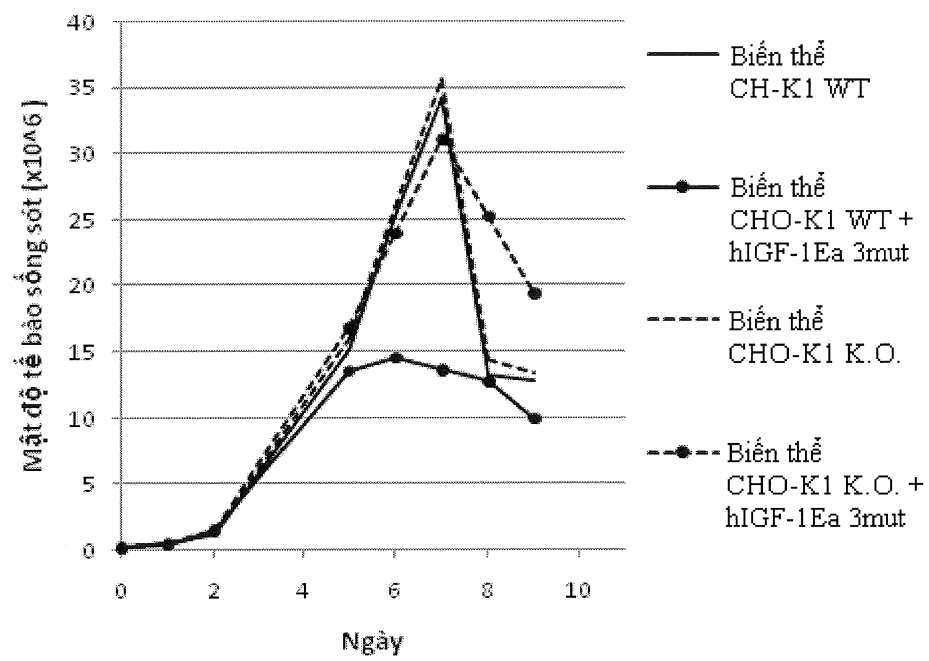


Fig. 15

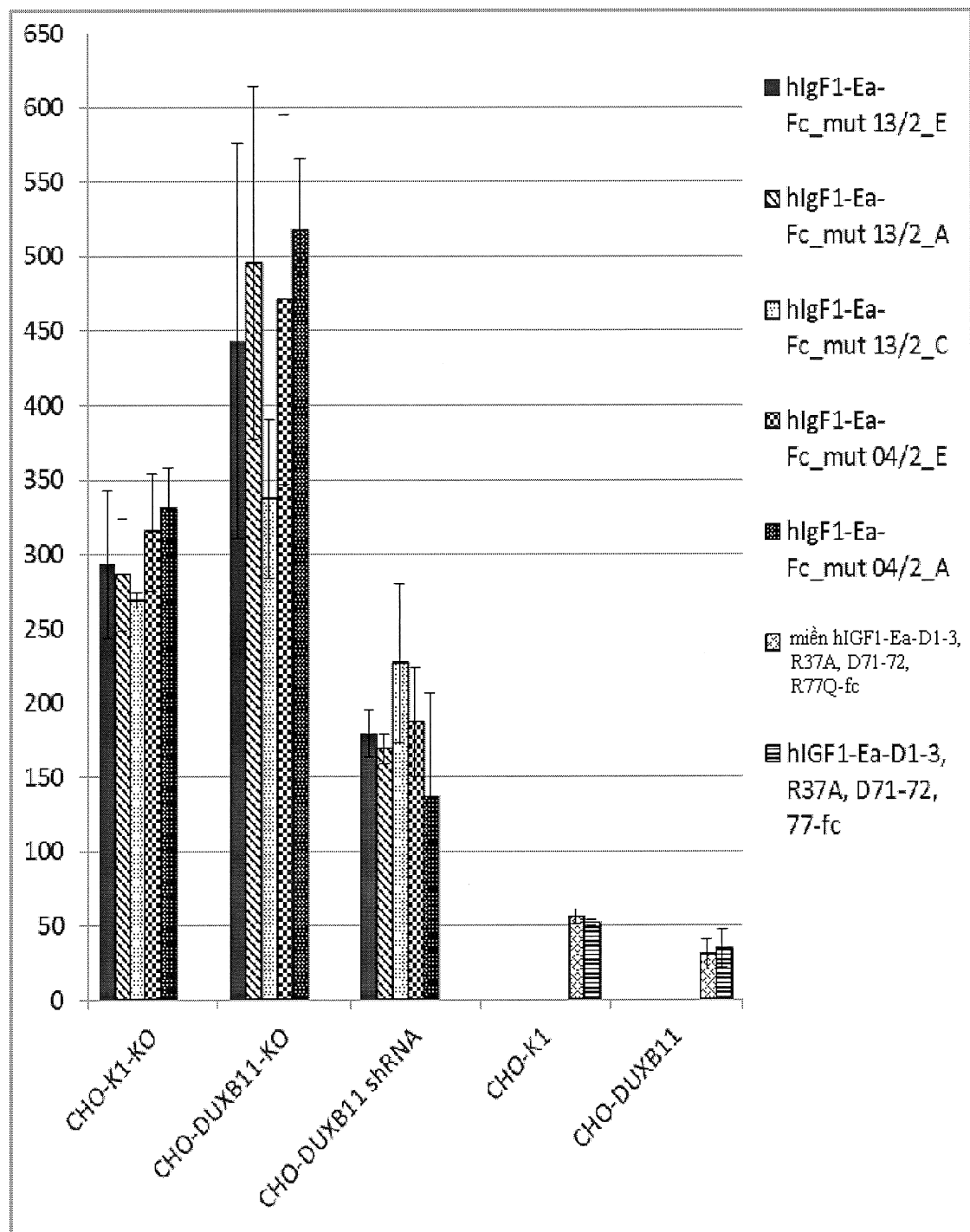


Fig. 16

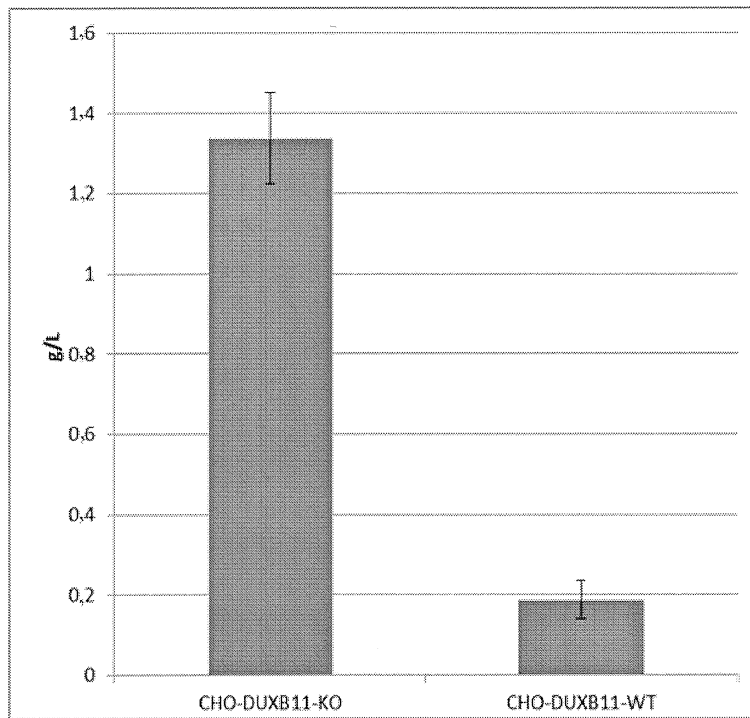


Fig. 17:

Tên gọi chung	axit amin ở vị trí 42	Sản lượng mg/L	% Kết cộm	% Protein có chiều dài đầy đủ sau thách thức (tế bào biến đổi từ CHOK1)	% Protein có chiều dài đầy đủ sau thách thức (tế bào biến đổi từ CHO -DUXB11)
hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, R74Q, R77Q, R104Q-fc (SEQ ID No. 113) (mề nuôi cấy 1)	glyxin	11,33	18,3	21,6% ± 13,4% (n=4)	27,06%
hIGF1-Ea-hFc_mut02 (SEQ ID No.: 29)	serin	13,64	5,8	9,6% ± 13,9% (n=3)	N/A
hIGF1-Ea-hFc_mut03 (SEQ ID No.: 114)	glyxin	5,17	41,8	44,9% ± 12,1% (n=3)	N/A
hIGF1-Ea-hFc_mut04 (SEQ ID No.: 30)	glyxin	10,34	21,1	60,2% ± 12,2% (n=4)	73,6 %
hIGF1-Ea-hFc_mut12 (SEQ ID No.: 116)	glyxin	8,46	17,7	44,3% ± 15,1% (n=3)	67,9%
hIGF1-Ea-hFc_mut13 (SEQ ID No.: 31)	glyxin	10,18	24,0	64,2% ± 11,5% (n=4)	80,0%
hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E (SEQ ID No.: 08)	serin	11,62	7,4	95,4% ± 4,4% (n=3)	97,3%± 3,4% (n=2)
hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (SEQ ID No.: 09)	serin	11,72	8,6	93,4%	95,3%
hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (SEQ ID No.: 12)	serin	11,51	7,3	95,0% ± 4,6% (n=3)	98,7%± 1,9% (n=2)

Fig.18:

Phối tử	Giá trị trung bình số lần tăng gấp đôi chứng tối đa $\pm$ SD
Insulin	$21,0 \pm 6,9$
IGF-1	$3,7 \pm 0,8$
IGF-1 G42S	$3,3 \pm 1,1$
hIGF1-Ea-mut 03	$5,6 \pm 2,0$
hIGF1-Ea-mut 03-G42S	$2,2 \pm 0,5^*$

* $P < 0,05$ với BVS855

Fig. 19:

