



(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)



1-0032713

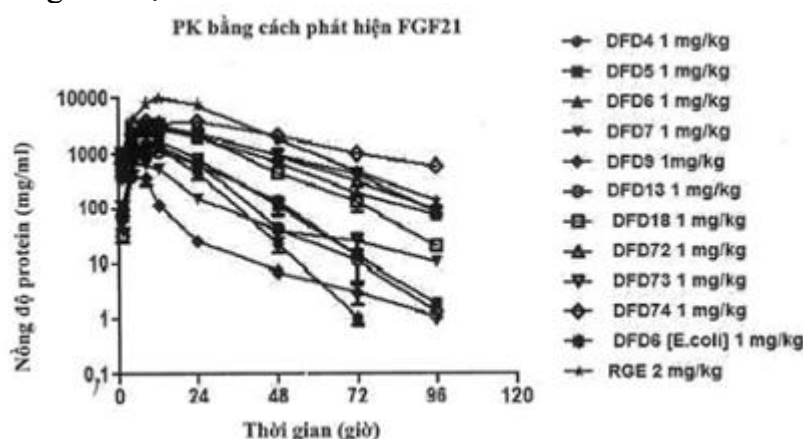
(51)⁸

C07K 14/50; C07K 19/00; A61K 38/18; (13) B
A61K 47/48

- (21) 1-2018-01421 (22) 28/10/2016
(86) PCT/KR2016/012288 28/10/2016 (87) WO 2017/074117 04/05/2017
(30) 10-2015-0150574 28/10/2015 KR
(45) 25/07/2022 412 (43) 25/09/2018 366A
(73) YUHAN CORPORATION (KR)
74, Noryangjin-ro, Dongjak-gu, Seoul 06927, Republic of Korea
(72) KIM, Jun Hwan (KR); LIM, Seyoung (KR); SEO, Minji (KR); CHOI, Hyun Ho (KR); KIM, Dohoon (KR); JU, Mi Kyeong (KR); PARK, Ju-Young (KR); CHOI, Byung Hyun (KR); LEE, Jun Kyung (KR); KIM, Jong Gyun (KR); NAM, Su Youn (KR).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PROTEIN DUNG HỢP FGF21 CÓ TÁC DỤNG KÉO DÀI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến protein dung hợp chứa protein đột biến FGF21 và vùng Fc của globulin miễn dịch. Protein dung hợp theo sáng chế có tác dụng dược lý, độ bền *in vivo* và độ ổn định protein được cải thiện, và dược phẩm chứa hoạt chất là protein dung hợp có thể được sử dụng một cách có hiệu quả làm tác nhân trị bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hóa, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu hoặc bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein dung hợp chứa protein đột biến của yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 21 (fibroblast growth factor - FGF21) có độ bền *in vivo*, độ ổn định protein và hoạt tính được lý được cải thiện, và được phẩm chứa protein này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 21 (FGF21), được tổng hợp ở gan, là hormon đóng vai trò quan trọng trong quá trình nội cân nặng bằng glucoza và lipit. FGF21 có tác dụng được lý ở gan, tế bào tạo mỡ, tế bào β của tụy, vùng dưới đồi của não, và mô cơ, trong đó cả hai thụ thể đặc hiệu với FGF21, tức là, thụ thể FGF, và phức chất β -klotho được biểu hiện. Đã có thông báo rằng ở mô hình linh trưởng không phải người và loài gặm nhấm mắc bệnh đái tháo đường và bệnh chuyển hóa khác nhau, FGF21 có thể làm giảm nồng độ glucoza trong máu theo cách độc lập với insulin, làm giảm cân nặng, và làm giảm nồng độ triglycerit và lipoprotein tỷ trọng thấp (low-density lipoprotein - LDL) trong máu. Ngoài ra, do nó có tác dụng cải thiện độ nhạy với insulin, nên FGF21 có thể được phát triển làm tác nhân trị liệu mới đối với bệnh đái tháo đường và bệnh béo phì (xem WO2003/011213).

Do đó, để phát triển thuốc trị bệnh đái tháo đường mới trên cơ sở FGF21, đã và đang có nhiều nỗ lực nhằm cải thiện hoạt tính sinh học của nó và độ ổn định *in vivo* bằng cách tạo ra các thể đột biến FGF21 trên cơ sở trình tự FGF21 tự nhiên bằng cách thay thế, xen, và làm khuyết một số axit amin (xem WO2010/065439). Tuy nhiên, do FGF21 có thời gian bán tồn rất ngắn, nên nếu dùng trực tiếp nó làm tác nhân trị liệu sinh học thì sẽ gặp phải nhiều vấn đề (Kharitononkov, A. et al. (2005) *Journal of*

Clinical Investigation 115:1627-1635). Thời gian bán tồn *in vivo* của FGF21 là từ 1 đến 2 giờ ở chuột nhắt, và từ 2,5 đến 3 giờ ở khỉ. Do đó, đối với FGF21 cần sử dụng ở nguyên dạng để làm tác nhân trị bệnh đái tháo đường, thì việc dùng nó hằng ngày là cần thiết.

Các phương pháp khác nhau đã và đang được thông báo nỗ lực làm tăng thời gian bán tồn *in vivo* của protein FGF21 tái tổ hợp. Ví dụ, một phương pháp như vậy là nhằm liên kết polyetylen glycol (PEG), nghĩa là, nguyên liệu polyme, với FGF21 để làm tăng phân tử lượng của nó, nhờ đó ức chế quá trình tiết ở thận và làm tăng thời gian lưu *in vivo* (xem WO2012/066075). Phương pháp khác là nhằm cải thiện thời gian bán tồn bằng cách dung hợp nó với axit béo, mà gắn kết với albumin của người (xem WO2012/010553). Các nỗ lực làm ví dụ khác để làm tăng thời gian bán tồn đồng thời duy trì được hoạt tính được lý tương đương với hoạt tính của FGF21 tự nhiên bằng cách tạo ra kháng thể chủ vận, mà gắn kết đặc hiệu chỉ với thụ thể FGF của người hoặc ở dạng phức chất với β -klotho (xem WO2012/170438). Trong ví dụ khác, thời gian bán tồn được cải thiện bằng cách tạo ra các protein dung hợp có tác dụng kéo dài, trong đó vùng Fc của IgG được dung hợp vào phân tử FGF21 (xem WO2013/188181).

Trong số các kỹ thuật khác nhau có sẵn để tạo ra các thuốc có tác dụng kéo dài, kỹ thuật tạo Fc dung hợp được sử dụng nhiều do nó có ít nhược điểm hơn so với các phương pháp khác, như tạo ra đáp ứng miễn dịch hoặc độc tính đồng thời làm tăng thời gian bán tồn *in vivo*. Để phát triển thuốc điều trị có tác dụng kéo dài là protein FGF21 được dung hợp với Fc, các điều kiện sau cần được thỏa mãn.

Trước tiên, việc làm giảm hoạt tính *in vitro* gây ra bởi thể dung hợp cần được giảm đến mức tối thiểu. Cả đầu tận cùng N và đầu tận cùng C của FGF21 đều có liên quan đến hoạt tính của FGF21. Về mặt này, đã biết rằng hoạt tính của các protein dung hợp FGF21 thay đổi chủ yếu tùy thuộc vào vị trí của thể dung hợp này. Do đó, hoạt tính của các protein dung hợp FGF21 được dung hợp với Fc, trong đó các đột biến được đưa vào FGF21, có thể thay đổi tùy thuộc vào sự có mặt/không có mặt hoặc vị trí của thể dung hợp. Thứ hai, protein được động học cho phép dùng trong khoảng thời gian

là 1 lần/tuần ở người thu được bằng cách làm tăng thời gian bán tồn *in vivo* bởi thể dung hợp này. Thứ ba, cần nhắc nhở rằng độ sinh miễn dịch có thể được kỳ vọng ở hầu hết các bệnh nhân sau khi dùng sinh được phẩm, nguy cơ sinh miễn dịch do liên kết hoặc thể đột biến dung hợp cần được giảm đến mức tối thiểu. Thứ tư, không gặp phải các vấn đề về độ ổn định do vị trí của thể dung hợp hoặc việc đưa thể đột biến vào. Thứ năm, do các đáp ứng miễn dịch không mong muốn có thể xuất hiện tùy thuộc vào các isotyp của globulin miễn dịch đã được dung hợp, nên cách giải quyết nhằm ngăn ngừa các đáp ứng như vậy là cần thiết.

Đã có thông báo về nỗ lực phát triển protein dung hợp có tác dụng kéo dài bằng cách liên kết vùng Fc của globulin miễn dịch G (IgG) với phân tử FGF21 (*xem* WO 2013/188181). Trong trường hợp một cấu trúc Fc-FGF21, trong đó Fc được dung hợp với đầu tận cùng N của FGF21 tự nhiên, đồng thời không có sự khác biệt rõ rệt về hoạt tính *in vitro* so với hoạt tính của FGF21 tự nhiên, thấy rằng thời gian bán tồn là rất ngắn do xảy ra quá trình thoái biến protein *in vivo*. Để giải quyết vấn đề này, đã có nỗ lực nhằm cải thiện thời gian bán tồn *in vivo* bằng cách đưa một số đột biến ở các vị trí đặc hiệu của FGF21 vào để kháng lại quá trình thoái biến protein. Tuy nhiên, nguy cơ sinh miễn dịch có thể tăng lên cùng với việc đưa nhiều đột biến vào. Trái lại, trong trường hợp cấu trúc FGF21-Fc, trong đó Fc được dung hợp với đầu tận cùng C của phân tử FGF21, thấy rằng hoạt tính bị giảm đáng kể do sự dung hợp xảy ra ở vị trí này so với cấu trúc Fc-FGF21.

Các tác giả sáng chế đã nỗ lực cải thiện hoạt tính sinh lý và độ ổn định của FGF21 và đã phát hiện ra rằng tác dụng dược lý của FGF21 có thể được cải thiện và mức độ tiếp xúc *in vivo* và thời gian bán tồn của FGF21 có thể được tăng lên mà không ảnh hưởng đến hoạt tính *in vitro* khi đột biến được đưa vào vị trí cụ thể của FGF21 và vùng Fc của globulin miễn dịch được liên kết với nó, nhờ đó tạo ra sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất protein dung hợp chứa protein đột biến FGF21 có độ bền *in vivo* được cải thiện, độ ổn định và hiệu quả được lý của protein.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất được phẩm chứa protein dung hợp này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phân tử axit nucleic phân lập mã hóa protein dung hợp này, vật truyền biểu hiện chứa phân tử axit nucleic này, và tế bào chủ chứa vật truyền biểu hiện này.

Giải quyết vấn đề

Sáng chế đề cập đến protein dung hợp chứa protein đột biến FGF21 và vùng Fc của globulin miễn dịch, trong đó protein đột biến FGF21 này chứa ít nhất một đột biến được chọn từ nhóm bao gồm các đột biến từ (1) đến (7) sau:

- (1) thay thế axit amin ở các vị trí từ 98 đến 101 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng trình tự axit amin EIRP (SEQ ID NO: 42);
- (2) thay thế axit amin ở các vị trí từ 170 đến 174 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng trình tự axit amin TGLEAV (SEQ ID NO: 43);
- (3) thay thế axit amin ở các vị trí từ 170 đến 174 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng trình tự axit amin TGLEAN (SEQ ID NO: 44);
- (4) thay thế axit amin ở vị trí 170 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng axit amin N;
- (5) thay thế axit amin ở vị trí 174 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng axit amin N;
- (6) thay thế axit amin ở vị trí 180 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng axit amin E, cùng với một hoặc nhiều đột biến từ (1) đến (5) nêu trên; và
- (7) đột biến gồm 1 đến 10 axit amin để làm giảm độ sinh miễn dịch của protein FGF21 tự nhiên.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa protein dung hợp để điều trị bệnh

đái tháo đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hóa, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu hoặc bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic phân lập mã hóa protein dung hợp này, vật truyền biểu hiện chứa phân tử axit nucleic này, và tế bào chủ chứa vật truyền biểu hiện này.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Protein dung hợp theo sáng chế, được tạo ra bằng cách liên kết vùng Fc của globulin miễn dịch của người với protein đột biến FGF21, có độ bền *in vivo* được cải thiện, độ ổn định và hiệu quả được lý của protein. Ngoài ra, dược phẩm chứa hoạt chất là protein dung hợp này có thể được sử dụng làm tác nhân trị bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hóa, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu hoặc bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu. Cụ thể, dược phẩm theo sáng chế có ưu điểm là khoảng thời gian dùng kéo dài do độ ổn định *in vivo* tăng lên của protein dung hợp FGF21 so với khoảng thời gian dùng thông thường của dược phẩm chứa protein FGF21.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A đến Fig.1C là các đồ thị thể hiện kết quả xác định hoạt tính *in vitro* của các protein dung hợp chứa các protein đột biến FGF21 (dưới đây được gọi là “protein dung hợp đột biến FGF21”) bằng cách sử dụng dòng tế bào HEK293, trong đó β -klotho của người được biểu hiện quá mức. Đã nhận thấy rằng biến thể protein dung hợp đột biến FGF21 không làm giảm đáng kể hoạt tính do việc đưa các đột biến vào.

Fig.2A và Fig.2B là các đồ thị thể hiện kết quả xác định hoạt tính *in vitro* của các protein dung hợp đột biến FGF21 tùy thuộc vào các liên kết mà liên kết đầu tận cùng N của FGF21 với vùng Fc bằng cách sử dụng dòng tế bào HEK293, trong đó β -klotho của người được biểu hiện quá mức. Đã nhận thấy rằng biến thể protein dung hợp đột biến FGF21 không làm giảm đáng kể hoạt tính, mặc dù quan sát thấy sự khác biệt nhỏ về

hoạt tính tùy thuộc vào trình tự liên kết.

Fig.3 là đồ thị thể hiện kết quả xác định hoạt tính *in vitro* của RGE (Amgen), Fc-FGF21 (Lilly) và DFD1 bằng cách sử dụng dòng tế bào HEK293, trong đó β -klotho của người được biểu hiện quá mức. DFD1 và RGE (Amgen) có hoạt tính tương tự, trong khi đó Fc-FGF21 (Lilly) có hoạt tính *in vitro* cao gấp hai lần so với các protein khác.

Fig.4 là các đồ thị so sánh độ ổn định của DFD4 với DFD13 để khẳng định ảnh hưởng của đột biến EIRP (trong FGF21) đối với độ ổn định protein dung hợp. Đã xác nhận rằng DFD13 có tỷ lệ có khối kết tụ có phân tử lượng lớn (HMW %) thấp hơn ở trạng thái ban đầu và ở thời điểm sau hơn 2 tuần so với DFD4, mà chỉ ra rằng việc đưa đột biến EIRP cải thiện độ ổn định protein dung hợp đột biến FGF21, nhờ đó làm giảm đáng kể HMW %.

Fig.5 là đồ thị thể hiện nồng độ của mỗi protein trong máu trong 96 giờ sau khi dùng dưới da các protein dung hợp đột biến FGF21. Dữ liệu được thể hiện là trị số trung bình và độ lệch chuẩn.

Fig.6 là đồ thị thể hiện nồng độ glucoza trong máu ở mô hình chuột nhắt *ob/ob* sau khi tiêm dưới da riêng rẽ DFD18, DFD72, DFD74 hoặc Fc-FGF21 (Lilly). Tất cả DFD18, DFD72 và DFD74 đều có tác dụng làm giảm nồng độ glucoza trong máu liên tục. Dữ liệu được thể hiện là trị số trung bình và độ lệch chuẩn của trị số trung bình (S.E.M.).

Fig.7 là các đồ thị thể hiện mức thay đổi về cân nặng ở mô hình chuột nhắt *ob/ob* từ ngày bắt đầu dùng đến ngày thứ 14 sau khi tiêm dưới da riêng rẽ DFD18, DFD72, DFD74 hoặc Fc-FGF21 (Lilly). Tất cả DFD18, DFD72 và DFD74 đều có tác dụng làm giảm cân nặng hơn so với nhóm được điều trị bằng PBS. Dữ liệu được thể hiện là trị số trung bình và độ lệch chuẩn của trị số trung bình.

Fig.8 là các đồ thị thể hiện mức thay đổi về nồng độ hemoglobin được glycat hóa ở mô hình chuột nhắt *ob/ob* ở các ngày dùng (ngày thứ nhất) và ngày thứ 16 sau khi tiêm dưới da riêng rẽ DFD18, DFD72, DFD74 hoặc Fc-FGF21 (Lilly). Tất cả DFD18, DFD72 và DFD74 đều làm giảm nồng độ hemoglobin được glycat hóa ở ngày thứ 16 so

với nồng độ ở ngày dùng. Dữ liệu được thể hiện là trị số trung bình và độ lệch chuẩn của trị số trung bình.

Fig.9 là đồ thị thể hiện nồng độ glucoza trong máu ở mô hình chuột nhắt HFD/STZ sau khi tiêm dưới da riêng rẽ DFD72 hoặc DFD74. Cả DFD72 và DFD74 đều có tác dụng làm giảm nồng độ glucoza trong máu liên tục. Dữ liệu được thể hiện là trị số trung bình và độ lệch chuẩn của trị số trung bình.

Fig.10 là đồ thị thể hiện mức thay đổi về cân nặng ở mô hình chuột nhắt HFD/STZ từ ngày bắt đầu dùng đến ngày thứ 14 sau khi tiêm dưới da riêng rẽ DFD72 hoặc DFD74. Cả DFD72 và DFD74 đều có tác dụng làm giảm cân nặng hơn so với nhóm được điều trị bằng PBS. Dữ liệu được thể hiện là trị số trung bình và độ lệch chuẩn của trị số trung bình.

Fig.11 là đồ thị thể hiện mức thay đổi về nồng độ hemoglobin được glycat hóa ở mô hình chuột nhắt HFD/STZ ở ngày thứ nhất và ngày thứ 13 sau khi tiêm dưới da riêng rẽ DFD72 hoặc DFD74. Nhận thấy rằng cả việc điều trị bằng DFD72 và DFD74 đều có tác dụng làm giảm mạnh nồng độ hemoglobin được glycat hóa hơn so với nhóm được điều trị bằng PBS. Dữ liệu được thể hiện là trị số trung bình và độ lệch chuẩn của trị số trung bình.

Fig. 12 là đồ thị thể hiện mức thay đổi về sự thay đổi về cân nặng được xác định ở mô hình chuột nhắt mắc bệnh béo phì do ăn uống từ ngày bắt đầu dùng đến ngày thứ 14 sau khi dùng riêng rẽ DFD18. DFD18 có tác dụng làm giảm vượt trội cân nặng. Dữ liệu được thể hiện là trị số trung bình và độ lệch chuẩn của trị số trung bình.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến protein dung hợp chứa protein đột biến yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 21 (FGF21) và vùng Fc của globulin miễn dịch, trong đó protein đột biến FGF21 này chứa ít nhất một đột biến được chọn từ nhóm bao gồm các đột biến từ (1) đến (7) sau:

(1) thay thế axit amin ở các vị trí từ 98 đến 101 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng trình tự axit amin EIRP (SEQ ID NO: 42) (sau đây được gọi là “EIRP”);

(2) thay thế axit amin ở các vị trí từ 170 đến 174 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng trình tự axit amin TGLEAV (SEQ ID NO: 43) (sau đây được gọi là “TGLEAV”);

(3) thay thế axit amin ở các vị trí từ 170 đến 174 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng trình tự axit amin TGLEAN (SEQ ID NO: 44) (sau đây được gọi là “TGLEAN”);

(4) thay thế axit amin ở vị trí 170 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng axit amin N (sau đây được gọi là “G170N”);

(5) thay thế axit amin ở vị trí 174 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng axit amin N (sau đây được gọi là “G174N”);

(6) thay thế axit amin ở vị trí 180 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng axit amin E (sau đây được gọi là “A180E”), cùng với một hoặc nhiều đột biến từ (1) đến (5) nêu trên; và

(7) đột biến gồm 1 đến 10 axit amin để làm giảm độ sinh miễn dịch của protein FGF21 tự nhiên.

