



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0034811

(51)⁷ C07K 14/495; A61K 38/18; C07K 14/00 (13) B

-
- (21) 1-2017-00493 (22) 28/07/2015
(86) PCT/US2015/042510 28/07/2015 (87) WO2016/018931 04/02/2016
(30) 62/031,063 30/07/2014 US; 62/195,908 23/07/2015 US
(45) 27/02/2023 419 (43) 26/06/2017 351A
(73) NGM BIOPHARMACEUTICALS, INC. (US)
333 Oyster Point Blvd., South San Francisco, CA 94080, United States of America
(72) Darrin Anthony LINDHOUT (US); Raj HALDANKAR (US); Hui TIAN (US); Jer-Yuan HSU (US).
(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)
-

- (54) POLYPEPTIT, ĐIME, DƯỢC PHẨM ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH RỐI LOẠN CHUYỂN HÓA VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA POLYPEPTIT VÀ ĐIME NÀY
(57) Sáng chế đề xuất polypeptit, phân tử axit nucleic mã hóa nó, vật truyền chứa phân tử axit nucleic này, tế bào chủ biểu hiện polypeptit và tế bào chủ chứa phân tử axit nucleic nêu trên, kháng thể liên kết đặc hiệu với polypeptit, phương pháp tổng hợp polypeptit này, protein dung hợp, dime được N-glycosyl hóa của GDF15 đã biến đổi, và dược phẩm chứa chúng dùng để điều trị bệnh rối loạn chuyển hóa cũng như đồ chứa vô trùng và kit chứa dược phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến, trong số các vấn đề khác, polypeptit và các chế phẩm của nó hữu dụng để điều trị các tình trạng bệnh có liên quan đến chuyển hóa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh béo phì là bệnh chủ yếu được gây ra bởi việc hấp thu quá nhiều thức ăn cùng với tiêu hao năng lượng bị hạn chế và/hoặc thiếu luyện tập thể chất. Bệnh béo phì làm tăng khả năng phát triển nhiều bệnh khác nhau, như bệnh tiểu đường, bệnh huyết áp cao, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh động mạch vành, chứng ngưng thở lúc ngủ, bệnh gut, bệnh thấp khớp và bệnh viêm khớp. Hơn thế nữa, nguy cơ tử vong có liên quan trực tiếp đến bệnh béo phì, như ví dụ, chỉ số khối cơ thể vượt quá 40 dẫn đến tuổi thọ trung bình giảm hơn 10 năm.

Các thuốc điều trị hiện nay bao gồm các chất ức chế sự thèm ăn nhằm vào các nhóm thụ thể (ví dụ, CB1, 5-HT_{2C}, và NPY); các chất điều hòa các vùng thèm ăn ở vùng dưới đồi và các hoạt động phân tử của ghrelin; và các chất ức chế hấp thu dinh dưỡng nhằm vào các lipaza. Không may, hiện nay chưa có một loại thuốc nào cho thấy điều trị bệnh béo phì hiệu quả mà không gây ra các tác dụng phụ, một trong số các tác dụng phụ này có thể rất nghiêm trọng.

Lượng glucoza trong máu cao kích thích các tế bào beta ở tuyến tụy tiết insulin. Kết quả là insulin kích thích glucoza đi vào các cơ và các tế bào mỡ, dẫn đến tích tụ glycogen và triglyxerit và tổng hợp protein. Việc kích hoạt các thụ thể insulin trên nhiều loại tế bào làm giảm lượng glucoza tuần hoàn nhờ tăng sử dụng và hấp thu glucoza, và nhờ làm giảm tổng hợp glucoza ở gan. Việc phá hủy hệ thống điều hòa này có thể dẫn đến bệnh tiểu đường và các hội chứng bệnh lý liên quan làm ảnh hưởng đến một lượng lớn và đang gia tăng của dân số.

Các bệnh nhân mắc hội chứng rối loạn chuyển hóa glucoza có thể bị chứng tăng đường huyết, tăng insulin huyết, và/hoặc không dung nạp glucoza. Ví dụ về rối loạn mà thường có liên quan đến lượng glucoza và/hoặc insulin bất thường là kháng insulin,

trong đó các tế bào gan, mỡ và cơ mất khả năng đáp ứng với lượng insulin bình thường trong máu.