A

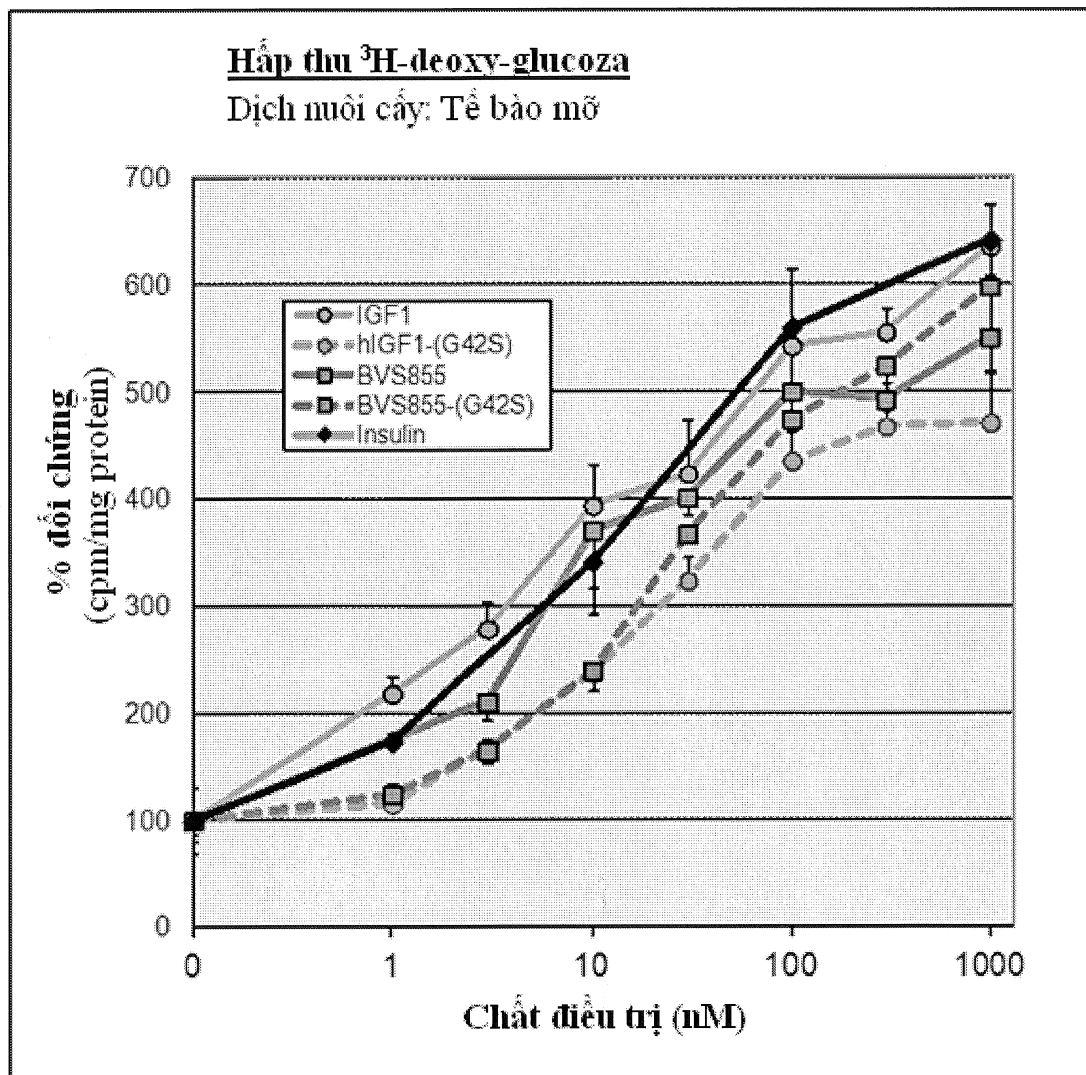
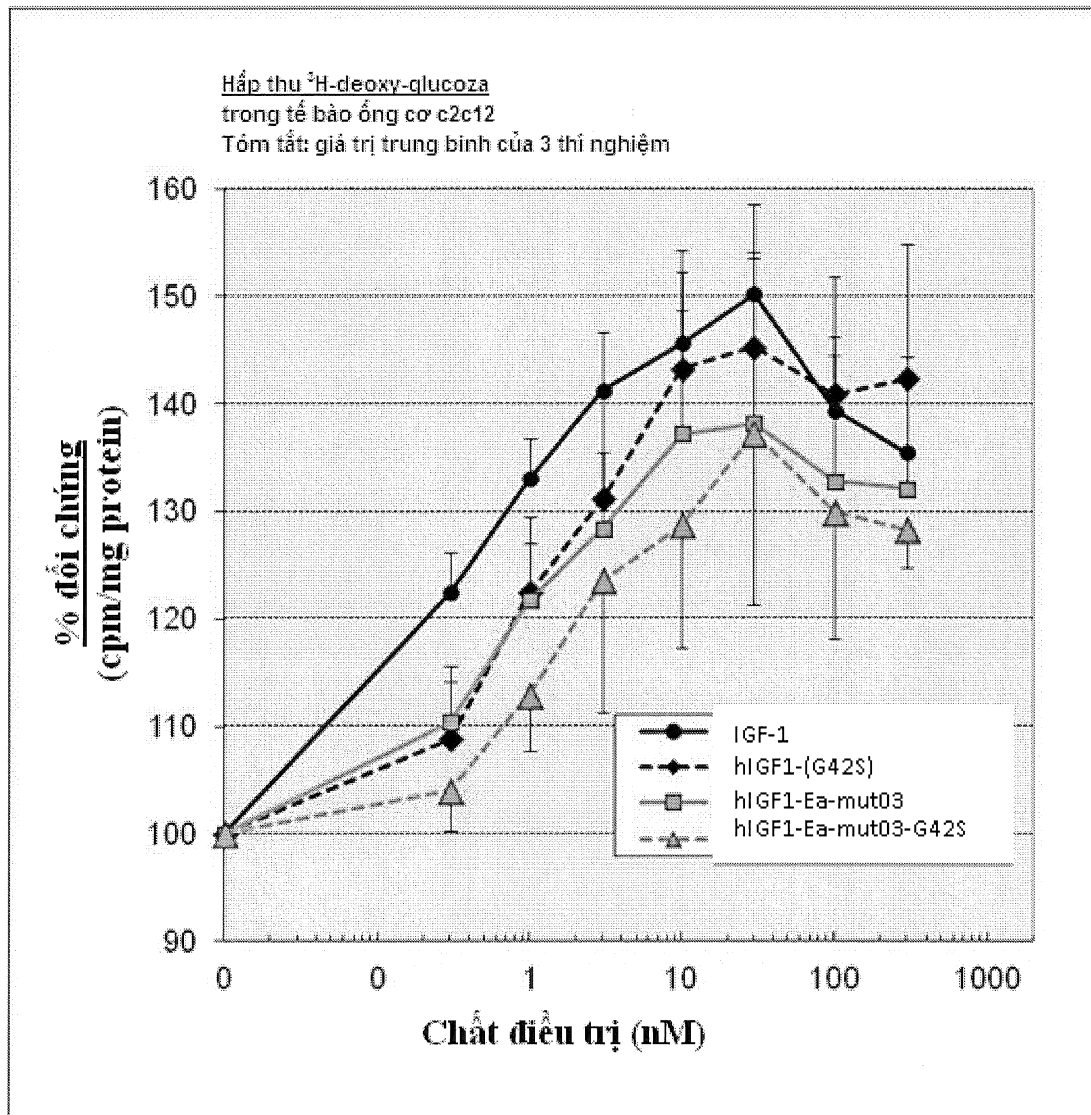


Fig. 19 tiếp theo:

B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Novartis AG

<120> POLYPEPTIT CHỨA BIẾN THỂ PROTEIN YẾU TỔ TĂNG TRƯỞNG TƯƠNG TỰ INSULIN 1 (IGF-1) CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA POLYPEPTIT NÀY

<130> PAT054095

<140> US 61/738475

<141> 2012-12-18

<160> 118

<170> PatentIn bản 3.5

<210> 1

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe

1 5 10 15

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly

20 25 30

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys

35 40 45

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu

50

55

60

Lys Pro Ala Lys Ser Ala

65

70

<210> 2

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys

1

5

10

15

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

20

25

30

Tyr Arg Met

35

<210> 3

<211> 77

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 3

Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys
 1 5 10 15

Tyr Gln Pro Pro Ser Thr Asn Lys Asn Thr Lys Ser Gln Arg Arg Lys
 20 25 30

Gly Trp Pro Lys Thr His Pro Gly Gly Glu Gln Lys Glu Gly Thr Glu
 35 40 45

Ala Ser Leu Gln Ile Arg Gly Lys Lys Lys Glu Gln Arg Arg Glu Ile
 50 55 60

Gly Ser Arg Asn Ala Glu Cys Arg Gly Lys Lys Gly Lys
 65 70 75

<210> 4

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 4

Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys
 1 5 10 15

Tyr Gln Pro Pro Ser Thr Asn Lys Asn Thr Lys Ser Gln Arg Arg Lys

20

25

30

Gly Ser Thr Phe Glu Glu Arg Lys

35

40

<210> 5

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 5

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe

1

5

10

15

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly

20

25

30

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys

35

40

45

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu

50

55

60

Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp

65

70

75

80

30883

Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly
85 90 95

Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg Met
100 105

<210> 6

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: miền hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc

<400> 6

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys

65

70

75

80

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

85

90

95

Tyr Arg Met Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

180

185

190

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

195

200

205

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 210 215 220

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 225 230 235 240

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 245 250 255

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 260 265 270

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 275 280 285

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 290 295 300

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 7

<211> 329

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: miền hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-fc

<400> 7

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn	Tyr	Arg	Met	Gly	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
			100					105						110	
Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	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	Glu	Glu	Met
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> 8

<211> 324

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E

<400> 8

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
 35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
 50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
 65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
 85 90 95

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 100 105 110

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 115 120 125

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

130

135

140

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

145

150

155

160

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

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

245

250

255

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

260

265

270

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 275 280 285

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 290 295 300

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 9

<211> 319

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A

<400> 9

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65

70

75

80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85

90

95

Met Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val

100

105

110

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

115

120

125

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

130

135

140

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

145

150

155

160

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 165 170 175

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 180 185 190

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 195 200 205

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 210 215 220

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 225 230 235 240

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 245 250 255

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 260 265 270

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 275 280 285

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 290 295 300

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

305

310

315

<210> 10

<211> 309

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C

<400> 10

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65

70

75

80

His Leu Lys Asn Ala Ser Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

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

245

250

255

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

260

265

270

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

275

280

285

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

290

295

300

Leu Ser Pro Gly Lys

305

<210> 11

<211> 314

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F

<400> 11

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 130 135 140

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 145 150 155 160

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 165 170 175

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 180 185 190

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 195 200 205

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 210 215 220

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 225 230 235 240

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 245 250 255

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 260 265 270

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 275 280 285

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 290 295 300

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 305 310

<210> 12

<211> 324

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E

<400> 12

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 20 25 30

Arg Glu Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
 35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
 50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
 65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
 85 90 95

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 100 105 110

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 115 120 125

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 130 135 140

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 145 150 155 160

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 165 170 175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

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

245

250

255

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

260

265

270

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

275

280

285

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

290

295

300

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 13

<211> 319

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A

<400> 13

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 20 25 30

Arg Glu Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
 35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
 50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65

70

75

80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85

90

95

Met Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val

100

105

110

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

115

120

125

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

130

135

140

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

145

150

155

160

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

165

170

175

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

180

185

190

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

195

200

205

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 210 215 220

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 225 230 235 240

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 245 250 255

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 260 265 270

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 275 280 285

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 290 295 300

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 305 310 315

<210> 14

<211> 314

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F

<400> 14

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Arg Glu Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

85 90 95

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

100 105 110

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 115 120 125

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 130 135 140

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 145 150 155 160

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 165 170 175

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 180 185 190

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 195 200 205

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 210 215 220

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 225 230 235 240

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 245 250 255

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

260

265

270

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

275

280

285

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

290

295

300

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

305

310

<210> 15

<211> 972

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa cho protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut

13/2_E

<400> 15

acgctctgcg gggctgagct ggtggatgct cttcagttcg tgtgtggaga caggggcttt 60

tatttcaaca agccacagc gtatggctcc agcagtcagg cggcgctca gacaagcatc 120

gtggatgagt gctgcttccg gagctgtgat ctaaggaggc tggagatgta ttgcgcaccc 180

ctcaagcctg ccgtccaggc ccagcagcac accgacatgc ccaagaccca gaaggaagta 240
 catttgaaga acgcaagtag agggagtgca ggaaacaaga actaccagat ggacaaaact 300
 cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa gcagcggggg gaccgtcagt cttcctcttc 360
 cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtgggtg 420
 gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 480
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgggtggtc 540
 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 600
 tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 660
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 720
 agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat ccagcgcaca tcgccgtgga gtgggagagc 780
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 840
 ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 900
 tcattgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 960
 tctccgggta aa 972

<210> 16

<211> 957

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa cho protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut
13/2_A

<400> 16

```

acgctctgcg gggctgagct ggtggatgct cttcagttcg tgtgtggaga caggggcttt      60

tatttcaaca agcccacagg gtatggctcc agcagtcagg cggcgcctca gacaagcatc      120

gtggatgagt gctgcttccg gagctgtgat ctaaggaggc tggagatgta ttgcgcaccc      180

ctcaagcctg ccgtccaggc ccagcagcac accgacatgc ccaagaccca gaaggaagta      240

catttgaaga acgcaagtag agggagtgca ggaaacaaga actaccagat gtgcccaccg      300

tgcccagcac ctgaagcagc ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag      360

gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac      420

gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag      480

acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc      540

ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc      600

ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg      660

tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg      720

gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag      780

aacaactaca agaccagcc tcccggtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc      840

aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg      900

```

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 957

<210> 17

<211> 927

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa cho protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut
13/2_C

<400> 17

acgctctgcg gggctgagct ggtggatgct cttcagttcg tgtgtggaga caggggcttt 60

tatttcaaca agccacagc gtatggctcc agcagtcagg cggcgctca gacaagcatc 120

gtggatgagt gctgcttccg gagctgtgat ctaaggaggc tggagatgta ttgcgcaccc 180

ctcaagcctg ccgtccaggc ccagcagcac accgacatgc ccaagacca gaaggaagta 240

catttgaaga acgcaagtgg gtgcccaccg tgcccagcac ctgaagcagc ggggggaccg 300

tcagtcttcc ttttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctcccg gaccttgag 360

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 420

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 480

acgtaccggg tggtcagcgt cctcacgcgc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 540

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 600

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 660

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggt tctatcccag cgacatcgcc 720

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 780

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcacgg tggacaagag caggtggcag 840

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 900

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 927

<210> 18

<211> 942

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa cho protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut
13/2_F

<400> 18

acgctctgcg gggctgagct ggtggatgct cttcagttcg tgtgtggaga caggggcttt 60

tatttcaaca agcccacagg gtatggctcc agcagtcagg cggcgcctca gacaagcatc 120

gtggatgagt gctgcttccg gagctgtgat ctaaggaggc tggagatgta ttgcgcaccc 180

ctcaagcctg ccgtccaggc ccagcagcac accgacatgc ccaagaccca gaaggaagta 240

catttgaaga acgcaagtgg ggacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 300

gcagcggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 360

tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 420

aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 480

gagcagtaca acagcacgta ccgggtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 540

ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 600

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 660

tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctat 720

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 780

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 840

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 900

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 942

<210> 19

<211> 972

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa cho protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut
04/2_E

<400> 19

acgctctgcg gggctgagct ggtggatgct cttcagttcg tgtgtggaga caggggcttt 60

tatttcaaca agccacaggt gtatggctcc agcagtcggg aggcgcctca gacaagcatc	120
gtggatgagt gctgcttccg gagctgtgat ctaaggaggc tggagatgta ttgcgcaccc	180
ctcaagcctg ccgtccaggc ccagcagcac accgacatgc ccaagacca gaaggaagta	240
catttgaaga acgcaagtag agggagtgcg ggaacaaga actaccagat ggacaaaact	300
cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa gcagcggggg gaccgtcagt cttcctcttc	360
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacct ctgaggtcac atgcgtggtg	420
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag	480
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgggtggtc	540
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc	600
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaagccaa agggcagccc	660
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc	720
agcctgacct gcttgtcaa aggccttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc	780
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc	840
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc	900
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg	960
tctccgggta aa	972

<211> 957

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa cho protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut
04/2_A

<400> 20

```
acgctctgcg gggctgagct ggtggatgct cttcagttcg tgtgtggaga caggggcttt      60

tatttcaaca agcccacagg gtatggctcc agcagtcggg aggcgcctca gacaagcatc      120

gtggatgagt gctgcttccg gagctgtgat ctaaggaggc tggagatgta ttgcgcaccc      180

ctcaagcctg ccgtccaggc ccagcagcac accgacatgc ccaagaccca gaaggaagta      240

catttgaaga acgcaagtag agggagtgcg ggaaacaaga actaccagat gtgcccaccg      300

tgcccagcac ctgaagcagc ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag      360

gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac      420

gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag      480

acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc      540

ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgcg aggtctccaa caaagccctc      600

ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacagggtg      660

tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg      720

gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag      780
```

aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 840

aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 900

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 957

<210> 21

<211> 942

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa cho protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut
04/2_F

<400> 21

acgctctgcg gggctgagct ggtggatgct cttcagttcg tgtgtggaga caggggcttt 60

tatttcaaca agcccacagg gtatggctcc agcagtcggg aggcgcctca gacaagcatc 120

gtggatgagt gctgcttccg gagctgtgat ctaaggaggc tggagatgta ttgcgcaccc 180

ctcaagcctg ccgtccaggc ccagcagcac accgacatgc ccaagacca gaaggaagta 240

catttgaaga acgcaagtgg ggacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 300

gcagcggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaac ccaaggacac cctcatgatc 360

tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 420

aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 480

gagcagtaca acagcacgta ccgggtgggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 540
 ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 600
 aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 660
 tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat 720
 cccagcgcaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 780
 acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 840
 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 900
 aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 942

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> peptit vùng bản lề tổng hợp nhân tạo

<400> 22

Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1

5

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> peptit vùng bản lề tổng hợp nhân tạo

<400> 23

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1

5

10

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> peptit vùng bản lề tổng hợp nhân tạo

<400> 24

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1

5

10

15

<210> 25

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> peptit Ea của IGF-1 của người đột biến

<400> 25

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
 1 5 10 15

His Leu Lys Asn Ala Ser Gly
 20

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> peptit E của IGF-1 của người đột biến

<400> 26

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Tyr Gln
 1 5 10 15

Pro Pro Ala Thr Asn Lys Asn Thr Lys Ser Gln Arg Arg Lys Gly Ser
 20 25 30

<210> 27

<211> 102

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIGF1-Ea-mut 03

<400> 27

Gly Pro Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val

1 5 10 15

Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser

20 25 30

Ser Ser Arg Ala Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe

35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys

50 55 60

Pro Ala Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys

65 70 75 80

Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly

85 90 95

Asn Lys Asn Tyr Arg Met

100

<210> 28

<211> 306

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa cho the Protein IGF-1 của người đột biến: hIGF1-Ea-mut 03

<400> 28

Gly Gly Ala Cys Cys Gly Ala Cys Gly Cys Thr Cys Thr Gly Cys Gly

1

5

10

15

Gly Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala

20

25

30

Thr Gly Cys Thr Cys Thr Thr Cys Ala Gly Thr Thr Cys Gly Thr Gly

35

40

45

Thr Gly Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Gly Cys Thr

50

55

60

Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Cys Ala Ala Cys Ala Ala Gly Cys Cys

65

70

75

80

Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Ala Thr Gly Gly Cys Thr Cys Cys

85

90

95

Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys Gly Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Cys

100

105

110

Cys Thr Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Gly Cys Ala Thr Cys Gly Thr
 115 120 125

Gly Gly Ala Thr Gly Ala Gly Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Thr Cys
 130 135 140

Cys Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Thr Gly Ala Thr Cys Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Thr Gly Thr Ala
 165 170 175

Thr Thr Gly Cys Gly Cys Ala Cys Cys Cys Cys Thr Cys Ala Ala Gly
 180 185 190

Cys Cys Thr Gly Cys Cys Ala Ala Gly Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly
 195 200 205

Thr Cys Cys Gly Thr Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys Gly Cys Cys Ala
 210 215 220

Cys Ala Cys Cys Gly Ala Cys Ala Thr Gly Cys Cys Cys Ala Ala Gly
 225 230 235 240

Ala Cys Cys Cys Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Ala Gly Thr Ala Cys

245 250 255

Ala Thr Thr Thr Gly Ala Ala Gly Ala Ala Cys Gly Cys Ala Ala Gly

260 265 270

Thr Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly Ala

275 280 285

Ala Ala Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Gly Gly Ala

290 295 300

Thr Gly

305

<210> 29

<211> 329

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut 02

<400> 29

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

30883

20

25

30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Tyr Gln Met Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

100

105

110

Ala Pro Glu Ala Ala 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 Glu Glu Met
 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> 30

<211> 329

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut 04

<400> 30

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Arg Glu Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50	55	60
Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln		
65	70	75 80
Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys		
	85	90 95
Asn Tyr Gln Met Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
	100	105 110
Ala Pro Glu Ala Ala 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 Glu Glu Met
 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> 31

<211> 329

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIgF1-Ea-Fc_mut 13

<400> 31

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

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

30883

85

90

95

Asn Tyr Gln Met Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

100

105

110

Ala Pro Glu Ala Ala 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 Glu Glu Met
 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> 32