Protein FGF21 tự nhiên, đã biết là hormon đóng vai trò quan trọng trong quá trình nội cân nặng bằng glucoza và lipid, có thể là protein có nguồn gốc từ động vật có vú như người, chuột nhắt, lợn, khỉ, v.v., tốt hơn là từ người. Tốt hơn nữa, nếu protein FGF21 tự nhiên có thể là protein FGF21 tự nhiên của người có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Tốt hơn, nếu đột biến này có liên quan tới các protein đột biến FGF21 có thể là đột biến bất kỳ trong số các đột biến EIRP, TGLEAV, TGLEAN, G170N và G174N; dạng kết hợp của đột biến bất kỳ trong số các đột biến TGLEAV, TGLEAN, G170N và G174N và đột biến EIRP; dạng kết hợp của bất kỳ trong số các đột biến EIRP, TGLEAV, TGLEAN, G170N và G174N và đột biến A180E; hoặc dạng kết hợp của bất

kỳ trong số các đột biến TGLEAV, TGLEAN, G170N và G174N, đột biến EIRP và đột biến A180E. Hơn thế nữa, các protein đột biến FGF21 có thể có cấu dạng, trong đó 1 đến 10 axit amin ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C được làm khuyết hơn so với protein FGF21 tự nhiên. Tốt hơn nữa, nếu các protein đột biến FGF21 có thể chứa trình tự axit amin được thể hiện trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6 đến 23. Còn tốt hơn nữa, nếu các protein đột biến FGF21 có thể chứa trình tự axit amin được thể hiện trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6 đến 23 và còn có cấu dạng, trong đó 1 đến 10 axit amin ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C được làm khuyết hơn so với protein FGF21 tự nhiên.

Trong protein dung hợp, gốc axit amin N của protein đột biến FGF21 đã được đưa vào bởi đột biến có thể được glycosyl hóa.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "vùng Fc," "mảnh Fc," hoặc "Fc" được dùng để chỉ protein, bao gồm vùng ổn định chuỗi nặng 1 (CH1), vùng ổn định chuỗi nặng 2 (CH2) và vùng ổn định chuỗi nặng 3 (CH3) của globulin miễn dịch, nhưng không bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và vùng ổn định chuỗi nhẹ 1 (CL1) của globulin miễn dịch. Ngoài ra, trong bản mô tả này, thuật ngữ "đột biến vùng Fc" được dùng để chỉ đột biến được tạo ra bằng cách thế một phần axit amin của vùng Fc hoặc bằng cách kết hợp các vùng Fc của các loại khác nhau.

Vùng Fc của globulin miễn dịch có thể là vùng Fc nguyên vẹn tạo nên kháng thể, mảnh của nó, hoặc đột biến vùng Fc. Ngoài ra, vùng Fc bao gồm phân tử ở dạng monome hoặc multime, và có thể còn bao gồm vùng bản lề của vùng ổn định chuỗi nặng. Đột biến vùng Fc có thể được cải biến để ngăn ngừa sự phân cắt ở vùng bản lề. Hơn thế nữa, trình tự bản lề của Fc có thể có đoạn thế ở một số trình tự axit amin để làm giảm độc tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) hoặc độc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC). Ngoài ra, một phần trình tự axit amin của trình tự bản lề Fc có thể được thế để ức chế quá trình chuyển vị của vùng Fab. Gốc lysin ở đầu tận cùng C của Fc có thể được loại bỏ.

Tốt hơn, nếu vùng Fc của globulin miễn dịch có thể là vùng bất kỳ trong số các

vùng Fc của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 và IgD; hoặc Fc lai, là dạng kết hợp của chúng. Ngoài ra, Fc lai có thể bao gồm vùng IgG4 và vùng IgD. Ngoài ra, vùng Fc lai có thể bao gồm một phần trình tự bản lề và CH2 của IgD Fc, và các trình tự CH2 và CH3 của IgG4 Fc.

Ngoài ra, mảnh Fc theo sáng chế có thể là ở dạng chuỗi được glycosyl hóa tự nhiên, chuỗi được glycosyl hóa nhiều hơn so với tự nhiên, chuỗi được glycosyl hóa ít hơn so với tự nhiên, hoặc chuỗi được khử glycosyl hóa. Việc tăng, giảm, hoặc loại bỏ chuỗi được glycosyl hóa có thể được tiến hành bởi phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này, như phương pháp hóa học, phương pháp enzym, và phương pháp kỹ thuật di truyền bằng cách sử dụng vi sinh vật.

Ngoài ra, vùng Fc của globulin miễn dịch có thể nêu trong SEQ ID NO: 24 hoặc 25. Ngoài ra, vùng Fc của globulin miễn dịch có thể nêu trong SEQ ID NO: 26.

Ngoài ra, protein dung hợp có thể còn bao gồm liên kết.

Protein dung hợp có thể là ở dạng, trong đó protein đột biến FGF21 được nối trực tiếp với đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của vùng Fc của globulin miễn dịch, hoặc protein đột biến FGF21 được nối với vùng Fc của globulin miễn dịch bằng liên kết.

Trong trường hợp này, liên kết có thể được nối với đầu tận cùng N, đầu tận cùng C, hoặc gốc tự do của mảnh Fc, và ngoài ra, có thể được nối với đầu tận cùng N, đầu tận cùng C, hoặc gốc tự do của protein đột biến FGF21. Khi liên kết là liên kết peptit, việc kết nối này có thể xảy ra ở vùng bất kỳ. Ví dụ, liên kết có thể được nối với đầu tận cùng C của vùng Fc của globulin miễn dịch và đầu tận cùng N của protein đột biến FGF21 để tạo ra protein dung hợp của vùng Fc của globulin miễn dịch và protein đột biến FGF21.

Khi liên kết và Fc được biểu hiện riêng rẽ và sau đó được nối với nhau, thì liên kết này có thể là tác nhân tạo liên kết ngang đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ về tác nhân tạo liên kết ngang có thể bao gồm 1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenyletan, glutaraldehyt, imidoeste bao gồm N-hydroxysuccinimit este như axit 4-azidosalixylic và disuccinimidyl este như 3,3'-dithiobis(succinimidylpropionat), và maleimit hai chức như bis-N-maleimido-1,8-octan, nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này.

Ngoài ra, liên kết có thể là peptit. Tốt hơn, nếu liên kết có thể là peptit được cấu thành bởi 10 đến 30 gốc axit amin.

Hơn thế nữa, alanin còn có thể được gắn vào một đầu của liên kết. Tốt hơn, nếu liên kết có thể là peptit có trình tự axit amin được thể hiện trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 đến 5.

Protein dung hợp có thể ở dạng trong đó dimer hoặc multimer của các protein đột biến FGF21, trong đó một hoặc nhiều protein đột biến FGF21 được liên kết với nhau, được nối với vùng Fc của globulin miễn dịch. Ngoài ra, protein dung hợp có thể ở dạng dimer hoặc multimer trong đó hai hoặc nhiều vùng globulin miễn dịch Fc được liên kết với nhau, trong đó vùng globulin miễn dịch Fc có protein đột biến FGF21 được nối vào đó.

Ngoài ra, protein dung hợp có thể là peptit mà tốt hơn là có trình tự axit amin được thể hiện trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 27 đến 39. Tốt hơn nữa, nếu protein dung hợp bao gồm protein đột biến FGF21 có thể là peptit mà có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 36, 37 hoặc 39.

Độ sinh miễn dịch như được mô tả trong mục (7) nêu trên có thể được dự đoán bởi phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, độ sinh miễn dịch tiềm năng của protein có thể được sàng lọc bằng cách sử dụng, ví dụ, các phương pháp iTope™ và TCED™.

Ngoài ra, các đột biến để làm giảm thiểu độ sinh miễn dịch có thể được thiết kế bởi phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, khi độ sinh miễn dịch được quan sát bằng cách tiến hành phân tích EpiScreen™ để đánh giá độ sinh miễn dịch tiềm năng, trình tự axit amin tạo ra độ sinh miễn dịch có thể được nhận diện bằng cách lập bản đồ epitop tế bào T, và các đột biến có độ sinh miễn dịch được giảm đến mức tối thiểu có thể được thiết kế bằng cách dự đoán trên máy tính (*in silico*).

Protein dung hợp có thể có dạng với một hoặc nhiều protein có hoạt tính sinh học được liên hợp tiếp. Protein có hoạt tính sinh học có thể là protein được chọn từ nhóm bao gồm insulin, C-peptit, leptin, glucagon, gastrin, polypeptit ức chế dịch vị (GIP),

amylin, calcitonin, cholecystokinin, peptit YY, neuropeptit Y, protein-6 tạo xương (BMP-6), protein-9 tạo xương (BMP-9), oxyntomodulin, oxytocin, peptit-1 tương tự glucagon (GLP-1), peptit-2 tương tự glucagon (GLP-2), irisin, protein 5 chứa miền fibronectin loại III (FNDC5), apelin, adiponectin, C1q và protein liên quan đến yếu tố gây hoại tử khối u (họ CTRP), resistin, visfatin, omentin, protein-4 gắn kết với retinol (RBP-4), glicentin, angiopoietin, interleukin-22 (IL-22), exendin-4 và hormon tăng trưởng. Tốt hơn, nếu protein có hoạt tính sinh học có thể là protein được chọn từ GLP-1, đột biến của nó và exendin-4.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa protein dung hợp để điều trị rối loạn liên quan đến FGF21.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “rối loạn liên quan đến FGF21” có thể bao gồm bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường typ I và typ II, bệnh viêm tụy, rối loạn mỡ máu, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD), bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH), kháng insulin, chứng tăng insulin huyết, chứng kháng dung nạp glucoza, chứng tăng glucoza huyết, hội chứng chuyển hóa, chứng nhồi máu cơ tim cấp tính, bệnh tăng huyết áp, bệnh tim mạch, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại vi, chứng ngạt máu, bệnh suy tim, bệnh động mạch vành tim, bệnh thận, biến chứng của bệnh đái tháo đường, bệnh thần kinh, chứng liệt dạ dày, rối loạn có liên quan tới các đột biến bất hoạt nghiêm trọng ở thụ thể insulin, và các rối loạn chuyển hóa khác. Tốt hơn, nếu rối loạn liên quan đến FGF21 có thể là bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hóa, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu, bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu hoặc bệnh tim mạch.

Ngoài ra, dược phẩm có thể còn bao gồm chất mang dược dụng. Chất mang dược dụng này có thể là chất mang bất kỳ với điều kiện nó không phải là nguyên liệu không độc thích hợp để phân phối các kháng thể tới bệnh nhân. Ví dụ, nước cất, rượu, chất béo, sáp ong và chất rắn không có hoạt tính có thể được bao hàm là chất mang. Chất hỗ trợ dược dụng (chất đệm, chất phân tán) cũng có thể được bao hàm trong dược phẩm. Trong các dược phẩm này, nồng độ của protein dung hợp có thể thay đổi đáng kể.

Đặc biệt, dược phẩm có thể chứa nguyên liệu bào chế để làm thay đổi, duy trì, hoặc bảo quản độ pH, nồng độ mol, độ nhớt, độ trong suốt, màu sắc, tính đẳng trương, mùi, mức độ tiết trùng, độ ổn định, tốc độ hòa tan hoặc tốc độ giải phóng, khả năng hấp thụ, hoặc độ thấm từ của dược phẩm. Ví dụ về nguyên liệu bào chế thích hợp có thể bao gồm axit amin (ví dụ, glyxin, glutamin, asparagin, arginin hoặc lysin), chất kháng vi sinh vật, chất chống oxy hóa (ví dụ, axit ascorbic, natri sulfit hoặc natri bisulfit), chất đệm (ví dụ, borat, bicarbonat, Tris-HCl, xitrat, phosphat hoặc axit hữu cơ khác), chất tạo khối (ví dụ, manitol hoặc glyxin), chất càn hóa (ví dụ, axit etylenđiaminetetraaxetic (EDTA)), chất tạo phức chất (ví dụ, cafein, polyvinylpyrrolidion, β -xyclodextrin hoặc hydroxypropyl- β -xyclodextrin), chất độn, monosacarit, disacarit và hydrat cacbon khác (ví dụ, glucoza, manosa hoặc dextrin), các protein (ví dụ, albumin huyết thanh, gelatin hoặc globulin miễn dịch), chất tạo màu, hương liệu, chất pha loãng, chất nhũ hoá, polyme ưa nước (ví dụ, polyvinylpyrrolidion), polypeptit phân tử lượng thấp, ion trái dấu tạo muối (ví dụ, natri), chất bảo quản (ví dụ, benzalkoni clorua, axit benzoic, salixylic axit, thimerosal, rượu phenetylic, metylparaben, propylparaben, chlorhexidine, axit sorbic hoặc hydro peroxit), các dung môi (ví dụ, glyxerin, propylen glycol hoặc polyetylen glycol), rượu đường (ví dụ, manitol hoặc sorbitol), chất tạo huyền phù, chất hoạt động bề mặt hoặc chất giữ ẩm (ví dụ, pluronic; PEG; sorbitan este; polysorbat, ví dụ, polysorbat 20 hoặc polysorbat 80; triton; tromethamin; lexitin; cholesteol hoặc tyloxapol), chất cải thiện độ ổn định (ví dụ, sucroza hoặc sorbitol), chất cải thiện sự phát triển (ví dụ, halogenua của kim loại kiềm, tốt hơn là natri clorua hoặc kali clorua; hoặc manitol, sorbitol), tá dược lỏng phân phối, chất pha loãng, tá dược và/hoặc chất bổ trợ dược dụng, nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn liên quan đến FGF21 bao gồm việc cho đối tượng có nhu cầu ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh dùng protein dung hợp. Phương pháp này bao gồm, cụ thể, dùng an lượng hữu hiệu của protein dung hợp theo sáng chế cho động vật có vú có triệu chứng của

bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hóa, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu, bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu hoặc bệnh tim mạch là rối loạn liên quan đến FGF21.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng qua các đường bất kỳ. Dược phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp cho động vật một cách trực tiếp (ví dụ, khu trú, bằng cách dùng cho các vùng mô bằng cách tiêm, cấy ghép, hoặc bằng cách dùng khu trú) hoặc toàn thân (ví dụ, dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường ruột) theo cách thích hợp bất kỳ. Khi dược phẩm theo sáng chế được dùng theo đường ngoài ruột qua đường tĩnh mạch, dưới da, mắt, trong màng bụng, trong cơ, đường miệng, trực tràng, trong ổ mắt, trong não, trong sọ, trong xương sống, trong tâm thất, trong vỏ, trong bể, trong bao vỏ, đường qua mũi, hoặc khí dung, dược phẩm tốt hơn là nước hoặc có thể bao gồm một phần huyền phù hoặc dung dịch lỏng mà cơ thể chấp nhận được về mặt sinh lý. Do đó, chất mang hoặc chất dẫn thuốc có thể được bổ sung vào dược phẩm và được phân phối cho bệnh nhân do nó được chấp nhận về mặt sinh lý. Do đó, dung dịch nước muối thích hợp về mặt sinh lý có thể thường làm chất mang như dịch lỏng dùng cho dược phẩm.

Ngoài ra, số lần dùng có thể thay đổi tùy thuộc vào các thông số dược động học của protein dung hợp trong chế phẩm cần dùng. Thông thường, các bác sĩ có thể dùng chế phẩm cho tới khi liều dùng đạt được tác dụng mong muốn. Do đó, chế phẩm có thể được dùng ở dạng liều đơn vị, ít nhất hai liều cách nhau 1 khoảng thời gian (có thể hoặc có thể không chứa lượng tương đương của protein dung hợp đích) hoặc được dùng bằng cách tiêm liên tục thông qua thiết bị hoặc ống thông cấy ghép. Độ chính xác của việc bổ sung liều dùng thích hợp có thể thường được tiến hành bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và tương ứng với phạm vi của công việc thường được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình này.

Ngoài ra, liều đơn vị ưu tiên của protein dung hợp ở người có thể nằm trong khoảng từ 0,01 µg/kg đến 100 mg/kg cân nặng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 µg/kg đến 10 mg/kg cân nặng. Mặc dù đây là lượng tối ưu, nhưng liều đơn vị có thể

thay đổi tùy thuộc vào bệnh cần được điều trị hoặc sự có mặt/không có mặt của các tác dụng phụ. Tuy nhiên, liều dùng tối ưu có thể được xác định bằng cách tiến hành thử nghiệm thông thường. Việc dùng protein dung hợp có thể được tiến hành bằng cách tiêm liều cao định kỳ, bể lớn bên ngoài (ví dụ, túi tĩnh mạch), hoặc dùng liên tục trong tĩnh mạch, dưới da, hoặc trong màng bụng từ nguồn bên trong (ví dụ, mô cấy ăn mòn sinh học).

Ngoài ra, protein dung hợp theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng nhận cùng với phân tử có hoạt tính sinh học khác. Việc kết hợp tối ưu protein dung hợp và các phân tử khác, dạng liều lượng, và liều tối ưu có thể được xác định bằng thử nghiệm thông thường đã biết trong lĩnh vực này.

Vẫn theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic phân lập mã hóa protein dung hợp.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “phân tử axit nucleic phân lập” được dùng để chỉ phân tử axit nucleic theo sáng chế, mà được tách ra từ khoảng ít nhất 50% protein, lipid, hydrat cacbon, hoặc các nguyên liệu khác, đã phát hiện trong tự nhiên khi các axit nucleic toàn phần được tách ra từ tế bào nguồn; được liên kết linh hoạt với polynucleotit mà không được liên kết trong tự nhiên; hoặc là một phần của trình tự polynucleotit lớn hơn và không xuất hiện trong tự nhiên. Tốt hơn, nếu trong các phân tử axit nucleic được phân lập theo sáng chế, về cơ bản là không có mặt các axit nucleic bị nhiễm khác bất kỳ, hoặc các tạp chất khác mà được phát hiện trong môi trường tự nhiên và ức chế việc sử dụng axit nucleic trong quá trình sản xuất polypeptit, hoặc điều trị, chẩn đoán, ngăn ngừa, hoặc nghiên cứu.

Trong trường hợp này, các phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa protein dung hợp có thể có các trình tự khác so với các phân tử khác do codon dư thừa. Hơn thế nữa, với điều kiện axit nucleic được phân lập có thể sản sinh protein dung hợp, axit nucleic được phân lập có thể được cải biến thích hợp, hoặc nucleotit có thể được bổ sung vào đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của axit nucleic được phân lập theo mục đích mong muốn.

Axit nucleic được phân lập có thể bao gồm, ví dụ, trình tự nucleotit được thể hiện trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45 đến 57.

Vẫn theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vật truyền biểu hiện chứa phân tử axit nucleic phân lập, mã hóa protein dung hợp bao gồm protein đột biến FGF21 và vùng Fc của globulin miễn dịch.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “vật truyền biểu hiện” được dùng để chỉ vật truyền chứa trình tự axit nucleic, là thích hợp để biến nạp tế bào chủ và hướng tới hoặc kiểm soát sự biểu hiện của trình tự axit nucleic khác loại đã được xen. Vật truyền biểu hiện bao gồm axit nucleic mạch thẳng, plasmit, phagemit, cosmit, vật truyền ARN, vật truyền của virus, và các chất tương tự của nó. Ví dụ về vật truyền của virus bao gồm retrovirus, adenovirus và virus liên quan đến adeno, nhưng không chỉ giới hạn ở các vật truyền này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “sự biểu hiện trình tự axit nucleic khác loại” hoặc “sự biểu hiện” protein đích được dùng để chỉ phiên mã trình tự ADN đã được xen, dịch mã bản sao mRNA, và sản sinh sản phẩm protein dung hợp Fc, kháng thể hoặc mảnh kháng thể.

Vật truyền biểu hiện hữu ích có thể là RCMV (Invitrogen, Carlsbad) hoặc đột biến của nó. Vật truyền biểu hiện hữu ích này có thể bao gồm gen khởi đầu cytomegalovirus của người (CMV) để thúc đẩy phiên mã liên tục gen đích ở tế bào động vật có vú, và trình tự tín hiệu polyadenyl hóa hormon tăng trưởng của bò để tăng cường mức độ ổn định ARN sau phiên mã. Theo phương án được lấy làm ví dụ theo sáng chế, vật truyền biểu hiện là pAD15, là vật truyền được cải biến RCMV.