Vì tình trạng phổ biến và mức độ nghiêm trọng của bệnh béo phì, bệnh tiểu đường và các rối loạn có liên quan đến chuyển hóa và không có liên quan đến chuyển hóa, nên các thuốc điều trị mà điều chỉnh, ví dụ, sự thèm ăn, lượng glucoza và/hoặc insulin và tăng cường đáp ứng sinh học với lượng glucoza thay đổi ở bệnh nhân vẫn còn được quan tâm.

GDF15 kiểu đại, cũng được biết đến là MIC-1 (xytokin ức chế đại thực bào-1) có liên quan đến sự điều hòa thể trọng (Tsai VW, *et al.*, PLoS One 2013; 8 (2): e55174; US8,192,735).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Polypeptit có trình tự axit amin liên kề mà ít nhất 90% tương đồng với trình tự axit amin của GDF15 trưởng thành kiểu đại của người (SEQ ID NO: 1) được đề cập. Polypeptit theo sáng chế bao gồm các protein đột biến GDF15, GDF15 đã biến đổi, và các protein đột biến GDF15 đã biến đổi. Chế phẩm chứa các polypeptit này cũng được đề cập. Sáng chế đề xuất việc sử dụng các polypeptit được mô tả ở đây, và chế phẩm chứa chúng, để điều trị hoặc phòng ngừa các rối loạn có liên quan đến thể trọng và/hoặc các rối loạn chuyển hóa glucoza.

Như nêu trên, polypeptit bao gồm trình tự axit amin liên kề mà ít nhất 90% tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được đề xuất. Trình tự axit amin liên kề bao gồm ít nhất một trong số các cặp thay thế axit amin tương ứng trong SEQ ID NO: 1 dưới đây: i) D5T/S và R21N; ii) R16N và H18T/S; iii) S23N và E25T/S; iv) L24N và D26T/S; v) S50N và F52T/S hoặc F52N và A54T/S; vi) Q51N và R53T/S hoặc R53N và A55T/S; vii) S64N và H66T/S; viii) L65N và R67T/S; ix) S82N và N84T/S; x) K91N và D93T/S hoặc D93N và G95T/S; xi) T94N và V96T/S hoặc V96N và L98T/S; xii) S97N và Q99T/S; và xiii) A106N và D108T/S.

Ví dụ, trình tự axit amin liên kề có thể bao gồm ít nhất một trong số các cặp thay thế axit amin tương ứng trong SEQ ID NO: 1 dưới đây: i) D5T và R21N hoặc D5S và R21N; ii) R16N và H18T hoặc R16N và H18S; iii) S23N và E25T hoặc S23N và E25S; iv) L24N và D26T hoặc L24N và D26S; v) S50N và F52T; S50N và F52S; F52N và A54T; hoặc F52N và A54S; vi) Q51N và R53T; Q51N và R53S; R53N và

A55T; hoặc R53N và A55S; vi) S64N và H66T hoặc S64N và H66S; vii) L65N và R67T hoặc L65N và R67S; viii) S82N và N84T hoặc S82N và N84S; ix) K91N và D93T; K91N và D93S; D93N và G95T; hoặc D93N và G95S; x) T94N và V96T; T94N và V96S; V96N và L98T; hoặc V96N và L98S; xi) S97N và Q99T hoặc S97N và Q99S; và xii) A106N và D108T hoặc A106N và D108S.

Theo các phương án nhất định, polypeptit có thể bao gồm ít nhất một trong số các cặp thay thế axit amin tương ứng trong SEQ ID NO: 1 dưới đây: D5T và R21N; S23N và E25T/S; R53N và A55T/S; S64N và H66T/S; K91N và D93T/S; D93N và G95T/S; S97N và Q99T/S; và A106N và D108T/S.

Theo các phương án nhất định, polypeptit này có thể bao gồm ít nhất một trong số các cặp thay thế axit amin tương ứng trong SEQ ID NO: 1 dưới đây: D5T và R21N; D5S và R21N; S23N và E25T; S23N và E25S; R53N và A55T; R53N và A55S; S64N và H66T; S64N và H66S; K91N và D93T; K91N và D93S; D93N và G95T; D93N và G95S; S97N và Q99T; S97N và Q99S; A106N và D108T; và A106N và D108S.