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 8

<400> 32

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 20 25 30

Gln Arg Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
 35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
 50 55 60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
 65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
 85 90 95

Asn Tyr Arg Met
 100

<210> 33

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 9

<400> 33

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Arg Glu Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 34

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 10

<400> 34

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

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

85

90

95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 35

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 11

<400> 35

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Arg Pro Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 36

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 12

<400> 36

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Gln Gln Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 37

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 13

<400> 37

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 38

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 14

<400> 38

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Gln Arg Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 39

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 15

<400> 39

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

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

<210> 40

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 16

<400> 40

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Gln Arg Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Tyr Gln Met

100

<210> 41

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 17

<400> 41

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Arg Glu Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 42

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 18

<400> 42

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Arg Glu Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 43

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 19

<400> 43

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Arg Glu Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

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

85

90

95

Asn Tyr Gln Met

100

<210> 44

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 20

<400> 44

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 45

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 21

<400> 45

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 46

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 22

<400> 46

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Tyr Gln Met

100

<210> 47

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 23

<400> 47

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Arg Pro Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 48

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 24

<400> 48

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Arg Pro Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 49

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 25

<400> 49

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 20 25 30

Arg Pro Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
 35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
 50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
 65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
 85 90 95

Asn Tyr Gln Met
 100

<210> 50

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 26

<400> 50

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Gln Gln Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 51

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 27

<400> 51

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 20 25 30

Gln Gln Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
 35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
 50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
 65 70 75 80

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

85

90

95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 52

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 28

<400> 52

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 53

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 29

<400> 53

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Gln Gln Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Tyr Gln Met

100

<210> 54

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 30

<400> 54

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Tyr Gln Met

100

<210> 55

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 31

<400> 55

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Gln Arg Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65

70

75

80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85

90

95

Met

<210> 56

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 32

<400> 56

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

```
<210> 57
<211> 97
<212> PRT
<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo
<220>
<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 33
```

<400> 57

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85 90 95

Met

<210> 58

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 34

<400> 58

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Arg Pro Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85 90 95

Met

<210> 59

<211> 98

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 35

<400> 59

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Gln Gln Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Gln Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu

65

70

75

80

Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr

85

90

95

Arg Met

<210> 60

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 36

<400> 60

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85

90

95

Met

<210> 61

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 37

<400> 61

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Gln Arg Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65

70

75

80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85

90

95

Met

<210> 62

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 38

<400> 62

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Gln Arg Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65

70

75

80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85

90

95

Met

<210> 63

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 39

<400> 63

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Gln Arg Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65

70

75

80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85

90

95

Met

<210> 64

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 40

<400> 64

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 20 25 30

Arg Glu Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
 35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
 50 55 60

Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
 65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg
 85 90 95

Met

<210> 65

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 41

<400> 65

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 20 25 30

Arg Glu Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
 35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
 50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
 65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg
 85 90 95

Met

<210> 66

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 42

<400> 66

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Arg Glu Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85 90 95

Met

<210> 67

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 43

<400> 67

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85 90 95

Met

<210> 68

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 44

<400> 68

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85

90

95

Met

<210> 69

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 45

<400> 69

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 20 25 30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
 35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
 50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

30883

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85 90 95

Met

```
<210> 70
<211> 97
<212> PRT
<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo
```

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 46

<400> 70

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

Arg Pro Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg
85 90 95

Met

<210> 71

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 47

<400> 71

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

Arg Pro Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65

70

75

80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85

90

95

Met

<210> 72

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 48

<400> 72

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Arg Pro Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65

70

75

80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85

90

95

Met

<210> 73

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 49

<400> 73

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

30883

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Gln Gln Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85 90 95

Met

```
<210> 74
<211> 97
<212> PRT
<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo
<220>
<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 50
```

<400> 74

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Gln Gln Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85 90 95

Met

<210> 75

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 51

<400> 75

Thr	Leu	Cys	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Asp	Ala	Leu	Gln	Phe	Val	Cys	Gly
1				5					10					15	

Asp	Arg	Gly	Phe	Tyr	Phe	Asn	Lys	Pro	Thr	Gly	Tyr	Gly	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		

Gln	Ala	Ala	Pro	Gln	Thr	Ser	Ile	Val	Asp	Glu	Cys	Cys	Phe	Arg	Ser
			35					40					45		

Cys	Asp	Leu	Arg	Arg	Leu	Glu	Met	Tyr	Cys	Ala	Pro	Leu	Lys	Pro	Ala
			50				55						60		

Val	Gln	Ala	Gln	Gln	His	Thr	Asp	Met	Pro	Lys	Thr	Gln	Lys	Glu	Val
65						70					75			80	

His	Leu	Lys	Asn	Ala	Ser	Arg	Gly	Ser	Ala	Gly	Asn	Lys	Asn	Tyr	Arg
						85				90				95	

Met

<210> 76

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 52

<400> 76

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Gln Gln Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85 90 95

Met

<210> 77

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: Ví dụ 53

<400> 77

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
85 90 95

Met

<210> 78

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D68-72, R74Q,
R77Q, R104Q -fc

<400> 78

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
 65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
 85 90 95

Met

<210> 79

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42A, D68-72,
 R74Q, R77Q, R104Q -fc

<400> 79

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Ala Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65

70

75

80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85

90

95

Met

<210> 80

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Q, D68-72,
R74Q, R77Q, R104Q -fc

<400> 80

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

30883

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Gln Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
85 90 95

Met

<210> 81

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42P, D68-72,
R74Q, R77Q, R104Q -fc

<400> 81

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Pro Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
 35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
 50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
 65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
 85 90 95

Met

<210> 82

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42K, D68-72,
R74Q, R77Q, R104Q -fc

<400> 82

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Lys Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
 35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
 50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
 85 90 95

Met

<210> 83

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42E, D68-72,
R74Q, R77Q, R104Q -fc

<400> 83

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Glu Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65

70

75

80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85

90

95

Met

<210> 84

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42I, D68-72,
R74Q, R77Q, R104Q -fc

<400> 84

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Ile Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85

90

95

Met

<210> 85

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Y, D68-72,
R74Q, R77Q, R104Q -fc

<400> 85

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Tyr Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
 65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
 85 90 95

Met

<210> 86

<211> 96

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: miền hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D42, D68-72,
 R74Q, R77Q, R104Q -fc

<400> 86

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
 20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys

35

40

45

Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Val

50

55

60

Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val His

65

70

75

80

Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln Met

85

90

95

<210> 87

<211> 102

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIGF1-Ea (delGPE, R37A)