Vẫn theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ chứa vật truyền biểu hiện.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “tế bào chủ” được dùng để chỉ tế bào chưa có nhân điển hình hoặc tế bào có nhân điển hình mà vật truyền biểu hiện tái tổ hợp có thể được đưa vào. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “biến nạp” hoặc “chuyển nhiễm” được dùng để chỉ việc đưa axit nucleic (ví dụ, vật truyền) vào tế bào bằng cách kỹ thuật khác

nhau đã biết trong lĩnh vực này.

Tế bào chủ thích hợp có thể được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm với trình tự ADN theo sáng chế và có thể được sử dụng để biểu hiện và/hoặc tiết protein đích. Ví dụ về tế bào chủ thích hợp có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm tế bào lai bất tử, tế bào u tủy NS/0, tế bào 293, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), tế bào HeLa, tế bào CAP (tế bào có nguồn gốc từ dịch đầu ối của người), và tế bào COS.

Dưới đây, các phương án làm ví dụ theo sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bằng cách viện dẫn tới các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này theo sáng chế có thể được cải biến ở nhiều dạng khác nhau và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ điều chế 1. Tạo ra và tinh chế protein dung hợp chứa protein đột biến FGF21

Ví dụ điều chế 1-1. Tạo ra vật truyền biểu hiện để biểu hiện các protein đột biến FGF21

Để cải thiện độ ổn định, hoạt tính và được động học của FGF21 trong cấu trúc Fc-FGF21, các nghiên cứu về quá trình tạo đột biến FGF21 được thực hiện.

Đặc biệt, các protein đột biến được thiết kế đối với vùng LLLE (axit amin ở các vị trí từ 98 đến 101 từ đầu tận cùng N của protein FGF21) và vùng GPSQG (axit amin ở các vị trí từ 170 đến 174 từ đầu tận cùng N của protein FGF21), và vị trí A180, mà mong muốn thu được hoạt tính protein một cách đáng kể trên cơ sở phân tích cấu trúc 3 chiều của các protein FGF21.

Thông tin về vị trí, trình tự, tác dụng đích và mong muốn của mỗi đột biến được đưa vào protein FGF21 được thể hiện trong bảng 1 dưới đây (trong bảng 1, N được dùng để chỉ asparagin được glycosyl hóa (N)). Ngoài ra, các protein đột biến FGF21 bao gồm các đột biến được mô tả trong Bảng 1 được đưa ra trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 1

Trình tự	Vị trí	Trình tự ban đầu	Trình tự được tạo đột biến	Đích	Tác dụng mong muốn
EIRP	98-101	LLLE	EIRP	Thế bằng trình tự FGF19	Cải thiện được độ ổn định và được động học
TGLEAV	170-174	GPSQG	TGLEAV	Thế bằng trình tự FGF19	Cải thiện được được động học
TGLEAN	170-174	GPSQG	TGLEAN	Thế bằng trình tự FGF19, và bổ sung N-glycosyl hoá	Cải thiện được được động học
G170N	170	G	<u>N</u>	Đột biến điểm, và bổ sung N-glycosyl hoá	Cải thiện được được động học
G174N	174	G	<u>N</u>	Đột biến điểm, và bổ sung N-glycosyl hoá	Cải thiện được được động học
A180E	180	A	E	Đột biến điểm	Cải thiện được được động học

Bảng 2

SEQ ID NO	Trình tự của protein đột biến FGF21
6	FGF21 (EIRP)
7	FGF21 (TGLEAV)
8	FGF21 (TGLEAN)
9	FGF21 (G170N)
10	FGF21 (G174N)
11	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
12	FGF21 (EIRP, TGLEAN)
13	FGF21 (EIRP, G170N)
14	FGF21 (EIRP, G174N)
15	FGF21 (EIRP, A180E)
16	FGF21 (TGLEAV, A180E)
17	FGF21 (TGLEAN, A180E)
18	FGF21 (G170N, A180E)
19	FGF21 (G174N, A180E)
20	FGF21 (EIRP, TGLEAV, A180E)
21	FGF21 (EIRP, TGLEAN, A180E)
22	FGF21 (EIRP, G170N, A180E)
23	FGF21 (EIRP, G174N, A180E)

Vật truyền biểu hiện được tạo ra để biểu hiện axit amin của ba hợp phần: chất mang dung hợp, liên kết và đột biến FGF21 theo thứ tự từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C. Mã nguyên liệu của mỗi protein dung hợp đột biến FGF21, trình tự của đột biến được đưa vào FGF21, trình tự của chất mang dung hợp và liên kết trình tự được thể hiện trong bảng 3 dưới đây (trong bảng 3, N được dùng để chỉ asparagin được glycosyl hóa (N)).

Bảng 3

SEQ ID NO	Mã nguyên liệu	Trình tự của đột biến FGF21	Chất mang dung hợp	Liên kết trình tự
27	DFD1	EIRP, TGLEAV	hyFc (SEQ ID NO: 26)	C (SEQ ID NO: 2)
28	DFD3	TGLEAV	hyFc (SEQ ID NO: 26)	AKA (SEQ ID NO: 3)
29	DFD4	TGLEAV	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
30	DFD5	TGLEAV	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
31	DFD6	G170N	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
32	DFD6 (<i>E. coli</i>)	G170N	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
33	DFD7	G174N	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
34	DFD9	không	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
35	DFD13	EIRP, TGLEAV	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
36	DFD18	EIRP, TGLEAV, A180E	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
37	DFD72	EIRP, TGLEAV, A180E	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
38	DFD73	EIRP, G170N	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
39	DFD74	EIRP, G170N, A180E	hyFc (SEQ ID NO: 26)	GS3 (SEQ ID NO: 4)
40	RGE (Amgen)	L98R, P171G, A180E	Đột biến IgG1Fc	GS3 (SEQ ID NO: 4)
41	Fc-FGF21 (Lilly)	X	Đột biến IgG4Fc (SEQ ID NO: 25)	GS3A (SEQ ID NO: 5)

Để tạo ra các protein dung hợp đột biến FGF21, các trình tự nucleotit mã hóa mỗi protein trong số các protein đột biến FGF21 được tổng hợp bằng cách tiến hành với Bioneer Corporation (Korea) trên cơ sở trình tự axit amin của mỗi protein. Trình tự enzym giới hạn *NheI* và *NotI* được bổ sung vào đầu 5' và đầu 3' của các trình tự nucleotit mã hóa mỗi protein trong số các protein đột biến FGF21 và codon khởi đầu để dịch mã protein và trình tự dẫn đầu (MDAMLRGLCCVLLLCGAVFVSPSHA) có khả năng tiết protein đã được biểu hiện để vùng nằm ngoài tế bào đã được xen tiếp tới trình tự enzym giới hạn ở đầu 5'. Codon kết thúc được xen tiếp tới trình tự nucleotit, mã hóa mỗi protein trong số các protein dung hợp đột biến FGF21. Trình tự nucleotit mã hóa mỗi protein trong số các protein dung hợp đột biến FGF21 được thành dòng vào vật truyền biểu hiện không có pTrans bằng cách sử dụng hai enzym giới hạn của *NheI* và *NotI*. Vật truyền biểu hiện không có pTrans, mà có cấu trúc đơn giản bao gồm gen khởi đầu CMV, điểm sao chép có nguồn gốc từ pUC, điểm sao chép có nguồn gốc từ SV40 và gen kháng ampicilin, được mua từ CEVEC Pharmaceuticals (Germany).

Trong trường hợp của các protein dung hợp DFD6 (*E. coli*) và RGE (Amgen), trình tự nucleotit mã hóa mỗi protein dung hợp được xen vào vật truyền biểu hiện pET30 để biểu hiện ở *E. coli*.

Ví dụ điều chế 1-2. Cấu trúc của ADN plasmit để biểu hiện các protein dung hợp đột biến FGF21

E. coli được biến nạp với mỗi vật truyền trong số các vật truyền biểu hiện đã được tạo ra trong ví dụ điều chế 1-1 để thu được lượng lớn ADN plasmit cần dùng để biểu hiện. Các tế bào của *E. coli*, mà thành của các tế bào này đã được làm suy yếu, được biến nạp với mỗi vật truyền biểu hiện bằng cách gây sốc nhiệt, và các thể biến nạp được dính lên các đĩa LB để thu được các khuẩn lạc. Các khuẩn lạc thu được như vậy được cấy truyền vào môi trường LB, được nuôi cấy ở 37°C trong 16 giờ, và mỗi môi trường nuôi cấy *E. coli* chứa mỗi vật truyền biểu hiện thu được trong thể tích 100mL. *E. coli* thu được như vậy được ly tâm để loại bỏ môi trường nuôi cấy, và sau đó các dung dịch P1, P2, P3 (QIAGEN, Cat No.:12963) được bổ sung để phá vỡ thành tế bào, nhờ đó thu được huyền phù ADN trong đó các protein và ADN được tách ra. ADN plasmit được tinh chế từ huyền phù ADN thu được như vậy bằng cách sử dụng Cột tinh chế ADN Qiagen. ADN plasmit đã được rửa giải được nhận diện bằng cách điện di gel agarosa, và các nồng độ và độ tinh khiết được xác định bằng cách sử dụng thiết bị giọt nano (Thermo scientific, Nanodrop Lite). ADN thu được như vậy được sử dụng để biểu hiện.

Ví dụ điều chế 1-3. Biểu hiện protein dung hợp trong các tế bào CAP-T

Dòng tế bào của người được chuyển nhiễm với mỗi loại ADN plasmit thu được trong ví dụ điều chế 1-2. Mỗi loại ADN plasmit được chuyển hóa trong các tế bào CAP-T (CEVEC), mà đã được nuôi cấy trong môi trường PEM (Life technologies), bằng cách sử dụng dung dịch PEI (Polyplus, Cat. No.:101-10N). Dung dịch ADN đã được trộn và dung dịch PEI được trộn với huyền phù tế bào bằng cách sử dụng môi

trường biểu hiện Freestyle293 (Invitrogen), được nuôi cấy ở 37°C trong 5 giờ, và môi trường PEM được bổ sung vào. Sau khi nuôi cấy ở 37°C trong 5-7 ngày, môi trường nuôi cấy được ly tâm để loại bỏ các tế bào và dịch nổi trên bề mặt bao gồm các protein dung hợp đột biến FGF21 thu được.

Ví dụ điều chế 1-4. Biểu hiện và tinh chế protein dung hợp đột biến FGF21 trong *E. coli*

Chủng BL21 của *E. coli* (DE3) được biến nạp với mỗi ADN plasmit biểu hiện các protein dung hợp DFD6 (*E. coli*) và RGE (Amgen). *E. coli* đã được biến nạp biểu hiện mỗi protein dung hợp được cấy truyền vào 20mL môi trường LB, được nuôi cấy ở 37°C trong 15 giờ và lắc đồng thời, và sau đó một phần môi trường nuôi cấy được cấy truyền vào 100mL môi trường LB, và được nuôi cấy ở 37°C trong 16 giờ và lắc đồng thời. Khi hoàn thành việc nuôi cấy, môi trường nuôi cấy được ly tâm để thu được các viên *E. coli*, và sau đó các tế bào này được phá vỡ bằng cách sử dụng thiết bị phá vỡ tế bào áp suất cao để thu được các thể vùi.

Các thể vùi thu được được tinh chế bằng cách rửa và rửa giải, tiếp đó là quy trình gấp nếp lại protein. Đặc biệt, các thể vùi thu được được rửa 2-3 lần với dung dịch đệm (độ pH = 8,0) chứa 0,5% Triton X-100, 50 mM Tris, 1 mM EDTA và 0,1 M NaCl để loại bỏ protein của vi khuẩn, và sau đó được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm ure 8M chứa 8 M urea, 50 mM Tris và 1 mM DTT. Vì các protein trong dung dịch đệm ure 8M được làm biến tính hoàn toàn, quy trình gấp nếp lại protein được thực hiện là như sau.

Để bắt đầu, dung dịch đệm ure 8M được pha loãng từ từ bằng dung dịch đệm glyxin 20mM (độ pH = 9,0) để loại bỏ ure, và từ nồng độ 2 M, CuSO₄ được bổ sung vào nồng độ 80 µM để tạo ra quá trình gấp nếp protein ổn định. Protein kết thúc quy trình gấp nếp lại được tạo huyền phù trong dung dịch đệm PBS (độ pH = 7,4), và huyền phù được lọc bằng thiết bị lọc 0,22 µm để loại bỏ các tạp chất, và sau đó được nạp vào cột sắc ký ái

lực của protein A. Cột này được rửa bằng 1X dung dịch đệm PBS (độ pH = 7,4) và sau đó các protein này được rửa giải bằng cách sử dụng 100 mM dung dịch đệm glyxin (độ pH = 3,0) để điều chế protein dung hợp DFD6 (*E. coli*).

Trong trường hợp protein dung hợp RGE (Amgen), protein kết thúc quy trình gấp nếp lại được tạo huyền phù trong 50 mM dung dịch đệm Tris (độ pH 8,0), huyền phù được lọc bằng thiết bị lọc 0,22 μ m để loại bỏ các tạp chất, và sau đó được nạp vào cột nhựa trao đổi ion (POROS® HQ 50 μ m, Thermo Fisher Scientific). Cột này được rửa bằng 50 mM dung dịch đệm Tris (độ pH 8,0), và sau đó 50 mM dung dịch đệm Tris (độ pH = 8,0) được dùng theo gradient nồng độ để rửa giải Protein dung hợp RGE (Amgen). Protein dung hợp RGE (Amgen) thu được bằng cách trao đổi anion được trộn với amoni sulfat tới nồng độ 1 M, và sau đó được tinh chế bằng cách sử dụng cột sắc ký tương tác kỵ nước (phenyl sepharosa FF, GE Healthcare). Đặc biệt, cột này được rửa bằng 50 mM dung dịch đệm Tris (độ pH = 8,0) chứa 1 M amoni sulfat, 50 mM dung dịch đệm Tris (độ pH = 8,0) được dùng theo gradient nồng độ, và các phân giải đã được phân giải được phân tích bằng cách điện di gel Tris-glyxin 10%. Gel này được nhuộm màu xanh commassie R và lắc nhẹ, và các phân đoạn chứa protein dung hợp đột biến FGF21 có độ tinh khiết cao được thu gom và sau đó được thẩm tách qua đệm ở 4°C bằng cách sử dụng dung dịch đệm cuối (1X PBS, 1 mM EDTA, độ pH = 7,4). Khi kết thúc thẩm tách, dung dịch protein dự trữ thu được được cô ở 3.000 vòng/phút bằng cách sử dụng thiết bị lọc ly tâm ngưỡng 30.000 MW ở 4°C. Nồng độ của protein dung hợp đột biến FGF21 được xác định bằng cách phân tích định lượng BCA.

Ví dụ điều chế 1-5. Tinh chế protein dung hợp đột biến FGF21

Cột sắc ký ái lực protein A (GE Healthcare) được trang bị 1X dung dịch đệm PBS (độ pH = 7,4). Dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy bao gồm mỗi protein dung hợp đột biến FGF21 thu được trong ví dụ điều chế 1-3 được lọc bằng thiết bị lọc 0,2 μ m, và sau đó được nạp vào cột sắc ký ái lực của protein A. Cột này được rửa bằng 1X dung dịch đệm PBS (độ pH = 7,4) và sau đó các protein được rửa giải bằng cách sử

dung 100 mM dung dịch đệm glyxin (độ pH = 3,0). Các protein dung hợp thu được bằng cách ái lực sắc ký được tinh chế bằng cách sử dụng cột nhựa trao đổi ion (POROS® HQ 50 μ m, Thermo Fisher Scientific). Cột nhựa trao đổi ion này được trang bị 50 mM dung dịch đệm Tris (độ pH 8,0), trước khi các protein dung hợp đột biến FGF21 được rửa giải từ cột này. Đặc biệt, sau khi rửa cột này bằng 50 mM dung dịch đệm Tris (độ pH = 8,0), 50 mM dung dịch đệm Tris (độ pH 8,0) được phân tán theo gradien nồng độ và các phân giải đã được phân giải được phân tích. Mỗi phân đoạn đã được rửa giải được phân tích bằng cách sử dụng sắc ký loại trừ kích thước (SEC-HPLC), và các phân đoạn bao gồm các protein dung hợp đột biến FGF21 có độ tinh khiết cao được thu gom. Việc phân tích nồng độ và định lượng được thực hiện theo các phương pháp được mô tả trong ví dụ điều chế 1-4.

Ví dụ thử nghiệm 1. Hoạt tính *in vitro* của protein dung hợp

Ví dụ thử nghiệm 1-1. Tác dụng của các đột biến FGF21 đối với hoạt tính protein

Hoạt tính *in vitro* của các protein dung hợp DFD4, DFD5, DFD6, DFD6 (*E. coli*), DFD7, DFD9, DFD13, DFD18, DFD72, DFD73 và DFD74 được tạo ra trong ví dụ điều chế 1 được xác định.

Đặc biệt, hoạt tính FGF21 *in vitro* của các protein dung hợp được đánh giá bằng cách sử dụng dòng tế bào HEK293 (Yuhan Corporation, Korea) mà được cải biến để biểu hiện quá mức β -klotho của người, đồng thụ thể của FGF21. Để đánh giá hoạt tính, các phân cô chứa các protein dung hợp được điều chế trong ví dụ điều chế 1-4 và 1-5 được tiến hành pha loãng theo dãy gấp 3 lần ở nồng độ 3 μ M. Sau khi được nuôi cấy trong tình trạng thiếu huyết thanh trong 5 giờ, dòng tế bào biểu hiện quá mức β -klotho của người được xử lý bằng các protein dung hợp đã được pha loãng trong 20 phút, và sau đó được phân giải bằng cách bổ sung dung dịch đệm phân giải tế bào (Cisbio/Cat# 64ERKPEG) và khuấy đồng thời ở 60 vòng/phút trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch phân giải tế bào được trộn với các kháng thể (Cisbio/Cat# 64ERKPEG), mà

có thể phát hiện được kinaza điều hòa tín hiệu ngoại bào (ERK) và ERK được phosphoryl hoá, và hỗn hợp này được duy trì ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Quá trình phát huỳnh quang được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị phát hiện dòng flo (TECAN/GENiosPro). Hoạt tính của các protein dung hợp được xác định bằng cách so sánh các trị số EC_{50} của chúng.

Như được thể hiện trong các FIG.1A đến 1C, đã xác nhận rằng hoạt tính *in vitro* của các protein dung hợp được tạo ra bằng cách đưa trình tự đột biến vào protein FGF21 tự nhiên không được ức chế, và hoạt tính của mỗi protein dung hợp là tương tự nhau. Cũng đã xác nhận rằng thông qua mẫu DFD6 (*E. coli*) đã được biểu hiện trong *E. coli* và mẫu DFD6 được biểu hiện trong tế bào động vật, hoạt tính *in vitro* của các protein dung hợp được tạo ra bằng cách đưa đột biến được glycosyl hoá N vào protein FGF21 tự nhiên không được ức chế.

Ví dụ thử nghiệm 1-2. Ảnh hưởng của trình tự liên kết đối với hoạt tính protein

Hoạt tính *in vitro* của các protein dung hợp DFD1, DFD3, DFD4 và DFD13 được tạo ra trong ví dụ điều chế 1 được xác định.

Đặc biệt, hoạt tính FGF21 của các protein dung hợp được xác định bằng cách sử dụng các phần cô chứa các protein dung hợp được tạo ra trong các ví dụ điều chế 1-5 theo các phương pháp được mô tả trong Ví dụ thử nghiệm 1-1. Các kết quả được thể hiện trên các Fig.2A và 2B.

Đã xác nhận rằng protein dung hợp đột biến FGF21 không làm giảm đáng kể hoạt tính, mặc dù sự khác biệt không đáng kể được thể hiện trong hoạt tính tùy thuộc vào trình tự liên kết, như được thể hiện trong các Fig.2A và 2B.