Theo các phương án nhất định, polypeptit này có thể bao gồm ít nhất một trong số các cặp thay thế axit amin tương ứng trong SEQ ID NO: 1 dưới đây: D5T và R21N; S64N và H66T/S; K91N và D93T/S; D93N và G95T/S; và S97N và Q99T/S.

Theo các phương án khác, polypeptit này có thể bao gồm ít nhất một trong số các cặp thay thế axit amin tương ứng trong SEQ ID NO: 1 dưới đây: K91N và D93T hoặc K91N và D93S; và D93N và G95T hoặc D93N và G95S. Theo các phương án khác, polypeptit này có thể bao gồm cặp thay thế axit amin tương ứng sau trong SEQ ID NO: 1: K91N và D93T.

Theo các phương án được lấy làm ví dụ, trình tự axit amin liên kề có thể ít nhất 95% tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo các phương án khác, trình tự axit amin liên kề có thể có chiều dài gồm ít nhất 98 axit amin và có thể ít nhất 90% tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó axit amin ở đầu tận cùng C của polypeptit tương ứng với isoleuxin ở vị trí 112 trong SEQ ID NO: 1.

Theo các phương án khác, trình tự axit amin liên kề có thể có chiều dài gồm ít nhất 98 axit amin và có thể ít nhất 95% tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó axit amin ở đầu tận cùng C của polypeptit tương ứng với isoleuxin ở vị trí 112 trong SEQ ID NO: 1.

Các polypeptit được mô tả ở đây được lấy làm ví dụ bao gồm trình tự axit amin liền kề mà có chiều dài gồm ít nhất 98 axit amin, ít nhất 90% tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, và có các axit amin bị mất so với SEQ ID NO: 1. Ví dụ, các polypeptit này có thể có một đoạn cắt ở đầu tận cùng N tương ứng với SEQ ID NO: 1. Đoạn cắt này có thể bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 axit amin hoặc nhiều hơn so với SEQ ID NO: 1, ví dụ, 1 đến 14 axit amin, 3 đến 14 axit amin, 6 đến 14 axit amin, hoặc 3 đến 6 axit amin.

Trong các trường hợp nhất định, trình tự axit amin liền kề mà có chiều dài gồm ít nhất 98 axit amin, ít nhất 90% tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, và không bao gồm ba axit amin đầu tiên mà tương ứng với ba axit amin đầu tiên có ở đầu cuối N của SEQ ID NO: 1, trong đó axit amin ở đầu tận cùng C tương ứng với isoleuxin ở vị trí 112 trong SEQ ID NO: 1.

Trong các trường hợp nhất định, trình tự axit amin liền kề có chiều dài gồm ít nhất 98 axit amin, ít nhất 90% tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, và không bao gồm sáu axit amin đầu tiên mà tương ứng với sáu axit amin đầu tiên có mặt ở đầu cuối N của SEQ ID NO: 1, trong đó axit amin ở đầu tận cùng C tương ứng với isoleuxin ở vị trí 112 trong SEQ ID NO: 1.

Trong các trường hợp nhất định, trình tự axit amin liền kề có chiều dài gồm ít nhất 98 axit amin, ít nhất 90% tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, và không bao gồm mười bốn axit amin đầu tiên mà tương ứng với mười bốn axit amin đầu tiên có mặt ở đầu cuối N của SEQ ID NO: 1, trong đó axit amin ở đầu tận cùng C tương ứng với isoleuxin ở vị trí 112 trong SEQ ID NO: 1.

Trong các trường hợp nhất định, polypeptit này có thể bao gồm một trình tự tín hiệu ở đầu cuối N, như, trình tự tín hiệu IgK. Trình tự tín hiệu này có thể được tiếp hợp với polypeptit này thông qua một trình tự liên kết, trong đó trình tự liên kết này có thể là trình tự liên kết có thể phân cắt được.

Cũng được đề cập ở đây là protein dung hợp mà bao gồm liền kề từ đầu cuối N đến đầu cuối C: polypeptit khác nguồn gốc-[(G₄S)]₅-GDF15; polypeptit khác nguồn gốc-[(G₄S)]₅-ΔN3-GDF15; hoặc polypeptit khác nguồn gốc-[(G₄S)]₅-ΔN6-GDF15.