<400> 87

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys

65

70

75

80

Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly

85

90

95

Asn Lys Asn Tyr Arg Met

100

<210> 88

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Mồi PCR

<400> 88

tgacactata gaataacatc cactttgcc

29

<210> 89

<211> 52

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR

<400> 89

tcacagctcc ggaagcagca ctcattccacg atgcttgtct gaggcgccgc cc

52

<210> 90

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR

<400> 90

tgacactata gaataacatc cactttgcc

29

<210> 91

<211> 52

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR

<400> 91

tcacagctcc ggaagcagca ctcattccacg atgggtgtct gaggcgccgc cc

52

<210> 92

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR

<400> 92

tgacactata gaataacatc cactttgcc

29

<210> 93

<211> 76

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR: mỗi ngược của hIGF1-Ea-hFc_mut4

<220>

<221> misc_feature

<222> (49)..(50)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 93

tcacagctcc ggaagcagca ctcatccacg atgcctgtct gaggcgcmnn ccgactgctg

60

gagccatacc ctgtgg

76

<210> 94

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR

<400> 94

tgacactata gaataacatc cactttgcc

29

<210> 95

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR

<400> 95

tgtctgagggc gcccgcgcac tgctggagcc atacctgtg ggc

43

<210> 96

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR

<400> 96

tgacactata gaataacatc cactttgcc

29

<210> 97

<211> 41

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR

<400> 97

tgtctgaggc gccgcctgac tgctggagcc atacctgtg g

41

<210> 98

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR

<400> 98

cggtacgtgc tggcgtactg ctctccccgc ggctttg

37

<210> 99

<211> 368

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> phân đoạn gen thụ thể của IGF-1 của chuột hamster trung quốc đột biến:

dòng biến thể 1 của CHOK1 : sao chép delta2

<400> 99

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgcca cccagagtgc ctaggcagct gccatacacc

60

tgacgacaac acaacctgtg tggcctgccg acactactac tacaaaggcg tgtgtgtgcc 120
 tgcctgcca cctggcacct acgttcgagg gctggcgctg tgtggaccgc gattttctgcg 180
 ccaacatccc caacgctgag agcagtgact cagatggctt tgtcatccac gatggcgagt 240
 gcatgcaaga atgtccctca ggcttcatcc gcaacagcac ccagaggtca gtggctcttg 300
 ttcccatcc aggaggtgaa tcttgttcat attccatgat tgtaggaacc acccagaggt 360
 tcatccag 368

<210> 100

<211> 365

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> phân đoạn gen thụ thể của IGF-1 của chuột hamster trung quốc đột biến:
 dòng biến thể 2 làm tắt gen của CHOK1: sao chép delta5

<400> 100

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgcc aacagagtgc ctaggcagct gccatacacc 60
 tgacgacaac acaacctgtg tggcctgccg acactactac tacaaaggcg tgtgtgtgcc 120
 tgcctgcca cctggcacct acagagggct ggcgctgtgt ggaccgcgat ttctgcgcca 180
 acatcccaa cgctgagagc agtgactcag atggctttgt catccacgat ggcgagtgca 240
 tgcaagaatg tccctcaggc ttcattccga acagaccca gaggtcagtg gctcttgttc 300

cccatccagg aggtgaatct tgttcatatt ccatgattgt aggaaccacc cagaggttca 360

tccag 365

<210> 101

<211> 368

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> phân đoạn gen thụ thể của IGF-1 của chuột hamster trung quốc đột biến:

dòng biến thể 3 làm tắt gen của CHOK1: sao chép delta2

<400> 101

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgcca ccagagtgc ctaggcagct gccatacacc 60

tgacgacaac acaacctgtg tggcctgccg acactactac tacaaaggcg tgtgtgtgcc 120

tgccctgcca cctggcacct acgttcgagg gctggcgctg tgtggaccgc gatttctgcg 180

ccaacatccc caacgctgag agcagtgact cagatggctt tgtcatccac gatggcgagt 240

gcatgcaaga atgtccctca ggcttcatcc gcaacagcac ccagaggtca gtggctcttg 300

ttccccatcc aggaggtgaa tcttgttcat attccatgat tgtaggaacc acccagaggt 360

tcatccag 368

<210> 102

<211> 348

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> phân đoạn gen thụ thể của IGF-1 của chuột hamster trung quốc đột biến:

dòng biến thể 2 làm tắt gen của CHOK1: sao chép delta22

<400> 102

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgcca cccagagtgc ctaggcagct gccatacacc 60

tgacgacaac acaacctgtg tggcctgccg acactactac tacaaaggcg tgtgtgtgcc 120

tgccctgcca cctggcgctg tgtggaccgc gatttctgcg ccaacatccc caacgctgag 180

agcagtgact cagatggctt tgtcatccac gatggcgagt gcatgcaaga atgtccctca 240

ggcttcatcc gcaacagcac ccagaggtca gtggctcttg ttcccatcc aggaggtgaa 300

tcttgttcat attccatgat tgtaggaacc acccagaggt tcatccag 348

<210> 103

<211> 388

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> phân đoạn gen thụ thể của IGF-1 của chuột hamster trung quốc đột biến:

dòng biến thể 1 làm tắt gen của CHOK1: sao chép 14 nucleotit bị thay
thể

và 18 nucleotit thêm vào

<400> 103

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgcca cccagagtgc ctaggcagct gccatacacc 60

tgacgacaac acaacctgtg tggcctgccg acactactac tacaaaggcg tgtgtgtgcc 120

tgcctgcca cctggtgagg tataggacag tattatagag gtggggcagg gctggcgctg 180
 tgtggaccgc gatttctgcg ccaacatccc caacgctgag agcagtgact cagatggctt 240
 tgtcatccac gatggcgagt gcatgcaaga atgtccctca ggcttcatcc gcaacagcac 300
 ccagaggtca gtggctcttg ttcccatcc aggaggtgaa tcttgttcat attccatgat 360
 tgtaggaacc acccagaggt tcatccag 388

<210> 104

<211> 256

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> phân đoạn gen thụ thể của IGF-1 của chuột hamster trung quốc đột biến:

dòng biến thể 3 làm tắt gen của CHOK1: sao chép delta114

<400> 104

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgcca ccagagtgc tggcgctgtg tggaccgca 60
 tttctgcgcc aacatcccca acgctgagag cagtgactca gatggctttg tcatccacga 120
 tggcgagtgc atgcaagaat gtccctcagg cttcatccgc aacagcacc agaggtcagt 180
 ggctcttggt ccccatccag gaggtgaatc ttgttcatat tccatgattg taggaaccac 240
 ccagaggttc atccag 256