Ví dụ thử nghiệm 1-3. Kết quả thử nghiệm đối với DFD1, RGE (Amgen) và Fc-FGF21 (Lilly)

Hoạt tính *in vitro* của protein dung hợp DFD1 đã được tạo ra trong các ví dụ điều chế 1 và protein đối chứng RGE (Amgen) và Fc-FGF21 (Lilly) được xác định.

Đặc biệt, hoạt tính FGF21 của các protein dung hợp được xác định bằng cách sử dụng các phần cô chứa các protein dung hợp được tạo ra trong các ví dụ điều chế 1-5 và protein đối chứng theo các phương pháp được mô tả trong Ví dụ thử nghiệm 1-1. Các kết quả được thể hiện trên Fig.3.

Đã xác nhận rằng DFD1 và RGE (Amgen) có hoạt tính *in vitro* tương tự nhau, đồng thời Fc-FGF21 (Lilly) có hoạt tính *in vitro* cao hơn gấp hai lần so với các protein khác, như được thể hiện trên Fig.3.

Ví dụ thử nghiệm 2. Đánh giá độ ổn định của các protein dung hợp

Ví dụ thử nghiệm 2-1. Phương pháp thử nghiệm để đánh giá độ ổn định

Để xác định lượng kết tụ protein ở trạng thái ban đầu của mẫu điều chế, các kết tụ có phân tử lượng cao (%HMW) được xác định bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký ngoại trừ kích thước (SEC-HPLC). Các kết quả được thể hiện trên Fig.4.

Đặc biệt, cột TosoHaas mô hình TSK-GEL G3000SW_{XL} được sử dụng cho phương pháp SEC-HPLC. Cột này được tạo cân nặng bằng cách cho chảy dung dịch đệm (1X PBS, 1 mM EDTA, độ pH = 7,4) ở tốc độ chảy 1mL/phút. Dung dịch dự trữ protein DFD4 và DFD13 được tạo ra trong các ví dụ điều chế 1-5 được cô tới nồng độ đích 20 mg/mL hoặc nồng độ cao hơn ở 3.000 vòng/phút bằng cách sử dụng thiết bị lọc ly tâm ngưỡng 30.000 MW ở 4°C. Sau khi xác định nồng độ của mỗi mẫu bằng cách phân tích định lượng BCA, các mẫu được pha loãng bằng dung dịch đệm (1X PBS, 1 mM EDTA, độ pH = 7,4) tới nồng độ cuối 20 mg/mL. Để xác định %HMW ban đầu của DFD4 và DFD13, 20 mg/mL các mẫu được pha loãng bằng dung dịch đệm (1X PBS, 1 mM EDTA, độ pH = 7,4) tới nồng độ cuối 1 mg/mL, và mỗi mẫu trong thể tích 100 µL được phân tích bằng cột SEC-HPLC.

Để đánh giá độ ổn định của mỗi mẫu, %HMW của các mẫu được xác định bằng cách sử dụng phương pháp SEC-HPLC vào ngày thứ 4, 8 và 14 đồng thời bảo quản chúng ở 5°C, 25°C và 37°C trong hai tuần.

Như được thể hiện trên Fig. 4, đã xác nhận rằng DFD13 có lượng kết tụ có phân tử lượng cao (HMW %) ở trạng thái ban đầu nhỏ hơn và tới thời điểm 2 tuần so với DFD4, chứng tỏ rằng việc đưa đột biến EIRP vào cải thiện được độ ổn định của protein dung hợp đột biến FGF21, nhờ đó làm giảm % HMW một cách đáng kể.

Ví dụ thử nghiệm 2-2. Kết quả về độ ổn định

Để nghiên cứu ảnh hưởng của đột biến EIRP được đưa vào trình tự ban đầu LLLE (98-101) của FGF21 đối với độ ổn định, độ ổn định của DFD4 (SEQ ID NO: 29) và DFD13 (SEQ ID NO: 35) được xác định theo các phương pháp được mô tả trong Ví dụ thử nghiệm 2-1. Các kết quả phân tích đối với mẫu ở 0 giờ (giai đoạn ban đầu; Ngày 0) và các mẫu được bảo quản vào ngày 4, 8, và 14 của DFD4 và DFD13 được tóm tắt trong bảng 4 dưới đây (trong bảng 4, N.D. có nghĩa là “không được phát hiện”).

Bảng 4

Độ ổn định của DFD4 và DFD13 trong 2 tuần ở nồng độ 20 mg/mL (%HMW)

Ngày	DFD4			DFD13		
	5°C	25°C	37°C	5°C	25°C	37°C
0	0,91			0,56		
4	4,25	11,64	5,12	0,36	0,34	0,84
8	6,16	9,99	4,87	N.D.	N.D.	N.D.
14	8,15	8,83	4,71	N.D.	N.D.	0,32

Như được thể hiện trong Bảng 4, lượng %HMW ở trạng thái ban đầu (Ngày 0) là 0,91% đối với DFD4, và 0,56% đối với DFD13. Sau 2 tuần, lượng %HMW được tăng lên 8,83% đối với DFD4, nhưng không được quan sát ở DFD13, trong điều kiện bảo quản ở 25°C. DFD13 có tốc độ %HMW nhỏ hơn ở trạng thái ban đầu và 2 tuần so với DFD4, chứng tỏ rằng mức độ %HMW của protein dung hợp đột biến FGF21 giảm xuống một cách đáng kể do việc đưa đột biến EIRP vào.

Ví dụ thử nghiệm 3. Đánh giá dược động học của các protein dung hợp

Ví dụ thử nghiệm 3-1. Phương pháp thử nghiệm để đánh giá dược động học

Chuột nhắt ICR được sáu tuần tuổi được mua từ Orient BIO (Korea) được phân bố vào các nhóm ($n = 3$ /thời điểm lấy mẫu máu) để có các trị số trung bình tương tự về cân nặng một ngày trước khi điều trị bằng thuốc, và được dùng dưới da một lần bằng mẫu tương ứng ở nồng độ 1 mg/kg (2 mg/kg đối với RGE). Sau đó, các mẫu máu được thu gom lần lượt ở 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, và 96 giờ sau khi tiêm. Nồng độ của protein FGF21 nguyên vẹn có chiều dài đầy đủ trong máu được xác định bằng cách sử dụng kit ELISA FGF21 nguyên vẹn của người (F1231-K01, Eagle Biosciences, USA), mà có hoạt tính miễn dịch tới đầu tận cùng N và đầu tận cùng C của protein FGF21. Nồng độ của các mẫu trong máu được thu gom cho tới 96 giờ sau khi tiêm mỗi protein dung hợp vào dưới da chuột nhắt được xác định, và các thông số dược động học của mỗi mẫu được tính toán.

Ví dụ thử nghiệm 3-2. Đánh giá hoạt tính dược động học

Dựa vào đồ thị thể hiện nồng độ của mỗi protein trong máu theo thời gian sau khi dùng dưới da các protein dung hợp trong chuột nhắt (Fig.5), các thông số dược động học được tính toán. Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Các thông số	DFD4	DFD5	DFD6	DFD7	DFD9	DFD13	DFD18	DFD72	DFD73	DFD74	DFD6 (<i>E.coli</i>)	RGE*
T _{max} (giờ)	12	12	12	4	4	12	12	8	8	8	8	12
C _{max} (ng/mL)	1288	1732	2868	696	384	1070	3428	2962	3296	3996	1399	9921
AUC _{last} (ng·hr/mL)	25856	40706	100107	14118	4656	28785	104230	115977	123511	206634	37269	325747
Thời gian bán tồn (giờ)	5,5	8,0	14,9	19,7	17,4	7,1	11,0	14,4	16,6	26,0	9,1	12,9

Profin dược động học của mỗi protein dung hợp được so sánh và được đánh giá dựa vào trị số diện tích dưới đường cong (the area under the curve AUC) nhằm chỉ ra mức độ tiếp xúc với thuốc.

Như được thể hiện trong Bảng 5, khi so sánh DFD4 với DFD13, và DFD6 với DFD73, đã xác định được rằng việc đưa trình tự EIRP vào làm tăng khoảng từ 10 đến

20% làm tăng trị số AUC. So sánh DFD9 với DFD4, việc đưa TGLEAV vào làm tăng khoảng 6 lần trị số AUC.

Hơn thế nữa, các đột biến TGLEAN, G170N và G174N được thiết kế để kéo dài thời gian bán tồn bằng cách đưa N-glycosyl hoá vào đầu tận cùng C của FGF21, mà được gọi là phân giải protein *in vivo*. Việc tăng AUC do việc đưa N-glycosyl hoá vào được xác nhận bằng so sánh các đột biến với mỗi nguyên liệu so sánh. Để xác nhận tác dụng cải thiện AUC do việc đưa N-glycosyl hoá vào, trị số AUC đối với DFD6 (*E. coli*) được sản sinh bởi *E. coli* mà không được glycosyl hoá được so sánh với trị số trong DFD6 đã được sản sinh bởi dòng tế bào của người. DFD6 được sản sinh bởi dòng tế bào của người làm tăng trị số AUC 3 lần hoặc cao hơn so với DFD6 (*E. coli*) đã được sản sinh bởi *E. coli*, mà đã chứng minh được sự cải thiện protein được động học do glycosyl hoá.

A180E là đột biến được bộc lộ trong WO 2009/149171 được sở hữu bởi Amgen Inc. Khi đột biến A180E được đưa tiếp vào lần lượt các đột biến DFD13 hoặc DFD73 bao gồm đột biến TGLEAV hoặc G170N, đột biến thu được lần lượt là DFD18 hoặc DFD74 làm tăng tiếp khoảng từ 2 đến 3 lần trị số AUC.

Tóm lại, đã xác nhận được rằng các thông số dược động học được cải thiện bằng cách đưa các đột biến khác nhau và dạng kết hợp của chúng, so với DFD9, protein FGF21 tự nhiên dung hợp. Protein dung hợp có tác dụng cải thiện trị số AUC tốt nhất là DFD74 chứa các đột biến EIRP, G170N và A180E, có khả năng cải thiện trị số AUC khoảng 45 lần so với DFD9. Hơn thế nữa, khi xem xét RGE (Amgen) với liều 2 mg/kg cân nặng, DFD74 có thể có khả năng tiếp xúc với thuốc cao hơn so với RGE. Tác dụng cải thiện toàn phần về dược động học do các đột biến gây ra được tóm tắt trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6

Trình tự đột biến	Vị trí về đột biến	Nguyên liệu so sánh với nguyên liệu cải thiện	Đánh giá các thông số dược động học
EIRP	98-101	DFD4 so với DFD13	Cải thiện về AUC
		DFD6 so với DFD73	
TGLEAV	170-174	DFD9 so với DFD4	Cải thiện về AUC
TGLEAN	170-174	DFD9 so với DFD5	Cải thiện về AUC

G170N	170	DFD9 so với DFD6	Cải thiện về AUC
		DFD6 (<i>E. coli</i>) so với FD6	Cải thiện về AUC
G174N	174	DFD9 so với DFD7	Cải thiện về AUC
A180E	180	DFD13 so với DFD18	Cải thiện về AUC
		DFD73 so với DFD74	Cải thiện về AUC

Ví dụ thử nghiệm 4. Đánh giá hoạt tính của các protein dung hợp ở chuột nhất *ob/ob*

Ví dụ thử nghiệm 4-1. Phương pháp thử nghiệm để đánh giá hoạt tính ở chuột nhất *ob/ob*

Chuột nhất *ob/ob*, được đặc trưng bởi chứng tăng glucoza huyết, kháng insulin, chứng ăn nhiều, bệnh gan nhiễm mỡ và bệnh béo phì do sự thiếu hụt leptin do di truyền, được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu về bệnh đái tháo đường typ 2. Chuột nhất *ob/ob* (Harlan, USA) được mua từ Raonbio (Korea). Các con chuột nhất này có độ tuổi từ 5 đến 6 tuần ở thời điểm dùng thuốc cách nhau một khoảng thời gian, và từ 8 đến 9 tuần tuổi ở thời điểm dùng thuốc điều trị sau 3 tuần cho thích nghi. Các con chuột nhất được phân bố vào các nhóm ($n=8/\text{nhóm}$) để có các trị số trung bình tương tự về cân nặng và nồng độ glucoza trong máu đuôi một ngày trước khi điều trị bằng thuốc (Ngày 0), và các mẫu được dùng dưới da một lần theo mỗi liều của liều tương ứng của chúng. Dung dịch muối đệm phosphat Dulbecco (DPBS, Gibco, USA) được dùng làm chất dẫn thuốc điều trị, và nồng độ glucoza trong máu được xác định bằng cách sử dụng máy đo nồng độ glucoza, GlucoDr (All Medicus, Korea). Nồng độ glucoza không nhiễm mỡ và cân nặng được xác định mỗi ngày cho tới ngày thứ 14 sau khi dùng. Nồng độ hemoglobin được glycat hóa cũng được xác định trong mỗi nhóm trước khi dùng và sau thử nghiệm. Nồng độ hemoglobin được glycat hóa được tính toán bằng cách sử dụng kit DCA 2000 HbA1c (Siemens, 5035C).

Ví dụ thử nghiệm 4-2. Đánh giá hoạt tính ở chuột nhất *ob/ob*

Sự thay đổi về nồng độ glucoza không nhiễm mỡ trong máu và cân nặng ở chuột

nhất *ob/ob* được quan sát sau khi tiêm dưới da riêng rẽ 30 hoặc 100 nmol/kg DFD18 và DFD72, hoặc 10, 30 hoặc 100 nmol/kg DFD74.

Đã xác nhận rằng tất cả DFD18, DFD72 và DFD74 đều có tác dụng làm giảm nồng độ glucoza trong máu theo cách phụ thuộc liều. So sánh ba chất này ở liều cao 100 nmol/kg, DFD72 và DFD74 có tác dụng làm giảm nồng độ glucoza trong máu hơn so với DFD18 (Fig. 6). Ngoài ra, Fc-FGF21 (Lilly) được sử dụng làm nguyên liệu so sánh trong thử nghiệm, có tác dụng làm giảm nồng độ glucoza trong máu nhỏ hơn so với DFD18, DFD72 và DFD74 ở nồng độ liều tương tự (30 nmol/kg).

Đối với tác dụng làm giảm cân nặng, so sánh ba chất ở liều cao 100 nmol/kg, DFD72 có tác dụng làm giảm cân nặng chuột nhắt *ob/ob* tốt nhất là khoảng 6%, và DFD18 có tác dụng làm giảm kém hơn, tiếp đó là DFD74 (Fig. 7).

Sau kết thúc thử nghiệm, nồng độ hemoglobin được glycat hóa chỉ ra trị số trung bình của nồng độ glucoza trong máu được xác định và sự thay đổi về nồng độ glucoza trong máu trung bình được phân tích trong mỗi nhóm thử nghiệm. Tất cả các nhóm đã được điều trị ngoại trừ nhóm đối chứng đã được điều trị bằng protein đối chứng Fc-FGF21 (Lilly) có các trị số âm về sự khác nhau giữa trước khi dùng và sau khi thử nghiệm, mà đã xác nhận được rằng các protein thử nghiệm có tác dụng làm giảm nồng độ glucoza hơn so với nguyên liệu so sánh (Fig. 8).

Ví dụ thử nghiệm 5. Đánh giá hoạt tính của các protein dung hợp ở chuột nhắt HFD/STZ

Ví dụ thử nghiệm 5-1. Phương pháp thử nghiệm để đánh giá hoạt tính trong chuột nhắt HFD/STZ

Tác dụng làm giảm nồng độ glucoza và cân nặng của các protein dung hợp đột biến FGF21 được so sánh và được đánh giá ở mô hình bệnh đái tháo đường khác, mô hình chuột nhắt HFD/STZ. Mô hình chuột nhắt bị béo phì do ăn uống thông thường (do cho chuột nhắt C57BL/6 tám tuần tuổi hoặc hơn ăn chế độ ăn giàu chất béo có hàm

lượng 60 kcal%) có dấu hiệu tăng glucoza huyết và bệnh đái tháo đường yếu, mặc dù chúng có tính kháng insulin. Chuột nhắt HFD/STZ, có thể bù trừ các thiếu hụt ở mô hình chuột nhắt bị béo phì do ăn uống thông thường, có khả năng sản sinh các tế bào β loạn chức năng ở tụy và giảm tiết insulin do chế độ ăn giàu chất béo (HFD) và dùng streptozotocin với nồng độ thấp (STZ), và do đó là thích hợp cho các nghiên cứu được lý về bệnh đái tháo đường typ 2.

Đặc biệt, để tạo ra mô hình chuột nhắt HFD/STZ, chuột nhắt C57BL/6 (SLC Nhật Bản) được cho ăn chế độ ăn giàu chất béo 60 kcal% trong bốn tuần, và sau đó 50 mg/kg STZ (Sigma, 85882) được dùng trong màng bụng mỗi ngày trong 3 ngày để làm loạn chức năng ở các tế bào β của tụy. Sau khi cho ăn chế độ ăn giàu chất béo trong bổ sung 2 tuần nữa, các con chuột nhắt có nồng độ glucoza không nhiễm mỡ trong máu là 200 mg/dL hoặc cao hơn được sử dụng để thử nghiệm. Các con chuột nhắt được phân bố vào các nhóm ($n=6$ /nhóm) để có các trị số trung bình tương tự về cân nặng và nồng độ glucoza trong máu đuôi một ngày trước khi điều trị bằng thuốc (Ngày 0), và các mẫu được dùng dưới da một lần theo mỗi liều trong số các liều tương ứng của chúng. Dung dịch muối đệm phosphat Dulbecco (DPBS, Gibco, USA) được dùng làm dẫn thuốc điều trị, và nồng độ glucoza trong máu được xác định bằng cách sử dụng máy đo nồng độ glucoza, GlucoDr (All Medicus, Korea). Nồng độ glucoza không nhiễm mỡ và cân nặng được xác định mỗi ngày cho tới ngày thứ 14 sau khi dùng. Nồng độ hemoglobin được glycat hóa cũng được xác định trong mỗi nhóm trước khi dùng và sau khi thử nghiệm. Nồng độ hemoglobin được glycat hóa được tính toán bằng cách sử dụng kit DCA 2000 HbA1c (Siemens, 5035C).

Ví dụ thử nghiệm 5-2. Đánh giá hoạt tính ở chuột nhắt HFD/STZ

Sự thay đổi về nồng độ glucoza không nhiễm mỡ trong máu và cân nặng theo thời gian ở chuột nhắt HFD/STZ được quan sát sau khi tiêm dưới da riêng rẽ 10 nmol/kg DFD72 hoặc DFD74.

Liên quan tới sự thay đổi về nồng độ glucoza không nhiễm mỡ trong máu, đã xác

nhận rằng DFD72 và DFD74 có tác dụng tương tự trong việc làm giảm nồng độ glucoza trong máu, và tác dụng làm giảm nồng độ glucoza trong máu được duy trì cho tới ngày thứ 10 sau khi dùng và sau đó sẽ không chuyển hóa được thuốc sau ngày thứ 10 (Fig. 9). DFD72 có tác dụng kéo dài hơn so với DFD74 trong việc thay đổi nồng độ glucoza không nhiễm mỡ trong máu sau ngày thứ 10 sau khi dùng.

Đối với tác dụng làm giảm cân nặng do dùng các protein đột biến FGF21, đã xác nhận rằng cả DFD72 và DFD74 đều có tác dụng làm giảm cân nặng tương tự khoảng 5%, và tác dụng này sẽ không còn sau ngày thứ 10 sau khi dùng (Fig. 10).

Sau kết thúc thử nghiệm, nồng độ hemoglobin được glycat hóa là chỉ dấu của trị số trung bình của nồng độ glucoza trong máu được xác định và sự thay đổi về nồng độ glucoza trong máu trung bình được phân tích trong mỗi nhóm thử nghiệm. Trong khi đó nhóm dùng chất dẫn thuốc làm tăng thêm 0,25 nồng độ hemoglobin được glycat hóa, nhóm được điều trị bằng DFD74 làm tăng thêm 0,1 và nhóm được điều trị bằng DFD72 làm giảm 0,27 (Fig. 11).