Theo các phương án được lấy làm ví dụ, polypeptit khác nguồn gốc có thể là albumin huyết thanh, protein liên kết với maltoza, hoặc polypeptit Fc của globulin miễn dịch. Albumin huyết thanh có thể là albumin huyết thanh của người, albumin

huyết thanh của chó hoặc albumin huyết thanh của bò. Protein dung hợp có thể bao gồm một trình tự tín hiệu ở đầu cuối N. Trình tự tín hiệu này có thể là trình tự tín hiệu IgK.

Cũng được đề cập ở đây là phân tử axit nucleic mã hóa các polypeptit hoặc protein dung hợp nêu trên. Phân tử axit nucleic có thể được liên kết chức năng với yếu tố kiểm soát sự biểu hiện để kiểm soát sự biểu hiện của phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit hoặc protein dung hợp *in vitro* hoặc *in vivo*. Vật truyền bao gồm phân tử axit nucleic cũng được đề xuất. Vật truyền này có thể là vật truyền virus.

Theo một vài phương án, sáng chế đề xuất các tế bào chủ hoặc tế bào đã biến nạp biểu hiện một hoặc nhiều polypeptit nêu trên.

Theo các phương án cụ thể của sáng chế, một hoặc nhiều polypeptit nêu trên được bào chế để tạo thành dược phẩm, trong đó dược phẩm này còn chứa một hoặc nhiều chất pha loãng, chất mang hoặc tá dược được dụng. Theo các phương án nhất định, dược phẩm còn chứa ít nhất một chất phòng hoặc điều trị khác.

Cũng theo các phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết đặc hiệu với một trong số các polypeptit của protein đột biến nêu trên. Theo một vài phương án, kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng có mặt trong các polypeptit riêng biệt hoặc trong một polypeptit đơn. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế gắn kết với polypeptit với ái lực nằm trong khoảng từ 10^7M^{-1} đến 10^{12}M^{-1} . Cũng theo các phương án khác, kháng thể này gồm vùng cố định chuỗi nặng của isotyp IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4. Theo các phương án khác, kháng thể được đánh dấu để phát hiện, trong khi đó theo các phương án khác, kháng thể này là Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, hoặc Fab'.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể mà bao gồm polyme không phải polypeptit được liên kết cộng hóa trị (ví dụ, polyme poly(etylen glycol)). Theo các phương án khác, kháng thể này bao gồm gốc được liên kết cộng hóa trị được chọn từ gốc lipid, gốc axit béo, gốc polysacarit, và gốc carbohydrat.

Theo một vài phương án, kháng thể này là kháng thể Fv chuỗi đơn (single chain Fv – scFv), và theo một vài phương án khác scFv được multimer hóa.

Kháng thể theo sáng chế có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể như được mô tả trên đây được bào chế với ít nhất một tá dược, chất mang hoặc chất pha loãng được dụng. Dược phẩm này cũng có thể chứa ít nhất một chất phòng hoặc điều trị khác.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất đồ chứa vô trùng chứa một trong số các dược phẩm nêu trên và tùy ý một hoặc nhiều thành phần khác. Để làm ví dụ, nhưng không nhằm giới hạn, đồ chứa vô trùng này có thể là bơm tiêm. Theo các phương án khác, đồ chứa vô trùng này là một thành phần của kit; kit này cũng có thể bao gồm, ví dụ, đồ chứa vô trùng thứ hai mà chứa ít nhất một chất phòng hoặc điều trị.

Cũng được mô tả ở đây là phương pháp tổng hợp các polypeptit hoặc các protein dung hợp nêu trên. Phương pháp này có thể bao gồm nuôi cấy tế bào chủ biểu hiện polypeptit hoặc protein dung hợp; và tinh chế polypeptit hoặc protein dung hợp được biểu hiện.