<210> 105

<211> 348

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> phân đoạn gen thụ thể của IGF-1 của chuột hamster trung quốc đột biến:
dòng biến thể làm tắt gen của CHO-DUXB11 : trình tự delta22

<400> 105

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgccca cccagagtgc ctaggcagct gccatacacc 60

tgacgacaac acaacctgtg tggcctgccg acactactac tacaaaggcg tgtgtgtgcc 120

tgccctgccca cctggcgctg tgtggaccgc gatttctgcg ccaacatccc caacgctgag 180

agcagtgact cagatggctt tgtcatccac gatggcgagt gcatgcaaga atgtccctca 240

ggcttcatcc gcaacagcac ccagaggtca gtggctcttg ttccccatcc aggaggtgaa 300

tcttgttcat attccatgat tgtaggaacc acccagaggt tcatccag 348

<210> 106

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> phân đoạn gen thụ thể của IGF-1 của chuột hamster trung quốc đột biến:
dòng biến thể làm tắt gen của CHO-DUXB11: trình tự delta7

<400> 106

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgccca cccagagtgc ctaggcagct gccatacacc 60

tgacgacaac acaacctgtg tggcctgccg acactactac tacaaaggcg tgtgtgtgcc 120

tgctgcca cctggcacct acagggctgg cgctgtgtgg accgcgattt ctgcgccaac 180

atccccaacg ctgagagcag tgactcagat ggctttgtca tccacgatgg cgagtgcagt 240

caagaatgtc cctcaggctt catccgcaac agcaccaga ggtcagtggc tcttgttccc 300

catccaggag gtgaatcttg ttcattattcc atgattgtag gaaccaccca gaggttcac 360

cag 363

<210> 107

<211> 41

<212> ADN

<213> Chuột Hamster Trung Quốc

<400> 107

cccacctggc acctacaggt tcgagggtg gcgctgtgtg g 41

<210> 108

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR: trình tự mỗi xuôi của CHO IGF1R (trong intron 2-3)

<400> 108

ctagcctgtc tctgggacac 20

<210> 109

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR: trình tự mỗi ngược của CHO IGF1R (trong intron 3-4)

<400> 109

ctggatgaac ctctgggtgg 20

<210> 110

<211> 313

<212> ADN

<213> Chuột Hamster Trung Quốc

<400> 110

tgtgccaag tgtgtgcgga aagcgagcgt gcaccgagaa caacgaatgc tgccaccag 60

agtgccatagg cagctgccat acacctgacg acaacacaac ctgtgtggcc tgccgacact 120

actactacaa aggcgtgtgt gtgcctgcct gccacctgg cacctacagg ttcgagggt 180

ggcgctgtgt ggaccgcat ttctgcgcca acatcccaa cgctgagagc agtgactcag 240

atggctttgt catccacgat ggcgagtgc tgcaagaatg tccctcaggc ttcacccgca 300

acagcaccca gag 313

<210> 111

<211> 774

<212> ADN

<213> Chuột Hamster Trung Quốc

<400> 111

```

aaacttaacg gcacatccca tagcaaacca ttccataaga aaggacttgg catgtgttgt      60

gtcctttccc agtgtgggct tcacagatgg tattacctgt gcagatttca gagaaagtgt      120

gtttttccta gcctgtctct gggacaccat ttagtgctgg ttgtggcagc agatgaccct      180

ggggaggctg tgtagtctct tcatctcacc acctcctccc cctgttccca cagtgtgcc      240

aagtgtgtgc ggaaagcgag cgtgcaccga gaacaacgaa tgctgccacc cagagtgcct      300

aggcagctgc catacacctg acgacaacac aacctgtgtg gcctgccgac actactacta      360

caaaggcgtg tgtgtgcctg cctgcccacc tggcacctac aggttcgagg gctggcgctg      420

tgtggaccgc gatttctgcg ccaacatccc caacgctgag agcagtgact cagatggctt      480

tgtcatccac gatggcgagt gcatgcaaga atgtccctca ggcttcatcc gcaacagcac      540

ccagaggtea gtggctcttg ttcccatcc aggaggtgaa tcttggtcat attccatgat      600

tgtaggaacc acccagaggt tcattccagat ggggaggctg ttggagggtg ctgactaagc      660

ttgtttttat gagaatcttg gaatggctgg tctgttcatt tctttgttg ttggcttgct      720

ttgttgtctt tgaaagtgcc ttgctagccc tagagaggaa gaattagcct gctg          774

```

<210> 112

<211> 14

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự Kozak

<400> 112

cccgcccgcc cacc

14

<210> 113

<211> 329

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72,
R74Q, R77Q, R104Q-fc

<400> 113

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
 65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
 85 90 95

Asn Tyr Gln Met Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 100 105 110

Ala Pro Glu Ala Ala 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

30883

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 Glu Glu Met		
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> 114

<211> 329

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIGF1-Ea-hFc_mut03

<400> 114

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1

5

10

15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20

25

30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Pro Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Tyr Gln Met Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 100 105 110

Ala Pro Glu Ala Ala 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 Glu Glu Met

30883

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> 115

<211> 33

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> peptit Ea của IGF-1 của người đột biến

<400> 115

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

1 5 10 15

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

20 25 30

Met

<210> 116

<211> 329

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIGF1-Ea-hFc_mut 12

<400> 116

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Ala Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

30883

35

40

45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50

55

60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Tyr Gln Met Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

100

105

110

Ala Pro Glu Ala Ala 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 Glu Glu Met
 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> 117

<211> 70

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: IGF-1 (G42S)

<400> 117

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe

1 5 10 15

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly

20 25 30

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys

35 40 45

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu

50 55 60

Lys Pro Ala Lys Ser Ala

65

70

<210> 118

<211> 102

<212> PRT

<213> Trình tự tổng hợp Nhân tạo

<220>

<223> Protein IGF-1 của người đột biến: hIGF1-Ea-mut 03-G42S

<400> 118

Gly Pro Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val

1 5 10 15

Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser

20 25 30

Ser Ser Arg Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe

35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys

50 55 60

Pro Ala Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys

65 70 75 80

Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly

30883

85

90

95

Asn Lys Asn Tyr Arg Met

100