Ví dụ thử nghiệm 6. Hoạt tính của các protein dung hợp ở chuột nhắt béo phì do ăn uống

Ví dụ thử nghiệm 6-1. Phương pháp thử nghiệm để đánh giá hoạt tính ở chuột nhắt béo phì do ăn uống

Tác dụng làm giảm cân nặng của DFD18, protein dung hợp đột biến FGF21, được đánh giá ở chuột nhắt béo phì do ăn uống. Đối với mô hình bệnh béo phì do ăn uống, chuột nhắt C57BL/6J được mua từ Central Lab. Animal Inc. và cho ăn chế độ ăn giàu chất béo chứa 60 kcal % chất béo (Chế độ ăn nghiên cứu) trong 8 đến 12 tuần. Các con chuột nhắt được phân bố vào các nhóm ($n=8$ /nhóm) để có trị số trung bình tương tự về cân nặng một ngày trước khi điều trị bằng thuốc (Ngày 0), và sau đó 30 nmol/kg mẫu được dùng dưới da một lần. Sự thay đổi về cân nặng được so sánh với nhóm được điều trị bằng chất dẫn thuốc (PBS).

Ví dụ thử nghiệm 6-2. Hoạt tính protein ở chuột nhắt béo phì do ăn uống

Đối với sự thay đổi về cân nặng theo thời gian ở mô hình chuột nhắt bị bệnh béo phì do ăn uống sau khi dùng liều đơn 30 nmol/kg DFD18, đã xác nhận được rằng tác dụng làm giảm cân nặng vẫn tiếp tục đến ngày thứ 10 sau khi dùng, và mức giảm thể trọng tối đa (khoảng 18%) vẫn tiếp tục ở ngày thứ 11 sau khi dùng, mà được duy trì ở ngày thứ 14 (Fig.12).

Ví dụ thử nghiệm 7. Dự đoán và đánh giá độ sinh miễn dịch

Ví dụ thử nghiệm 7-1. Phương pháp để dự đoán độ sinh miễn dịch và kết quả

Để dự đoán độ sinh miễn dịch tiềm năng của các protein dung hợp đột biến FGF21, phân tích *in silico* về độ sinh miễn dịch được thực hiện đối với mỗi protein.

Đặc biệt, độ sinh miễn dịch tiềm năng của các protein được sàng lọc nhanh chóng bằng cách sử dụng các phương pháp iTopeTM và TCEDTM (Dự đoán độ sinh miễn dịch của các protein điều trị: hiệu lực của công cụ máy tính, BioDrugs, 2010). Liên quan tới hai phương pháp, epitop tế bào T có thể được dự đoán một cách chính xác hơn so với phương pháp phân tích *in silico* mà chỉ tùy thuộc vào phân tích gắn kết MHC loại II.

Ví dụ thử nghiệm 7-2. Phương pháp đánh giá *ex vivo* về độ sinh miễn dịch và kết quả

Để đánh giá độ sinh miễn dịch tiềm năng của các protein dung hợp đột biến FGF21, phân tích EpiScreenTM (Phân bố sinh học trong não được gia tăng và độ ổn định hóa học và độ sinh miễn dịch giảm của biến thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền của GDNF, Exp Neurol, 2015) được thực hiện. Khi độ sinh miễn dịch được phát hiện, trình tự axit amin tạo ra độ sinh miễn dịch có thể được nhận diện bằng cách lập bản đồ epitop tế bào T, và đột biến được khử miễn dịch có độ sinh miễn dịch được giảm đến mức tối thiểu có thể được thiết kế và được tạo ra bằng cách dự đoán *in silico* để đánh giá lại độ

sinh miễn dịch.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein dung hợp chứa protein đột biến yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 21 (FGF21: fibroblast growth factor 21) và vùng Fc của globulin miễn dịch, trong đó protein đột biến FGF21 này có đột biến sau đây:

(1) thay thế các axit amin ở các vị trí từ 98 đến 101 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng trình tự axit amin EIRP (SEQ ID NO: 42).

2. Protein dung hợp theo điểm 1, trong đó protein đột biến FGF21 này còn có đột biến sau đây:

(6) thay thế axit amin ở vị trí 180 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng axit amin E.

3. Protein dung hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó protein đột biến FGF21 này còn có ít nhất một đột biến được chọn từ nhóm bao gồm các đột biến sau:

(2) thay thế các axit amin ở các vị trí từ 170 đến 174 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng trình tự axit amin TGLEAV (SEQ ID NO: 43);

(3) thay thế các axit amin ở các vị trí từ 170 đến 174 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng trình tự axit amin TGLEAN (SEQ ID NO: 44);

(4) thay thế axit amin ở vị trí 170 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng axit amin N; và

(5) thay thế axit amin ở vị trí 174 từ đầu tận cùng N của protein FGF21 tự nhiên bằng axit amin N.

4. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó gốc axit amin N của protein đột biến FGF21 được đưa vào bởi đột biến được glycosyl hóa.

5. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó protein FGF21 tự nhiên có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

6. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1, 4, và 5, trong đó protein đột biến FGF21 có trình tự axit amin nêu trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID

NO: 6, 11 đến 15, và 20 đến 23.

7. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó protein đột biến FGF21 được nối với vùng Fc của globulin miễn dịch bằng liên kết.

8. Protein dung hợp theo điểm 7, trong đó liên kết này được nối với đầu tận cùng C của vùng Fc của globulin miễn dịch và đầu tận cùng N của protein đột biến FGF21, tốt hơn nếu trong đó liên kết này là peptit bao gồm 10 đến 30 gốc axit amin, còn tốt hơn nếu trong đó liên kết này có trình tự axit amin nêu trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 2 đến 5.

9. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch là vùng Fc bất kỳ trong số IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 và IgD, hoặc Fc lai chứa dạng kết hợp của chúng.

10. Protein dung hợp theo điểm 9, trong đó Fc lai chứa vùng IgG4 và vùng IgD.

11. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó protein dung hợp có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 hoặc SEQ ID NO: 39.

12. Dược phẩm chứa protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11 dùng để điều trị bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hóa, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu hoặc bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu.

13. Phân tử axit nucleic phân lập mã hóa protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.

14. Vật truyền biểu hiện chứa phân tử axit nucleic theo điểm 13.

15. Tế bào chủ chứa vật truyền biểu hiện theo điểm 14.

Fig.1A

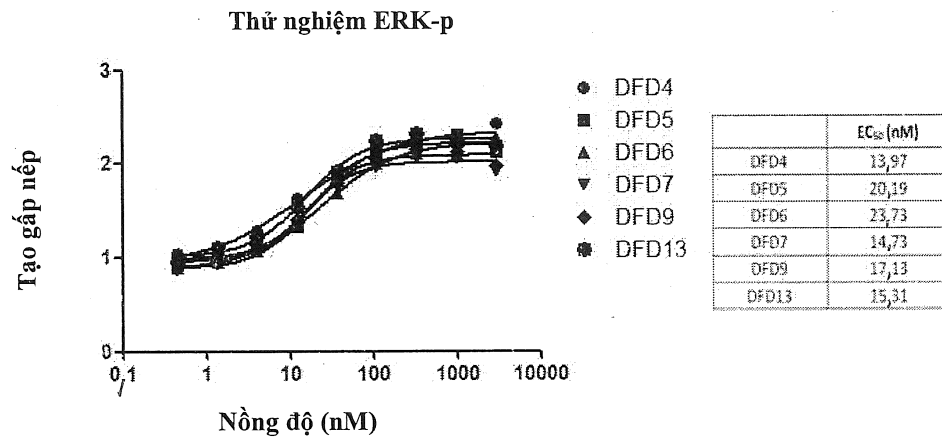


Fig.1B

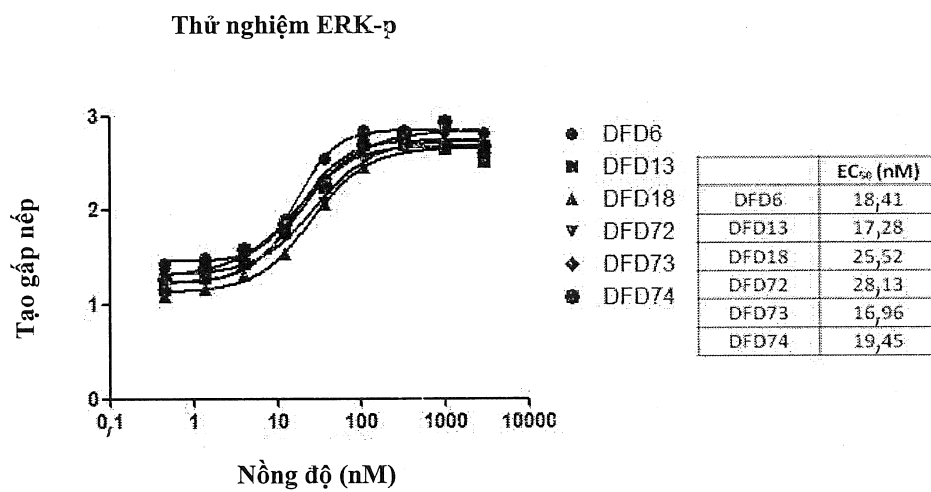


Fig.1C

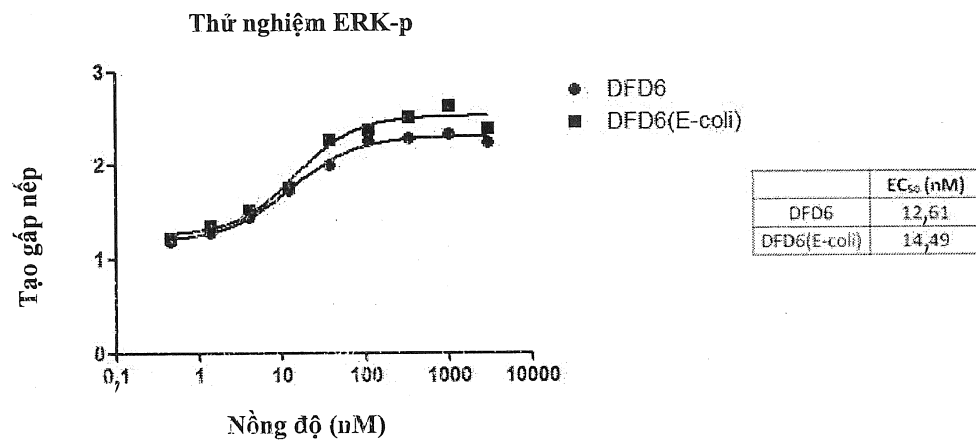


Fig.2A

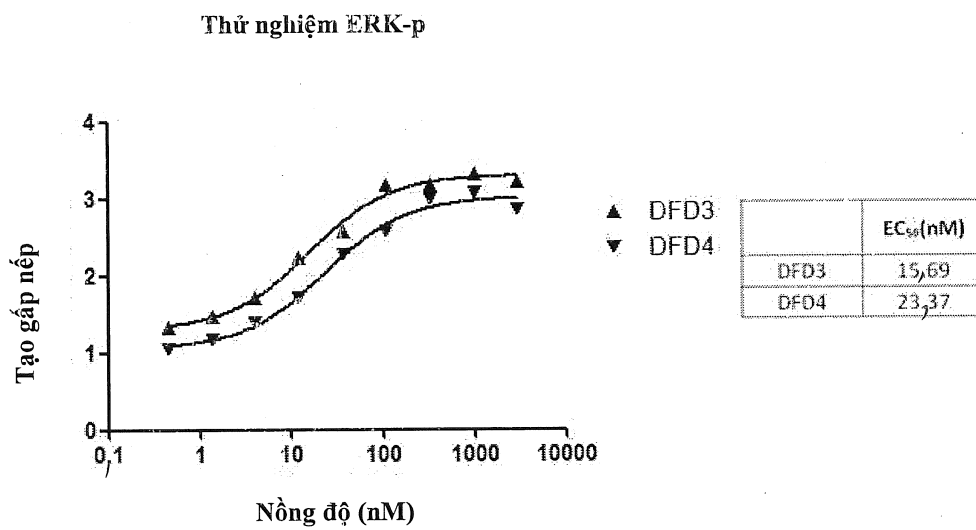


Fig.2B

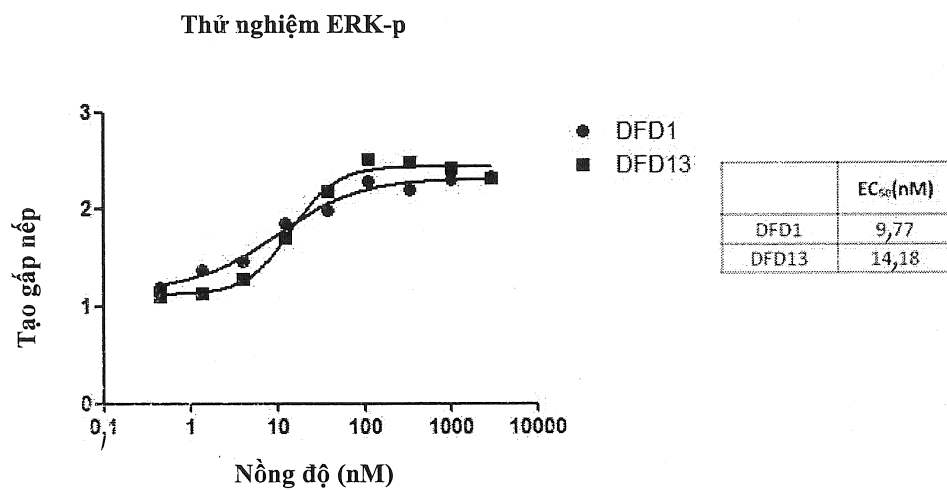


Fig.3

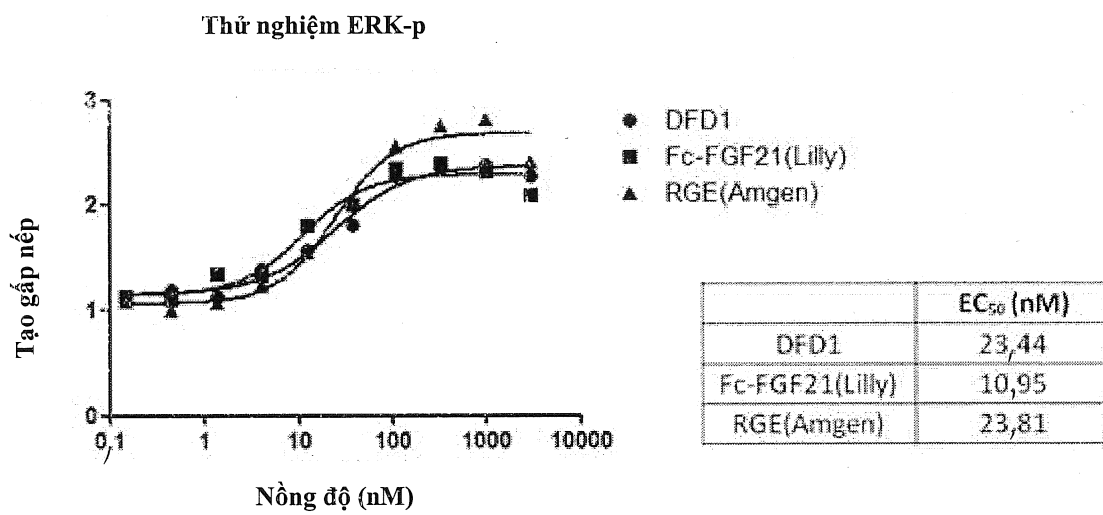


Fig.4

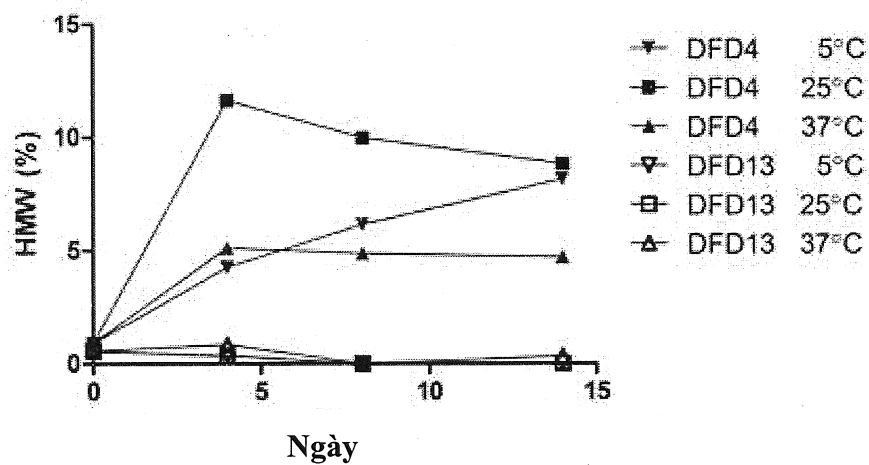
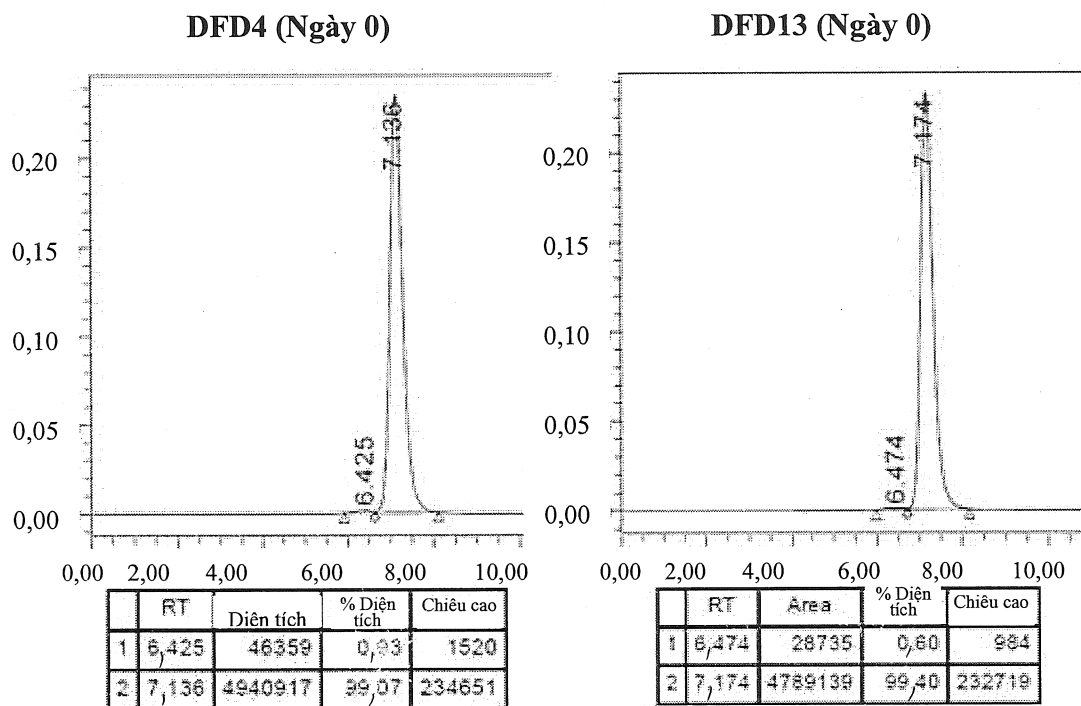