Sáng chế còn bộc lộ phương pháp phòng hoặc điều trị rối loạn chuyển hóa glucoza ở đối tượng (ví dụ, người) bằng cách cho đối tượng này sử dụng một lượng hữu hiệu để điều trị polypeptit hoặc protein dung hợp nêu trên. Theo một vài phương pháp, việc phòng hoặc điều trị làm giảm glucoza trong huyết tương ở đối tượng, làm giảm insulin trong huyết tương ở đối tượng, làm giảm thể trọng và/hoặc sự hấp thu thức ăn, hoặc tăng khả năng dung nạp glucoza ở đối tượng. Theo các phương án cụ thể, rối loạn chuyển hóa glucoza là bệnh tiểu đường.

Phương pháp phòng hoặc điều trị rối loạn thể trọng ở đối tượng cũng được bộc lộ. Phương pháp này còn bao gồm việc cho đối tượng sử dụng polypeptit hoặc protein dung hợp theo sáng chế, trong đó polypeptit hoặc protein dung hợp được sử dụng với lượng hữu hiệu để phòng hoặc điều trị rối loạn thể trọng ở đối tượng. Theo một vài phương pháp, việc phòng hoặc điều trị làm giảm thể trọng và/hoặc sự hấp thu thức ăn ở đối tượng.

Theo một vài phương án, đối tượng này bị béo phì và/hoặc bị rối loạn thể trọng.

Mặc dù không bị giới hạn ở đường dùng hoặc phác đồ dùng liều cụ thể bất kỳ, nhưng theo một vài phương án đường dùng này là tiêm ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, dưới da).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sự sắp thẳng hàng của trình tự axit amin của các protein đột biến GDF15 được mô tả ở đây với trình tự axit amin của GDF15 trưởng thành kiểu dại (wild type-WT) của người.

Fig.2 thể hiện sự sắp thẳng hàng của trình tự axit amin của các protein đột biến Δ N3-GDF15 được mô tả ở đây với trình tự axit amin của GDF15 trưởng thành WT của người. Các protein đột biến Δ N3-hGDF15 thiếu 3 axit amin đầu tiên (ARN) ở đầu cuối N của hGDF15 trưởng thành.

Fig.3 thể hiện hai protein dung hợp (các cấu trúc M1 và M2) mà bao gồm liên kết từ đầu cuối N đến đầu cuối C: trình tự tín hiệu IgK (chữ thường) (IgK) – trình tự axit amin (D25-L609) của albumin huyết thanh của người (HSA) – trình tự liên kết không phân cắt được (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ [(G₄S)]₃ (được gạch dưới) – trình tự axit amin GDF15 trưởng thành của người (hGDF15) (in đậm). Cấu trúc M1 (IgK-HSA-[(G₄S)]₃-hGDF15) gồm hGDF15 trưởng thành có chiều dài đầy đủ, trong khi đó cấu trúc M2 (IgK-HSA-[(G₄S)]₃- Δ N3-hGDF15) gồm Δ N3-hGDF15, trong đó 3 axit amin đầu tiên (ARN) tương ứng với các axit amin ở đầu cuối N của hGDF15 trưởng thành được loại bỏ.

Fig.4 thể hiện gel biểu hiện SDS-PAGE được nhuộm bằng comasi, không khử, của các cấu trúc M1 và M2 từ môi trường nuôi cấy dòng tế bào ổn định CHOK1SV GSKO. Dấu hoa thị (*) thể hiện các phân tử bị cắt đứt xảy ra ở M1 trong quá trình tiết từ CHOK1SV. Việc xác định bằng phương pháp LC/MS các vị trí cắt giúp thiết kế được cấu trúc được tăng cường độ ổn định (M2), mà mang một đoạn cắt gồm 3 axit amin (Δ ARN hoặc Δ N3) ở đầu cuối N của hGDF15 trưởng thành.

Fig.5 thể hiện hai phân tử dung hợp với trình tự axit amin của albumin huyết thanh của người (D25-L609) có trình tự tín hiệu IgK (chữ thường) được dung hợp với đầu cuối N của trình tự axit amin của GDF15 trưởng thành của người (in đậm) nhờ một trình tự liên kết [(G₄S)]₅ không phân cắt được (được gạch chân). Cấu trúc M3 (IgK-HSA-[(G₄S)]₅- Δ N3-hGDF15) mang một đoạn cắt gồm 3 axit amin (Δ ARN) ở đầu cuối N của hGDF15 trưởng thành; trong đó cấu trúc M4 (IgK-HSA-[(G₄S)]₅- Δ N6-hGDF15) mang một đoạn cắt gồm 6 axit amin (Δ ARNGDH) tương ứng với đầu cuối N của hGDF15 trưởng thành.