Fig.5

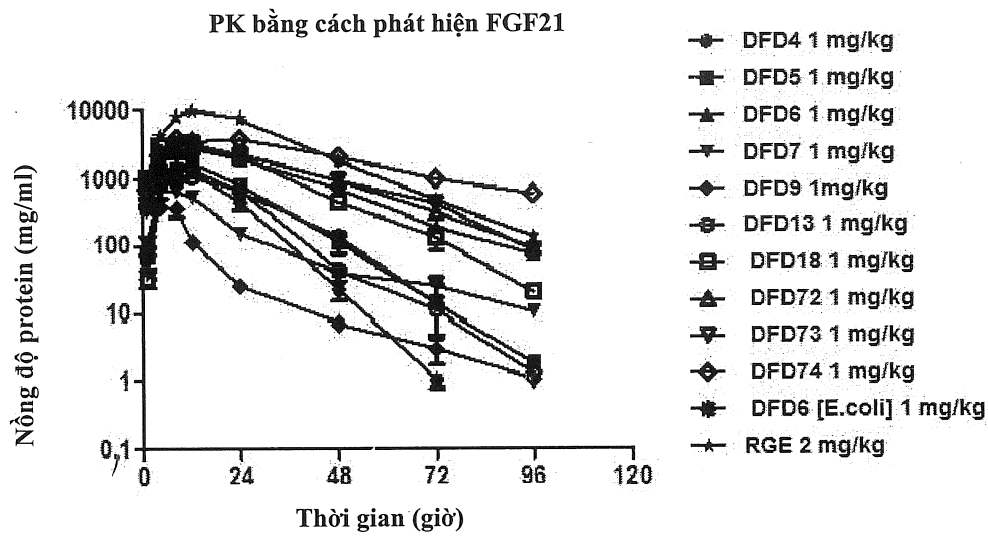


Fig.6

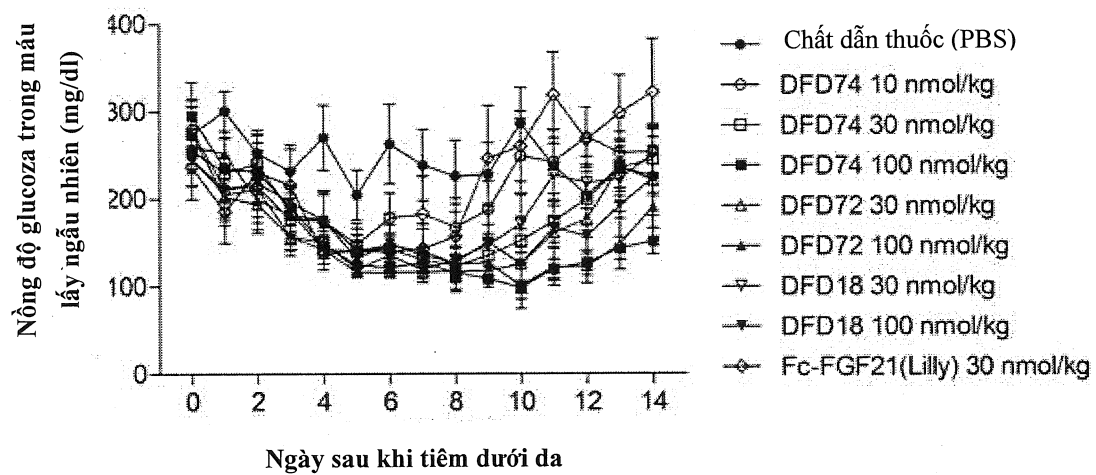


Fig.7

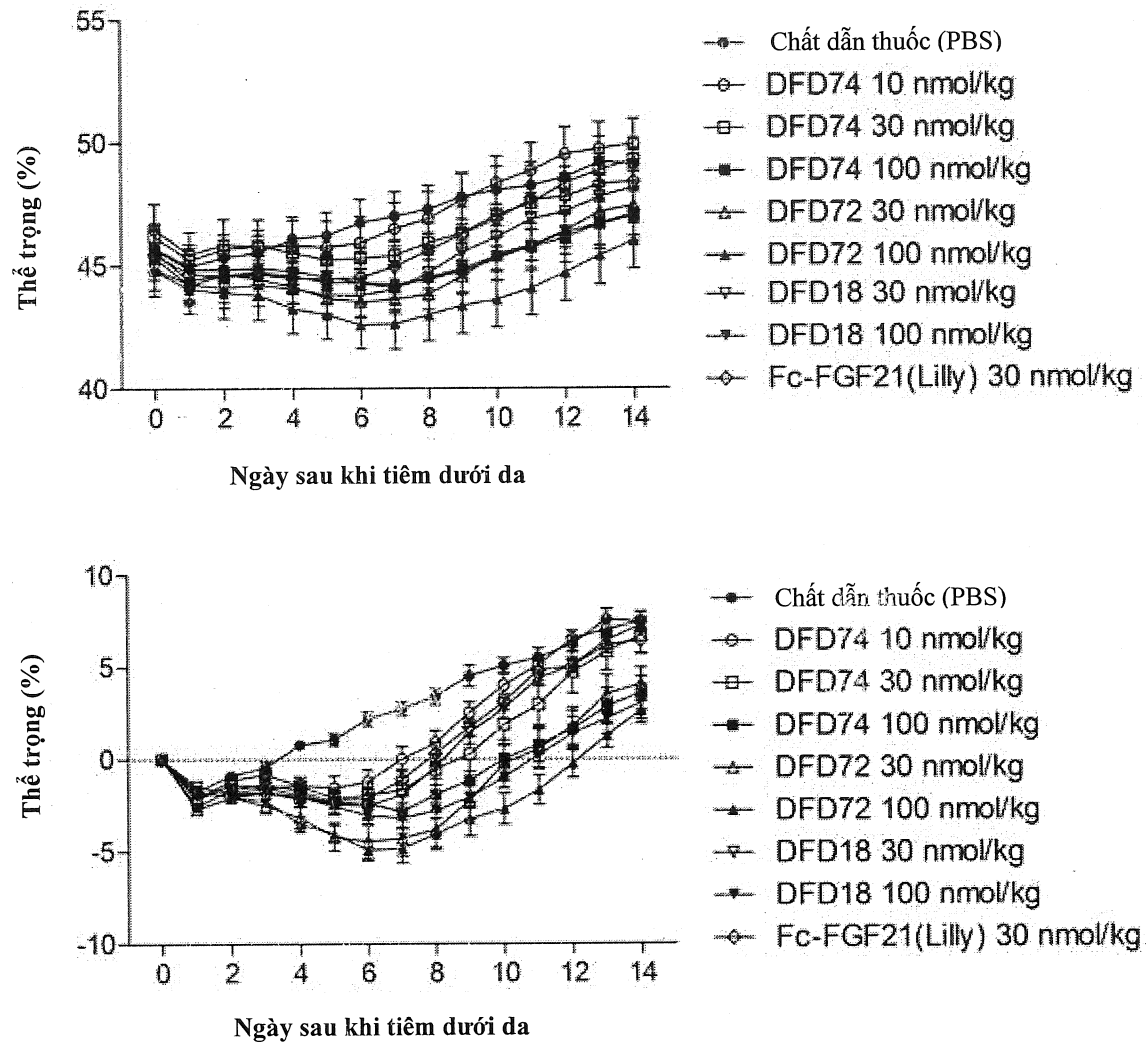


Fig.8

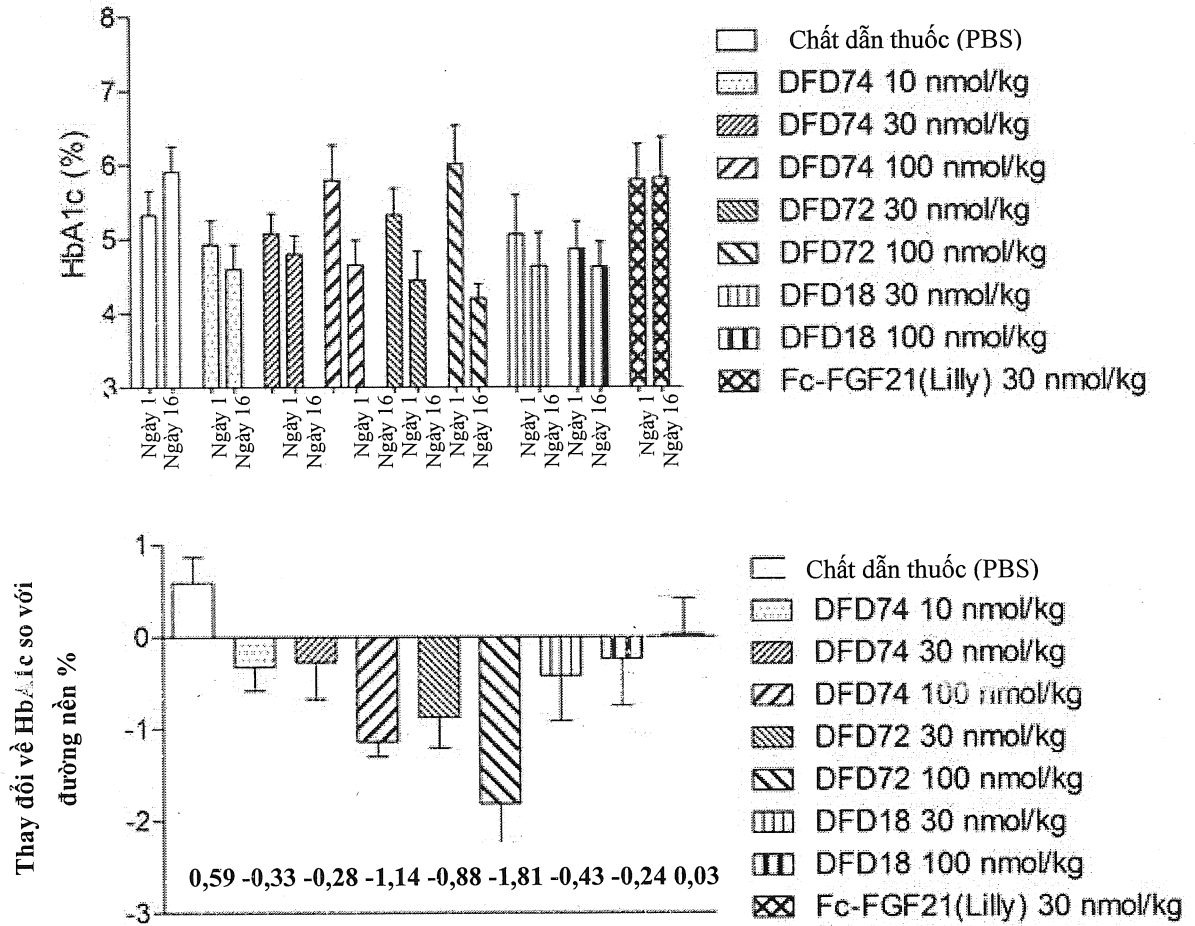


Fig.9

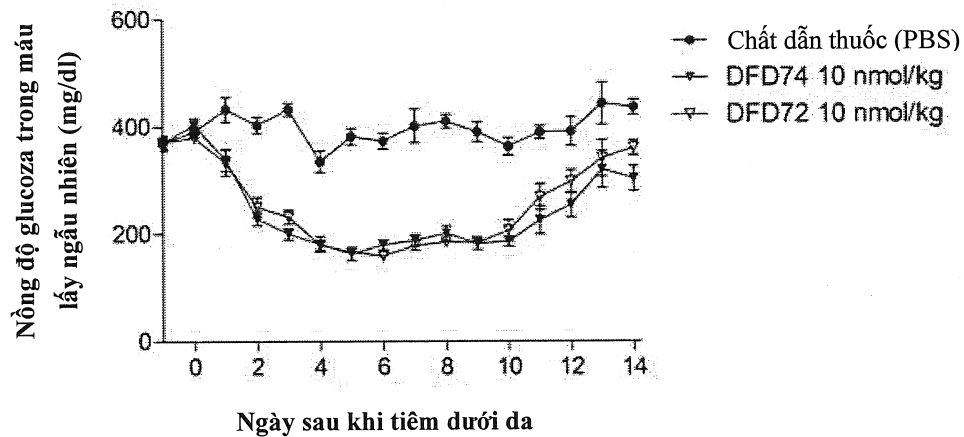


Fig.10

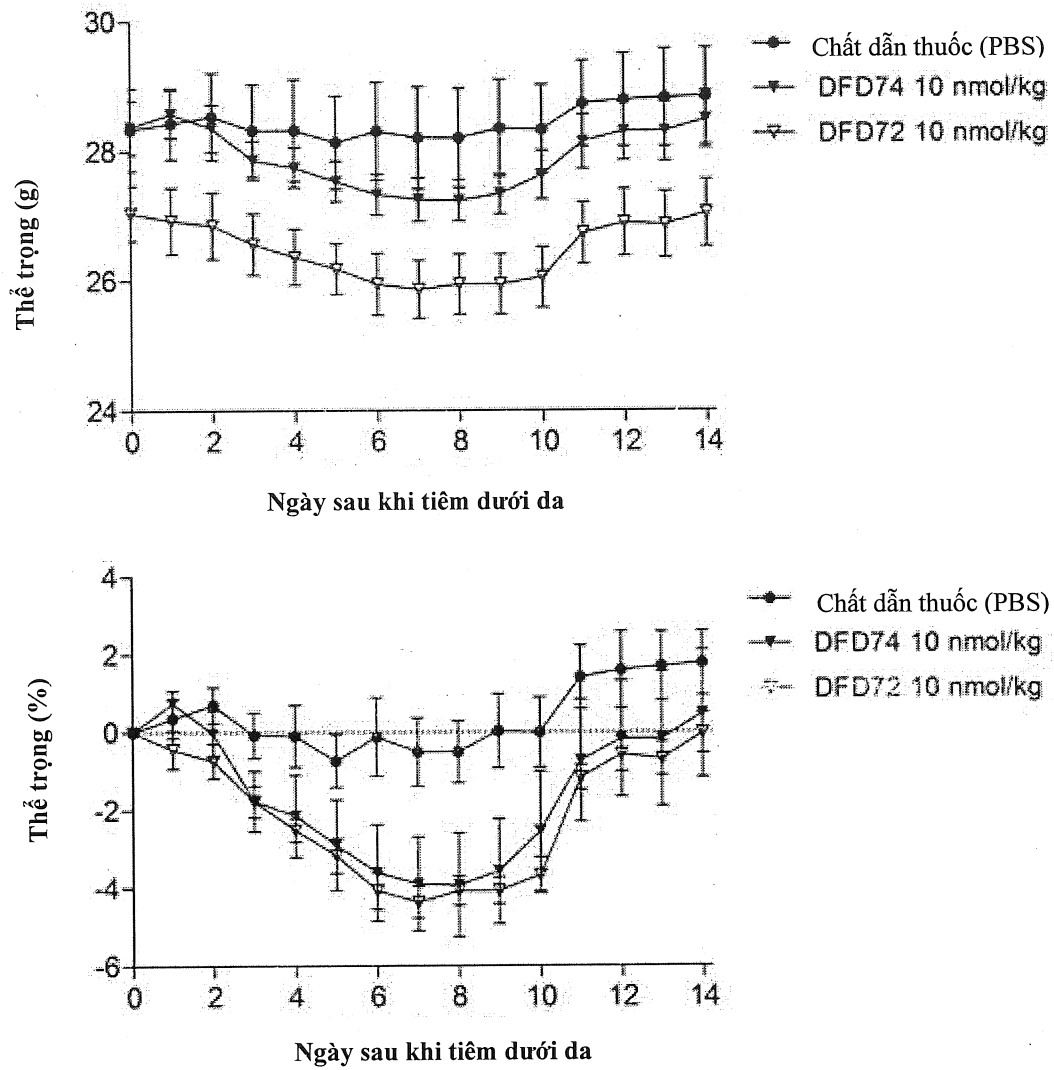


Fig.11

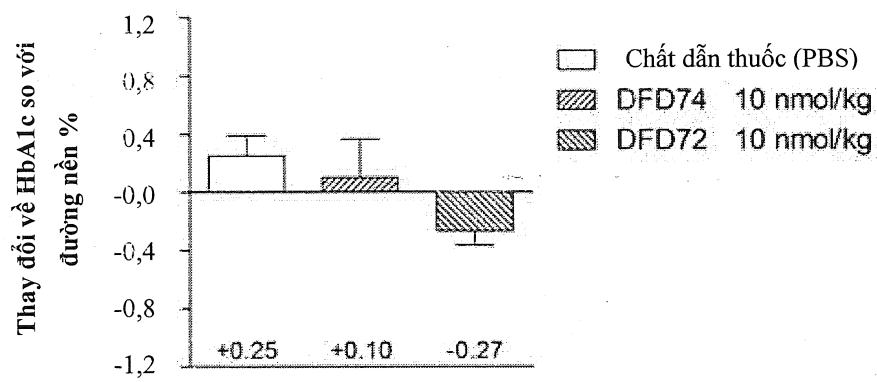
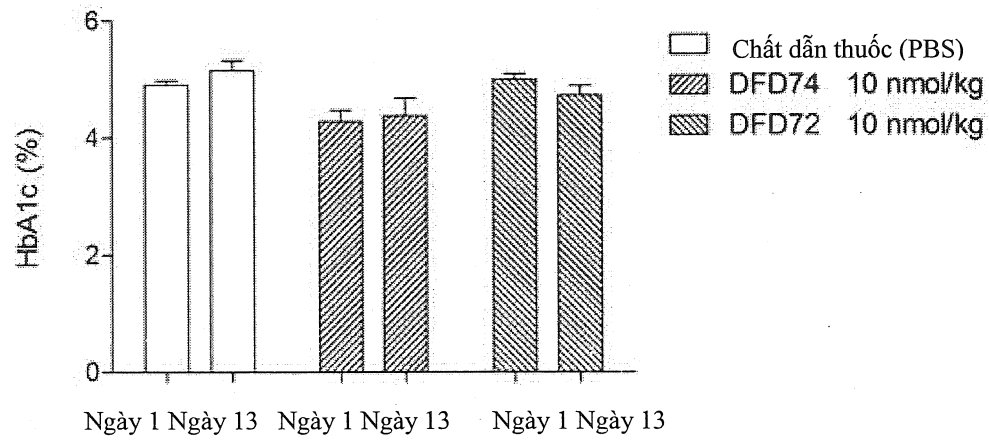
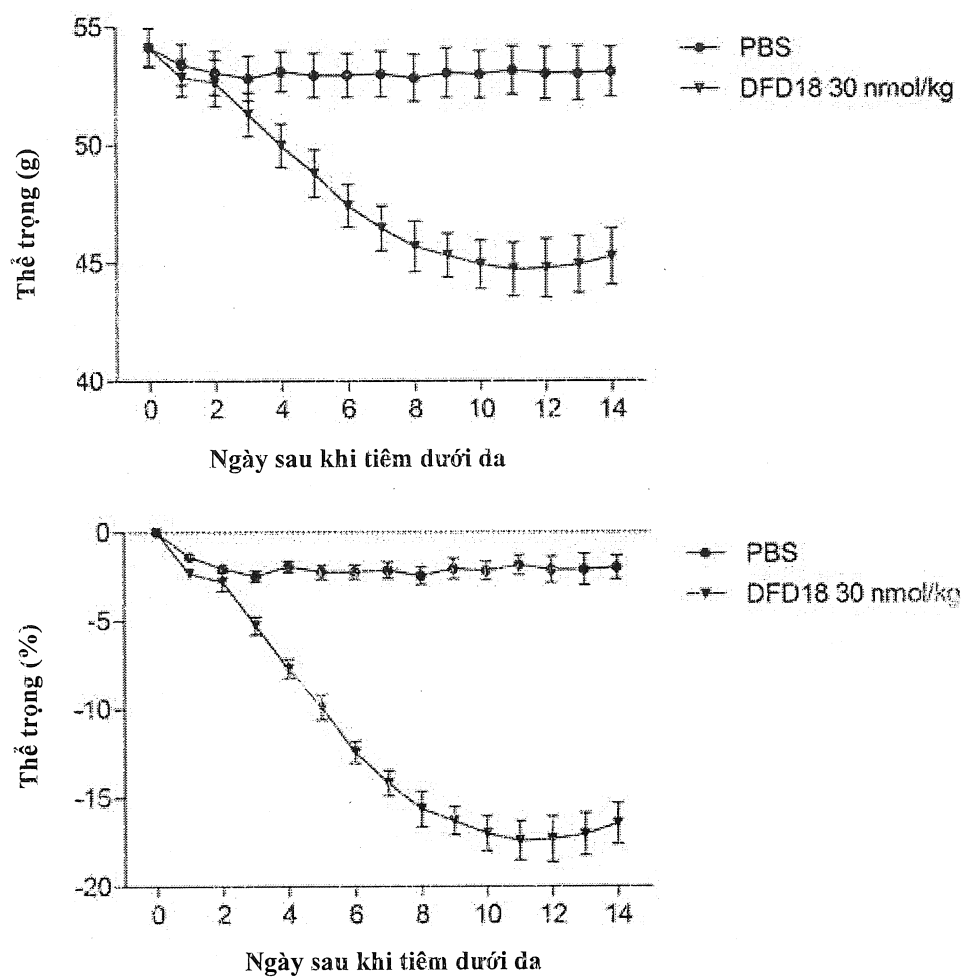