Fig.6 thể hiện tác dụng lên sự hấp thu thức ăn ở chuột bị béo phì do chế độ ăn (Diet-induced obese-DIO) sau khi sử dụng một liều đơn cấp tính dưới da chất dẫn, các phân tử protein dung hợp M1, M3 và M4 (40 nmol/kg). Như nêu trong hình vẽ, các thông số hấp thu thức ăn được xác định ở thời điểm 24 giờ sau khi dùng liều và 7 ngày sau khi dùng liều. Ở mỗi nhóm chuột, $n=8$ và các giá trị p (*, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$) được xác định bằng kiểm định T hai nhóm độc lập so sánh các nhóm dùng liều khác nhau với nhóm đối chứng dùng chất dẫn ở mỗi thời điểm cụ thể.

Fig.7 thể hiện tác dụng lên thể trọng ở chuột DIO sau khi sử dụng một liều đơn cấp tính dưới da chất dẫn, các phân tử dung hợp M1, M3 và M4 (40nmol/kg). Như được nêu trong hình vẽ này, các thông số thể trọng được xác định ở thời điểm 24 giờ sau khi dùng liều và 7 ngày sau khi dùng liều so với thể trọng của nhóm trước khi dùng liều. Ở mỗi nhóm chuột, $n=8$ và các giá trị p (*, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$) được xác định bằng kiểm định T hai nhóm độc lập so sánh các nhóm dùng các liều khác nhau với nhóm đối chứng dùng chất dẫn ở mỗi thời điểm xác định.

Fig.8A thể hiện các trình tự axit amin của các protein đột biến được mono-glycosyl hóa và di-glycosyl hóa được tổng hợp bằng cách glycosyl hóa được liên kết với N ở các vị trí liên ứng (M5-M21). Các trình tự này bao gồm trình tự tín hiệu IgK (chữ thường) được dung hợp với đầu cuối N của trình tự axit amin GDF15 trưởng thành của người (in đậm). Fig.8B thể hiện các trình tự axit nucleic mã hóa các trình tự axit amin được thể hiện trong Fig.8A. Fig.8C thể hiện trình tự axit amin của $\Delta N3$ -M16 và trình tự axit nucleic mã hóa $\Delta N3$ -M16. Fig.8D thể hiện trình tự axit amin của trình tự axit amin GDF15 trưởng thành WT của người chứa trình tự tín hiệu IgK (IgK-GDF15-WT) và trình tự axit nucleic mã hóa IgK-GDF15-WT.

Fig.9 thể hiện tóm tắt quy trình tiết và tổng hợp dime, cùng với sự cải thiện độ hòa tan tương đối, đối với mỗi protein đột biến GDF15 của người được N-glycosyl hóa được thao tác di truyền nêu trong Fig.8A và đối với $\Delta N3$ -M16.

Fig.10 thể hiện tác dụng lên sự hấp thu thức ăn ở chuột béo phì do chế độ ăn (Diet-induced obese-DIO) sau khi dùng một liều đơn dưới da chất dẫn (PBS), các polypeptit GDF15, M16, $\Delta N3$ -M16 và M17 (1mg/kg (40 nmol/Kg)).

Fig.11 thể hiện tác dụng lên thể trọng ở chuột DIO sau khi sử dụng một liều đơn dưới da chất dẫn (PBS), các polypeptit GDF15, M16, $\Delta N3$ -M16 và M17 (1mg/kg (40 nmol/Kg)).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế được mô tả tiếp, cần hiểu rằng phần mô tả này không bị giới hạn ở các phương án cụ thể nêu ở đây, và cũng cần hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không được dự định là làm giới hạn sáng chế.