Fig.12



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> YUHAN CORPORATION

<120> PROTEIN DUNG HỢP FGF21 CÓ TÁC DỤNG KÉO DÀO VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA

<130> PCB608053YUH

<150> KR 2015/0150574

<151> 2015-10-28

<160> 57

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 181

<212> PRT

<213> FGF21 của người

<400> 1

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50

55

60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65

70

75

80

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

85

90

95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100

105

110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115

120

125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130

135

140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165

170

175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> liên kết

<400> 2

Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly

1

5

10

15

Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu

20

25

30

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> liên kết

<400> 3

Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly

1

5

10

15

Gly

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> liên kết

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> liên kết

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala

1

5

10

15

<210> 6

<211> 181

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể FGF21

<400> 6

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1

5

10

15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20

25

30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35

40

45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50

55

60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65

70

75

80

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

85

90

95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100

105

110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115

120

125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130

135

140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165

170

175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 7

<211> 182

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21

<400> 7

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1

5

10

15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20

25

30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35

40

45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50

55

60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65

70

75

80

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

85

90

95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100

105

110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115

120

125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130

135

140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg

165

170

175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 8

<211> 182

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21

<400> 8

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Asn Arg

165

170

175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 9

<211> 181

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21

<400> 9

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1

5

10

15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20

25

30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35

40

45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50

55

60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65

70

75

80

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

85

90

95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100

105

110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115

120

125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130

135

140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165

170

175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 10

<211> 181

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biễn thể FGF21

<400> 10

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100

105

110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115

120

125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130

135

140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Asn Arg Ser

165

170

175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 11

<211> 182

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bién thể FGF21

<400> 11

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg

165

170

175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 12

<211> 182

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21

<400> 12

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1

5

10

15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20

25

30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35	40	45	
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln			
50	55	60	
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly			
65	70	75	80
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg			
	85	90	95
Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His			
100	105	110	
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro			
115	120	125	
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro			
130	135	140	
Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val			
145	150	155	160
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Asn Arg			
	165	170	175
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
180			

<210> 13

<211> 181

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21

<400> 13

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

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

85

90

95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100

105

110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115

120

125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130

135

140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165

170

175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 14

<211> 181

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể FGF21

<400> 14

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140
 Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Asn Arg Ser
 165 170 175
 Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 15
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể FGF21

<400> 15
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15

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

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35

40

45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50

55

60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65

70

75

80

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

85

90

95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100

105

110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115

120

125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130

135

140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165

170

175

Pro Ser Tyr Glu Ser

180

<210> 16

<211> 182

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21

<400> 16

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

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

85

90

95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100

105

110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115

120

125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130

135

140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg

165

170

175

Ser Pro Ser Tyr Glu Ser

180

<210> 17

<211> 182

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bién thể FGF21

<400> 17

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130

135

140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Asn Arg

165

170

175

Ser Pro Ser Tyr Glu Ser

180

<210> 18

<211> 181

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21

<400> 18

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1

5

10

15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20

25

30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35

40

45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50

55

60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65

70

75

80

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

85

90

95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100

105

110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115

120

125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130

135

140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165

170

175

Pro Ser Tyr Glu Ser

180

<210> 19

<211> 181

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21

<400> 19

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1

5

10

15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20

25

30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35

40

45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50

55

60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65

70

75

80

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

85

90

95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100

105

110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115

120

125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130

135

140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Asn Arg Ser

165

170

175

Pro Ser Tyr Glu Ser

180

<210> 20

<211> 182

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể FGF21

<400> 20

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130

135

140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg

165

170

175

Ser Pro Ser Tyr Glu Ser

180

<210> 21

<211> 182

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21

<400> 21

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1

5

10

15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

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

Ser Pro Ser Tyr Glu Ser

180

<210> 22

<211> 181

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bién thể FGF21

<400> 22

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1

5

10

15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20

25

30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35

40

45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50

55

60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65	70	75	80
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg			
85	90	95	
Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His			
100	105	110	
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro			
115	120	125	
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro			
130	135	140	
Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val			
145	150	155	160
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser			
165	170	175	
Pro Ser Tyr Glu Ser			
180			

<210>	23
<211>	181
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể FGF21

<400> 23

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115

120

125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130

135

140

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

145

150

155

160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Asn Arg Ser

165

170

175

Pro Ser Tyr Glu Ser

180

<210> 24

<211> 229

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IgG4 Fc của người

<400> 24

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225

<210> 25

<211> 228

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> biến thể IgG4 Fc của người

<400> 25

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

```

165                               170                               175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180                               185                               190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195                               200                               205
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210                               215                               220
Leu Ser Leu Gly
225

```

<210>	26
<211>	223
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể Fc lai

<400> 26

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

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

20

25

30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

```

      165              170              175
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

      180              185              190
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

      195              200              205
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

      210              215              220

```

<210> 27

<211> 435

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<223> Biến thể FGF21 cải biến được nối với Fc lai

<400> 27

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

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

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

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly

225

230

235

240

Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu His Pro Ile

245

250

255

Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg

260

265

270

Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile

275

280

285

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

290

295

300

Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly

305

310

315

320

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

325

330

335

Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu Ile

340

345

350

Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro

355

360

365

Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg

370

375

380

Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro

385

390

395

400

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

405

410

415

Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser

420

425

430

Tyr Ala Ser

435

<210> 28

<211> 422

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bién thể FGF21 cải bién đợc nối với Fc lai

<400> 28

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly

225

230

235

240

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

245

250

255

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

260	265	270	
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser			
275	280	285	
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln			
290	295	300	
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly			
305	310	315	320
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg			
325	330	335	
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His			
340	345	350	
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro			
355	360	365	
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro			
370	375	380	
Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val			
385	390	395	400
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg			
405	410	415	

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

420

<210> 29

<211> 420

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21 cải biến được nối với Fc lai

<400> 29

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1

5

10

15

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

20

25

30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35

40

45

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

50

55

60

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro

225 230 235 240

Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln

245 250 255

Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu

260 265 270

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

275 280 285

Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu

290 295 300

Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu

305 310 315 320

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

325 330 335

Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu

340 345 350

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro

355 360 365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu

370

375

380

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

385

390

395

400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro

405

410

415

Ser Tyr Ala Ser

420

<210> 30

<211> 420

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21 cải biến được nối với Fc lai

<400> 30

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1

5

10

15

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

20

25

30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro

225

230

235

240

Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln

245

250

255

Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu

260

265

270

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

275

280

285

Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu

290

295

300

Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu

305

310

315

320

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

325 330 335

Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu

340 345 350

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro

355 360 365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Asn Arg Ser Pro

405 410 415

Ser Tyr Ala Ser

420

<210>	31
<211>	419
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo
<220>	
<223>	Biến thể FGF21 cải biến được nối với Fc lai

<400> 31

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

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

Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu

290

295

300

Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu

305

310

315

320

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

325

330

335

Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu

340

345

350

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro

355

360

365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu

370

375

380

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

385

390

395

400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser

405

410

415

Tyr Ala Ser

<210> 32

<211> 419

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bién thể FGF21 cải bién được nối với Fc lai

<400> 32

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro

225

230

235

240

Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln

245

250

255

Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu

260

265

270

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

275

280

285

Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu

290

295

300

Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu

305

310

315

320

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

325

330

335

Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu

340

345

350

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro

355

360

365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu

370

375

380

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

385

390

395

400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser

405

410

415

Tyr Ala Ser

<210> 33

<211> 419

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bién thể FGF21 cải biến được nối với Fc lai

<400> 33

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1

5

10

15

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

20

25

30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195	200	205	
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly			
210	215	220	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro			
225	230	235	240
Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln			
	245	250	255
Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu			
	260	265	270
Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu			
	275	280	285
Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu			
	290	295	300
Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu			
305	310	315	320
Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu			
	325	330	335
Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu			
	340	345	350

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro

355

360

365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu

370

375

380

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

385

390

395

400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Asn Arg Ser Pro Ser

405

410

415

Tyr Ala Ser

<210> 34

<211> 419

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21 cải biến được nối với Fc lai

<400> 34

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

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

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro

225

230

235

240

Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln

245

250

255

Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu

260

265

270

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

275

280

285

Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu

290

295

300

Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu

305

310

315

320

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

325

330

335

Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu

340

345

350

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro

355

360

365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu

370

375

380

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

385

390

395

400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser

405

410

415

Tyr Ala Ser

<210> 35

<211> 420

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21 cải biến được nối với Fc lai

<400> 35

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro

225

230

235

240

Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln

245

250

255

Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu

260	265	270	
Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu			
275	280	285	
Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu			
290	295	300	
Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu			
305	310	315	320
Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu			
325	330	335	
Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu			
340	345	350	
Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro			
355	360	365	
Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu			
370	375	380	
Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser			
385	390	395	400
Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro			
405	410	415	

Ser Tyr Ala Ser

420

<210> 36

<211> 420

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21 cải biến được nối với Fc lai

<400> 36

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1

5

10

15

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

20

25

30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro

225 230 235 240

Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln

245 250 255

Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu

260 265 270

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

275 280 285

Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu

290 295 300

Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu

305 310 315 320

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

325 330 335

Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu

340 345 350

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro

355 360 365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu

370

375

380

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

385

390

395

400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro

405

410

415

Ser Tyr Glu Ser

420

<210> 37

<211> 420

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biền thể FGF21 cải biến được nối với Fc lai

<400> 37

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1

5

10

15

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

20

25

30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro

225

230

235

240

Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln

245

250

255

Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu

260

265

270

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

275

280

285

Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu

290

295

300

Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu

305

310

315

320

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

325 330 335
 Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu
 340 345 350
 Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro
 355 360 365
 Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu
 370 375 380
 Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
 385 390 395 400
 Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Asn Arg Ser Pro
 405 410 415
 Ser Tyr Glu Ser
 420

 <210> 38
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Biến thể FGF21 cải biến được nối với Fc lai

<400> 38

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

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

Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu

290

295

300

Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu

305

310

315

320

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

325

330

335

Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu

340

345

350

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro

355

360

365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu

370

375

380

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

385

390

395

400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser

405

410

415

Tyr Ala Ser

<210> 39

<211> 419

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bién thể FGF21. cài bién đưóc nối với Fc lai

<400> 39

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro

225

230

235

240

Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln

245

250

255

Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu

260

265

270

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

275

280

285

Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu

290

295

300

Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu

305

310

315

320

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

325

330

335

Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu

340

345

350

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro

355

360

365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu

370

375

380

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

385

390

395

400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser

405

410

415

Tyr Glu Ser

<210> 40

<211> 423

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> RGE Amgen)

<400> 40

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

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

Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg

355

360

365

Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu

370

375

380

Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro

385

390

395

400

Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln Gly

405

410

415

Arg Ser Pro Ser Tyr Glu Ser

420

<210> 41

<211> 424

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FGF21 nối với Fc(lilly)

<400> 41

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala

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

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

225

230

235

240

Gly Gly Ser Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe

245

250

255

Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln

260

265

270

Thr Glu Cys His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Cys Ala

275

280

285

Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro

290

295

300

Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln

305

310

315

320

Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala

325

330

335

Cys Ser Phe Arg Glu Asp Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln

340

345

350

Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro

355

360

365

His Arg Lys Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro

370

375

380

Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln

385

390

395

400

Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Arg Leu Val Glu Pro Ser

405

410

415

Gln Leu Arg Ser Pro Ser Phe Glu

420

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể FGF21

<400> 42

Glu Ile Arg Pro

1

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể FGF21

<400> 43

Thr Gly Leu Glu Ala Val

1

5

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biểu thể FGF21

<400> 44

Thr Gly Leu Glu Ala Asn

1

5

<210> 45

<211> 1305

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic mã hóa DFD1

<400> 45

gagaccaaga cacctgaatg tccaagtcac actcagcctc tgggagtgtt tctcttccca 60

cctaagccca aggataccct tatgatttct aggacacctg aggtgacctg cgtcgttgtg 120

gacgtgagtc aagaggaccc agaggtccag tttaactggg atgttgacgg cgtggaagtg 180

cataatgcaa aaactaaacc ccgcgaggaa caattcaatt caacctaccg ggtcgtttct 240

gtgttgacag tgctgcatca agattggctg aacgggaagg agtataagtg taaagtcagt	300
aataagggac tccccctctag tatcgaaaaa actattttcaa aggccaaagg ccagcctaga	360
gagccacagg ttacaccct tctccatcc caagaggaga tgacaaagaa ccaggtgtct	420
ctgacttgtc tegtgaagg gttctaccct agtgacatcg ctgtogaatg ggagtcaaac	480
ggacagccag agaataatta taagacaact cctcccgctt tggattctga cggcagcttc	540
tttctgtact ctaggcttac tgtggacaaa agtcgctggc aagaaggga cgtcttttca	600
tgttctgtta tgcacgaggc cttgcacaat cattatacac agaagtctct gagtctctca	660
ctgggcaaag ccaaggctac cacagcacc gccactacc ggaacaccgg tagaggggga	720
gagggaaaaga agaaagagaa ggaaaaagag gaacaggagc atcccatccc tgactccagt	780
cctctcctgc aattcggggg ccaagtcgg cagcgggtacc tctacacaga tgatgctcag	840
cagacagaag cccacctgga gatcaggag gatgggaccg tggggggcgc tgctgaccag	900
agccccgaaa gtctcctgca gctgaaagcc ttgaagcctg gagttattca aatcttgga	960
gtcaagacta gtaggttcct gtgccagcgg ccagatgggg ccctgtatgg atctctccat	1020
tttgaccctg aggctgcag cttccgggag gagatcagac ccgacggata caatgtttac	1080

cagtccgaag cccacggcct ccctctgcat ctgcccggga acaagtctcc tcaccgggac 1140

cctgccccca gaggacctgc tcgcttctg ccactcccag gcctgcccc cgcattgcct 1200

gagccaccg gaatcctggc cccccagccc cctgatgtgg gatcctctga ccctctgagc 1260

atggtgacag gcctggagge cgtgagaagc ccagctacg ctcc 1305

<210> 46

<211> 1266

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic mã hóa DFD3

<400> 46

gagaccaaga cacctgaatg tccaagtcac actcagcctc tgggagtgtt tctcttccca 60

ccaaagccca aggataccct tatgatttct aggacacctg aggtgacctg cgtcgttgtg 120

gacgtgagtc aagaggaccc agaggtccag tttaactggc atgttgacgg cgtggaagtg 180

cataatgcaa aaactaaacc ccgcgaggaa caattcaatt caacctaccg ggtcgtttct 240

gtgttgacag tgctgcatca agattggctg aacgggaagg agtataagtg taaagtcagt	300
aataagggac tcccctctag tatcgaaaaa actatttcaa aggccaaagg ccagcctaga	360
gagccacagg tgtacacct tcctccatcc caagaggaga tgacaaagaa ccaggtgtct	420
ctgacttgtc tcgtgaagg gttctacct agtgacatcg ctgtcgaatg ggagtcaaac	480
ggacagccag agaataatta taagacaact cctcccgttc tggattctga cggcagcttc	540
tttctgtact ctaggcttac tgtggacaaa agtcgctggc aagaaggga cgtcttttca	600
tgttctgtta tgcacgaggc cttgcacaat cattatacac agaagtctct gagtctctca	660
ctgggcaaag ccaaggctac cacagcacc gccactacca gaaacacagg caggggggga	720
catcccatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gccagtccg gcagcggtag	780
ctctacacag atgatgctca gcagacagaa gccacactgg agatcagga ggatgggacc	840
gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagcct	900
ggagttattc aaatcttggg agtcaagact agtaggttcc tgtgccagcg gccagatggg	960
gccctgtatg gatctctcca ttttgacct gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt	1020
gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gccacggcc tcctctgca tctgccccgg	1080

aacaagtctc ctcaccggga ccctgcccc agaggacctg ctcgcttcct gccactccca 1140

ggcctgcccc ccgcattgcc tgagccaccc ggaatcctgg ccccccagcc ccctgatgtg 1200

ggatcctctg accctctgag catggtgaca ggcctggagg ccgtgagaag ccccagctac 1260

gcttcc 1266

<210> 47

<211> 1260

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<223> phân tử axit nucleic mã hóa DFD4

<400> 47

gagaccaaga cacctgaatg tccaagtcac actcagcctc tgggagtgtt tctcttccca 60

cctaagccca aggataccct tatgatttct aggacacctg aggtgacctg cgtcgttgtg 120

gacgtgagtc aagaggaccc agaggtccag tttaactggc atgttgacgg cgtggaagtg 180

cataatgcaa aaactaaacc ccgcgaggaa caattcaatt caacctaccg ggtcgtttct 240

gtgttgacag tgctgcatca agattggctg aacgggaagg agtataagtg taaagtcagt 300

aataagggac tcccctctag tatcgaaaaa actattttcaa aggccaaagg ccagcctaga	360
gagccacagg tgtacaccct tcctccatcc caagaggaga tgacaaagaa ccaggtgtct	420
ctgacttgtc tcgtgaaggg gttctaccct agtgacatcg ctgtcgaatg ggagtcaaac	480
ggacagccag agaataatta taagacaact cctcccgttc tggattctga cggcagcttc	540
tttctgtact ctaggcttac tgtggacaaa agtcgctggc aagaaggga cgtcttttca	600
tgttctgtta tgcacgaggc cttgcacaat catatatacac agaagtctct gagtctctca	660
ctgggcaaag gcgggggagg cagcggggga ggcgggtccg gaggcggggg atctcatccc	720
atccctgact ccagtcctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac	780
acagatgatg ctcagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gaccgtgggg	840
ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gcctggagtt	900
attcaaactc tgggagtcaa gactagtagg ttctctgtgcc agcgccaga tggggccctg	960
tatggatctc tccattttga ccctgaggcc tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac	1020
ggatacaatg ttaccagtc cgaagcccac ggcctccctc tgcactctgcc cggaacaag	1080
tctctcacc gggaccctgc cccagagga cctgctcgtt tctgcccact cccaggcctg	1140

cccccgcat tgcctgagcc acccggaatc ctggccccc agccccctga tgtgggatcc 1200

tctgaccctc tgagcatggt gacaggcctg gaggccgtga gaagccccag ctacgcttcc 1260

1260

<210> 48

<211> 1260

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic mã hóa DFD5

<400> 48

gagaccaaga cacctgaatg tccaagtcac actcagcctc tgggagtgtt tctcttccca 60 -

cctaagccca aggataccct tatgatttct aggacacctg aggtgacctg cgtcgttgtg 120

gacgtgagtc aagaggaccc agaggtccag tttaactggt atgttgacgg cgtggaagtg 180

cataatgcaa aaactaaacc cgcgaggaa caattcaatt caacctaccg ggtcgtttct 240

gtgttgacag tgctgcatca agattggctg aacgggaagg agtataagtg taaagtcagt 300

aataagggac tccctcttag tatcgaaaaa actatttcaa aggccaaagg ccagcctaga	360
gagccacagg tgtacaccct tcctccatcc caagaggaga tgacaaagaa ccaggtgtct	420
ctgacttgtc tcgtgaagg gttctaccct agtgacatcg ctgtcgaatg ggagtcaaac	480
ggacagccag agaataatta taagacaact cctcccgttc tggattctga cggcagcttc	540
tttctgtact ctaggcttac tgtggacaaa agtcgctggc aagaaggga cgtcttttca	600
tgttctgtta tgcacgaggc cttgcacaat cattatacac agaagtctct gagtctctca	660
ctgggcaaag gcgggggagg cagcggggga ggcgggtccg gaggcggggg atctcatccc	720
atccctgact ccagtcctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac	780
acagatgatg ctcagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gaccgtgggg	840
ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gcctggagtt	900
attcaaattct tgggagtcaa gactagtagg ttctgtgcc agcgccaga tggggccctg	960
tatggatctc tccattttga cctgaggcc tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac	1020
ggatacaatg ttaccagtc cgaagcccac ggcctccctc tgcattctgcc cggaacaag	1080
tctcctcacc gggaccctgc cccagagga cctgctcgct tctgccact ccagggcctg	1140

ccccccgcat tgcctgagcc acccggaatc ctggccccc agccccctga tgtgggatcc 1200

tctgaccctc tgagcatggt gacaggcctg gaggccaaca gaagccccag ctacgcttcc 1260

1260

<210> 49

<211> 1257

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic mã hóa DFD6

<400> 49

gagaccaaga cacctgaatg tccaagtcac actcagcctc tgggagtgtt tctcttccca 60

cctaagccca aggataccct tatgatttct aggacacctg aggtgacctg cgtcgttggt 120

gacgtgagtc aagaggaccc agaggtccag tttaactggt atgttgacgg cgtggaagtg 180

cataatgcaa aaactaaacc ccgcgaggaa caattcaatt caacctaccg ggtcgtttct 240

gtgttgacag tgctgcatca agattggctg aacgggaagg agtataagtg taaagtcagt 300

aataagggac tcccctctag tatcgaaaaa actattttcaa aggccaaagg ccagcctaga 360

gagccacagg tgtacaccct tcctccatcc caagaggaga tgacaaagaa ccaggtgtct	420
ctgacttgtc tcgtgaagggt gttctaccct agtgacatcg ctgtcgaatg ggagtcaaac	480
ggacagccag agaataatta taagacaact cctcccgttc tggattctga cggcagcttc	540
tttctgtact ctaggcttac tgtggacaaa agtcgctggc aagaaggga cgtcttttca	600
tgttctgtta tgcacgaggc cttgcacaat cattatacac agaagtctct gagtctctca	660
ctgggcaaag gcgggggagg cagcggggga ggcgggtccg gaggcggggg atctcatccc	720
atccctgact ccagtcctct cctgcaatc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac	780
acagatgatg ctgagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gaccgtgggg	840
ggcgtgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gcctggagtt	900
attcaaactt tgggagtcaa gactagtagg ttctgtgcc agcgccaga tggggccctg	960
tatggatctc tccattttga cctgaggcc tgcagcttc gggagctgct tcttgaggac	1020
ggatacaatg ttaccagtc cgaagcccac ggcctccctc tgcactctgc cggaacaag	1080
tctctcacc gggaccctgc cccagagga cctgctcgt tctgccaact cccaggcctg	1140
ccccccgcat tgcctgagcc acccggaatc ctggccccc agccccctga tgtgggatcc	1200

tctgaccctc tgagcatggt gaacccttcc cagggcagaa gccccagcta cgcttcc 1257

<210> 50

<211> 1257

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic mã hóa DFD6_E-coli

<400> 50

gagaccaaaa ccccggaatg cccttcgcat acgcagcctt tgggtgtctt tctctttcca 60

ccaaagccga aagatacgtt tatgatctct cgtacgccag aagttacctg cgtagtggtc 120

gatgtttcac aggaagatcc cgaagtacag ttttaattggt acgtagacgg tgtagaagtc 180

cataatgcta aaacaaaacc gagagaagaa cagtttaatt caacgtatcg ggtgggttagc 240

gtcttgaccg ttctgcatca agattggctg aacgggaaag aatataaatg caaagtaagc 300

aataaagggc tgccaagctc tatcgaaaag actatatcca aggcaaaagg acaaccacgt 360

gagccgcaag tttacacatt gcctccatct caggaggaaa tgacaaaaaa tcaggtttcg 420

ttaacctgtc ttgttaaggg tttttatcct agtgatattg cagttgaatg ggaatcaa	480
ggtcagccgg aaaacaatta taaaactact ccgcctgttc tagattctga cggttcattc	540
ttcttgtatt cgcggctcac tgttgataaa tctcgttggc aggagggtaa tgtattcagc	600
tgtagcgtta tgcacgaagc actgcacaac cattacaccc agaaaagctt gagcttaagc	660
ctgggtaaag gtggtggtgg tagtggtgga ggaggttcag gtggtggtgg tagccatcct	720
atcccagata gttctccgct tctgcagttt ggggttcaag tgcgacaacg ttatctgtat	780
actgatgatg cacagcaaac cgaagcacat cttgaaatc gtgaagacgg tacagttgga	840
ggtgcagcag atcaatcccc ggagtcgctg ttacagttga aagcgtgaa accgggtggt	900
atacagattc tgggtgttaa aacatcacgt tttctttgtc agcgtcccga tggggcttta	960
tatgggtctc tgcatttcga ccagaagct tgttcttttc gtgaactgct tctggaagac	1020
ggctataatg tttatcaaag tgaagcacat ggtctgccat tacatctgcc gggtaacaaa	1080
tcaccacacc gtgatcctgc accgagaggt ccagctcgtt tttacctct gcccggtcta	1140
ccccggcat taccgaacc acctgggatt ctggcaccgc aaccgcctga tgttgaagc	1200
agtgatccgt taagtatggt taaccgagt cagggtagga gcccagcta tgcgtca	1257

<210> 51

<211> 1257

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic mã hóa DFD7

<400> 51

gagaccaaga cacctgaatg tccaagtcac actcagcctc tgggagtgtt tctcttccca 60

octaagccca aggataccct tatgatttct aggacacctg aggtgacctg cgtcgttgtg 120

gacgtgagtc aagaggaccc agaggtccag tttaactggt atgttgacgg cgtggaagtg 180

cataatgcaa aaactaaacc ccgcgaggaa caattcaatt caacctaccg ggtcgtttct 240

gtgttgacag tgctgcatca agattggctg aacgggaagg agtataagtg taaagtcagt 300

aataagggac tcccctctag tatcgaaaaa actatttcaa aggccaaagg ccagcctaga 360

gagccacagg tgtacaccct tcctccatcc caagaggaga tgacaaagaa ccaggtgtct 420

ctgacttgct tcgtgaaggg gttctaccct agtgacatcg ctgtcgaatg ggagtcaaac 480

ggacagccag agaataatta taagacaact cctcccgttc tggattctga cggcagcttc 540

tttctgtact ctaggcttac tgtggacaaa agtcgctggc aagaaggga cgtcttttca	600
tgttctgtta tgcacgaggc cttgcacaat cattatacac agaagtctct gagtctctca	660
ctgggcaaag gcgggggagg cagcggggga ggcgggtccg gaggcggggg atctcatccc	720
atccctgact ccagtcctct cctgcaatcc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac	780
acagatgatg ctcagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gaccgtgggg	840
ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gcctggagtt	900
attcaaactc tgggagtcaa gactagtagg ttctgtgcc agcggccaga tggggccctg	960
tatggatctc tccattttga ccctgaggcc tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac	1020
ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac ggctccctc tgcattctgc cggaacaag	1080
tctcctcacc gggaccctgc ccccagagga cctgctcgtc tctgccact cccaggcctg	1140
ccccccgcat tgcctgagcc acccggaatc ctggccccc agccccctga tgtgggatcc	1200
tctgaccctc tgagcatggt gggaccttcc cagaacagaa gccccagcta cgcttcc	1257

<210> 52

<211> 1257

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic mã hóa DFD9

<400> 52

gagaccaaga cacctgaatg tccaagtcac actcagcctc tgggagtgtt tctcttccca 60

cctaagccca aggataccct tatgattttot aggacacctg aggtgacctg cgtcgtttgtg 120

gacgtgagtc aagaggaccc agaggtccag tttaactggg atgttgacgg cgtggaagtg 180

cataatgcaa aaactaaacc ccgcgaggaa caattcaatt caacctaccg ggtcgtttct 240

gtgttgacag tgctgcatca agattggctg aacgggaagg agtataagtg taaagtcagt 300

aataagggac tcccctctag tatcgaaaaa actatttcaa aggccaaagg ccagcctaga 360

gagccacagg tgtacaccct tctccatcc caagaggaga tgacaaagaa ccaggtgtct 420

ctgacttgtc tcgtgaaggg gttctaccct agtgacatcg ctgtcgaatg ggagtcaaac 480

ggacagccag agaataatta taagacaact cctcccgttc tggattctga cggcagcttc 540

tttctgtact ctaggcttac tgtggacaaa agtcgctggc aagaaggga cgtcttttca 600

tgttctgtta tgcacgagggc cttgcacaat cattatacac agaagtctct gagtctctca	660
ctgggcaaag gcgggggagg cagcggggga ggcgggtccg gaggcggggg atctcatccc	720
atccctgact ccagtcctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac	780
acagatgatg ctgagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gaccgtgggg	840
ggcgtgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gcctggagtt	900
attcaaatct tgggagtcaa gactagtagg ttctgtgcc agcggccaga tggggccctg	960
tatggatctc tccatcttga cctgaggcc tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac	1020
ggatacaatg ttaccagtc cgaagcccac ggctccctc tgcattctgcc cgggaacaag	1080
tctctcacc gggaccctgc cccagagga cctgctcgt tctgccact cccaggcctg	1140
cccccgcat tgcctgagcc acccggaatc ctggcccccc agccccctga tgtgggatcc	1200
tctgaccctc tgagcatggg gggaccttcc cagggcagaa gcccagcta cgttcc	1257

<210> 53

<211> 1260

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic mã hóa DFD13

<400> 53

gagaccaaga cacctgaatg tccaagtcac actcagcctc tgggagtgtt tctcttccca	60
octaagccca aggataccct tatgatttct aggacacctg aggtgacctg cgtcgttgtg	120
gacgtgagtc aagaggaccc agaggtccag tttaactggc atgttgacgg cgtggaagtg	180
cataatgcaa aaactaaacc ccgcgaggaa caattcaatt caacctaccg ggtcgtttct	240
gtgttgacag tgctgcatca agattggctg aacgggaagg agtataagtg taaagtcagt	300
aataagggac tcccctctag tatcgaaaaa actatttcaa aggccaaagg ccagcctaga	360
gagccacagg tgtacacct tctccatcc caagaggaga tgacaaagaa ccaggtgtct	420
ctgacttgtc tcgtgaagg gttctaccct agtgacatcg ctgtcgaatg ggagtcaaac	480
ggacagccag agaataatta taagacaact cctcccgttc tggattctga cggcagcttc	540
tttctgtact ctaggcttac tgtggacaaa agtcgctggc aagaaggga cgtcttttca	600
tggtctgtta tgcacgaggc cttgcacaat cattatacac agaagtctct gagtctctca	660
ctgggcaaag gcgggggagg cagcggggga ggcgggtccg gaggcggggg atctcatccc	720

atccctgact ccagtcctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac	780
acagatgatg ctacgcagac agaagccac ctggagatca gggaggatgg gaccgtgggg	840
ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gcctggagtt	900
attcaaatct tgggagtcaa gactagtagg ttctgtgcc agcggccaga tggggccctg	960
tatggatctc tccattttga cctgaggcc tgcagcttcc gggaggagat cagaccgac	1020
ggatacaatg ttaccagtc cgaagccac ggctccctc tgcattctgc cggaacaag	1080
tctctcacc gggaccctgc cccagagga cctgtctgct tctgccact cccaggcctg	1140
ccccccgcat tgctgagcc acccggaatc ctggcccccc agccccctga tgtgggatcc	1200
tctgaccctc tgagcatggt gacaggcctg gaggccgtga gaagccccag ctacgcttcc	1260
	1260

<210> 54

<211> 1260

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic mã hóa DFD18

<400> 54

gagaccaaga cacctgaatg tccaagtcac actcagcctc tgggagtgtt tctcttccca	60
cctaagccca aggataccct tatgatttct aggacacctg aggtgacctg cgtcgttgtg	120
gacgtgagtc aagaggaccc agaggtcacg ttttaactgg atgttgacgg cgtggaagtg	180
cataatgcaa aaactaaacc ccgcgaggaa caattcaatt caacctaccg ggtcgtttct	240
gtgttgacag tgctgcatca agattggctg aacgggaagg agtataagtg taaagtcagt	300
aataaggacg tcccctctag tatcgaaaaa actatttcaa aggccaaagg ccagcctaga	360
gagccacagg tgracaccct tcttccatcc caagaggaga tgacaaagaa ccaggtgtct	420
ctgacttgtc tcgtgaaggg gttctaccct agtgacatcg ctgtcgaatg ggagtcaaac	480
ggacagccag agaataatta taagacaact cctcccgttc tggattctga cggcagcttc	540
tttctgtact ctaggcttac tgtggacaaa agtcgctggc aagaaggga cgtcttttca	600
tgttctgtta tgcacgaggc cttgcacaat cattatacac agaagtctct gagtctctca	660
ctgggcaaag gcgggggagg cagcggggga ggcgggtccg gaggcggggg atctcatccc	720

atccctgact ccagtcctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac	780
acagatgatg ctgagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gaccgtgggg	840
ggcgtgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gcctggagtt	900
attcaaattc tgggagtcaa gactagtagg ttctgtgcc agcgccaga tggggcctg	960
tatggatctc tccattttga ccctgaggcc tgcagcttc gggaggagat cagaccgac	1020
ggatacaatg ttaccagtc cgaagcccac ggctccctc tgcattgcc cgggaacaag	1080
tctctcacc gggaccctgc cccagagga cctgctcgt tctgccact ccaggcctg	1140
cccccgcat tgcctgagcc acccggaatc ctggccccc agccccctga tgtgggatcc	1200
tctgaccctc tgagcatggg gacaggcctg gaggccgtga gaagccccag ctacgagtcc	1260
	1260

<210> 55

<211> 1260

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic mã hóa DFD72

<400> 55

gagaccaaga cacctgaatg tccaagtcac actcagcctc tgggagtgtt tctcttccca	60
cctaagccca aggataccct tatgatttct aggacacctg aggtgacctg cgtcgttgtg	120
gacgtgagtc aagaggaccc agaggtccag tttaactggt atgttgacgg cgtggaagtg	180
cataatgcaa aaactaaacc ccgcgaggaa caattcaatt caacctaccg ggtcgtttct	240
gtgttgacag tgctgcatca agattggctg aacgggaagg agtataagtg taaagtcagt	300
aataaggac tcccctctag tatcgaaaaa actatttcaa aggccaaagg ccagcctaga	360
gagccacagg tgtacaccct tcttccatcc caagaggaga tgacaaagaa ccaggtgtct	420
ctgacttgtc tcgtgaaggg gttctaccct agtgacatcg ctgtcgaatg ggagtcaaac	480
ggacagccag agaataatta taagacaact cctcccgttc tggattctga cggcagcttc	540
tttctgtact ctaggcttac tgtggacaaa agtcgctggc aagaaggga cgtcttttca	600
tgttctgtta tgcacgaggc cttgcacaat cattatacac agaagtctct gagtctctca	660
ctgggcaaag gcgggggagg cagcggggga ggcgggtccg gaggcggggg atctcatccc	720
atccctgact ccagtctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac	780

acagatgatg ctacagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gaccgtgggg	840
ggcgtgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gcctggagtt	900
attcaaatct tgggagtcaa gactagtagg ttctgtgcc agcgccaga tggggcctg	960
tatggatctc tccattttga ccctgaggcc tgcagcttcc gggaggagat cagaccgac	1020
ggatacaatg ttaccagtc cgaagcccac ggctccctc tgcattgcc cgggaacaag	1080
tctctcacc gggaccctgc cccagagga cctgctcgt tctgccact cccaggcctg	1140
cccccgcat tgcctgagcc acccggaatc ctggcccccc agccccctga tgtgggatcc	1200
tctgacctc tgagcatggt gacaggcctg gaggccaaca gaagccccag ctacgagtcc	1260
	1260

<210> 56

<211> 1257

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic mã hóa DFD73

<400> 56

gagaccaaga cacctgaatg tccaagtcac actcagcctc tgggagtgtt tctcttccca	60
cctaagccca aggataccct tatgatttct aggacacctg aggtgacctg cgtcgttgtg	120
gacgtgagtc aagaggaccc agaggtccag tttaaactggc atgttgacgg cgtggaagtg	180
cataatgcaa aaactaaacc ccgcgaggaa caattcaatt caacctaccg ggtcgtttct	240
gtgttgacag tgctgcatca agattggctg aacgggaagg agtataagt taaagtcagt	300
aataagggac tcccctctag tatcgaaaaa actatttcaa aggccaaagg ccagcctaga	360
gagccacagg tgtacaccct tctccatcc caagaggaga tgacaaagaa ccaggtgtct	420
ctgacttgtc tcgtgaagg gttctaccct agtgacatcg ctgtcgaatg ggagtcaaac	480
ggacagccag agaataatta taagacaact cctcccgctc tggattctga cggcagcttc	540
tttctgtact ctaggcttac tgtggacaaa agtcgctggc aagaaggga cgtcttttca	600
tgttctgtta tgcacgaggc cttgcacaat cattatacac agaagtctct gagtctctca	660
ctgggcaaag gcgggggagg cagcggggga ggcgggtccg gaggcggggg atctcatccc	720
atccctgact ccagtcctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac	780

acagatgatg ctcagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gaccgtgggg 840

ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gcctggagtt 900

attcaaatct tgggagtcaa gactagtagg ttctgtgcc agcgccaga tggggccctg 960

tatggatctc tccatthtga cctgaggcc tgcagcttc gggaggagat cagacccgac 1020

ggatacaatg ttaccagtc cgaagcccac ggctocctc tgcattctgc cgggaacaag 1080

tctcctcacc gggaccctgc cccagagga cctgctcgt tctgccact cccaggcctg 1140

cccccgcat tgcctgagcc acccggaatc ctggcccccc agccccctga tgtgggatcc 1200

tctgaccctc tgagcatggt gaacccttc cagggcagaa gcccagcta cgcttc 1257

<210> 57

<211> 1257

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic mã hóa DFD74

<400> 57

gagaccaaga cacctgaatg tccaagtcac actcagcctc tgggagtgtt tctcttccca 60

cctaagccca aggataccct tatgatttct aggacacctg aggtgacctg cgtcgttg	120
gacgtgagtc aagaggaccc agaggtccag ttttaactggc atgttgacgg cgtggaagt	180
cataatgcaa aaactaaacc ccgcgaggaa caattcaatt caacctaccg ggtcgtttct	240
gtgttgacag tgctgcatca agattggctg aacgggaagg agtataagt taaagtcagt	300
aataagggac tcccctctag tatcgaaaaa actatttcaa aggccaaagg ccagcctaga	360
gagccacagg tgtacacct tcctccatcc caagaggaga tgacaaagaa ccaggtgtct	420
ctgacttgtc tcgtgaagg gttctaccct agtgacatcg ctgtcgaatg ggagtcaaac	480
ggacagccag agaataatta taagacaact cctcccgttc tggattctga cggcagcttc	540
tttctgtact ctaggcttac tgtggacaaa agtcgctggc aagaaggga cgtcttttca	600
tgttctgta tgcacgaggc cttgcacaat cattatacac agaagtctct gagtctctca	660
ctgggcaaag gcgggggagg cagcggggga ggcgggtccg gaggcggggg atctcatccc	720
atccctgact ccagtcctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac	780
acagatgatg ctcagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gaccgtgggg	840
ggcgtgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gcctggagtt	900

attcaaatct tgggagtcaa gactagtagg ttcctgtgcc agcggccaga tggggccctg	960
tatggatctc tccattttga ccctgaggcc tgcagcttcc gggaggagat cagacccgac	1020
ggatacaatg ttaccagtc cgaagccac gccctccctc tgcattctgcc cggaacaag	1080
tctcctcacc gggaccctgc cccagagga cctgctcgct tctgccact cccaggcctg	1140
ccccccgat tgcctgagcc acccggaatc ctggccccc agccccctga tgtgggatcc	1200
tctgaccctc tgagcatggt gaacccttcc cagggcagaa gcccagcta cgagtcc	1257