Nếu một khoảng giá trị được đề xuất, thì cần hiểu rằng mỗi giá trị nằm giữa khoảng này, đến một phần mười đơn vị của giới hạn dưới trừ khi được quy định khác rõ ràng, giữa giới hạn trên và giới hạn dưới của khoảng đó và giá trị được nêu khác hoặc nằm giữa khoảng đã nêu, được bao gồm bởi sáng chế. Các giới hạn trên và giới hạn dưới của các khoảng nhỏ hơn này có thể độc lập được bao gồm trong các khoảng nhỏ hơn, và cũng được bao gồm trong sáng chế, tùy theo giới hạn được loại trừ cụ thể bất kỳ trong khoảng được nêu. Nếu khoảng đã nêu bao gồm một hoặc hai giới hạn, thì các khoảng không bao gồm một trong hai hoặc cả hai giới hạn được bao gồm này cũng được bao gồm trong sáng chế. Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa giống như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Cũng phải lưu ý rằng như được sử dụng ở đây và trong yêu cầu bảo hộ đi kèm, các dạng số ít bao gồm cả nghĩa số nhiều trừ khi có quy định khác rõ ràng. Do đó, ví dụ, đối với thuật ngữ “polypeptit đột biến” bao gồm một hoặc nhiều polypeptit đột biến, và v.v.. Cũng lưu ý thêm rằng yêu cầu bảo hộ có thể được soạn để loại trừ yếu tố tùy ý bất kỳ. Vì vậy, câu này được dự định là dùng làm cơ sở tiền đề để sử dụng trước thuật ngữ độc nhất như “duy nhất,” “chỉ” và thuật ngữ tương tự có liên quan đến việc viện dẫn các yếu tố trong yêu cầu bảo hộ, hoặc sử dụng giới hạn âm.

Các công bố được bàn luận ở đây chỉ được đề xuất cho phần mô tả trước ngày nộp đơn sáng chế. Không có công bố nào ở đây được hiểu là thừa nhận rằng sáng chế không được phép đề lùi ngày công bố này vì phát minh trước. Ngoài ra, các ngày công bố được đề xuất có thể khác ngày công bố thực sự mà có thể cần được khẳng định riêng.

Định nghĩa

Thuật ngữ “bệnh nhân” hoặc “đối tượng” được sử dụng thay thế cho nhau ở đây được dùng để chỉ người hoặc động vật không phải người (ví dụ, động vật có vú).

Thuật ngữ “điều trị”, “việc điều trị”, “phương pháp điều trị” và thuật ngữ tương tự được dùng để chỉ khoảng thời gian tác dụng (khi sử dụng một chất, ví dụ polypeptit hoặc dược phẩm chứa polypeptit) bắt đầu sau khi bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh, hoặc triệu chứng của chúng được chẩn đoán, theo dõi và tương tự để loại trừ, làm giảm, ức chế, làm giảm bớt hoặc làm thuyên giảm, tạm thời hoặc hoàn toàn, ít nhất một trong số các nguyên nhân cơ bản của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh làm đau đối tượng, hoặc ít nhất một trong số các triệu chứng có liên quan đến bệnh, rối loạn, tình trạng bệnh làm đau đối tượng. Do đó, việc điều trị bao gồm ức chế (tức là, chặn sự phát triển hoặc phát triển thêm của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh hoặc các triệu chứng lâm sàng có liên quan) bệnh hoạt động (ví dụ, để làm giảm lượng insulin và/hoặc glucoza trong máu, để tăng khả năng dung nạp glucoza sao cho giảm thiểu sự dao động lượng glucoza, và/hoặc sao cho bảo vệ chống lại bệnh do sự phá vỡ sự cân bằng glucoza gây ra).

Thuật ngữ “cần được điều trị” như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ sự phán đoán của thầy thuốc hoặc điều dưỡng viên khác mà đối tượng cần hoặc sẽ có lợi từ phương pháp điều trị. Sự phán đoán được đưa ra dựa trên nhiều yếu tố mà thuộc lĩnh vực chuyên môn của thầy thuốc hoặc điều dưỡng viên.

Thuật ngữ “phòng ngừa”, “việc phòng ngừa”, “sự phòng ngừa” và thuật ngữ tương tự được dùng để chỉ thời gian tác dụng (khi sử dụng một chất, ví dụ, polypeptit hoặc dược phẩm chứa polypeptit) được bắt đầu theo cách (ví dụ, trước khi khởi phát bệnh, rối loạn, tình trạng bệnh hoặc triệu chứng của nó) để phòng ngừa, ngăn chặn, ức chế hoặc làm giảm, tạm thời hoặc hoàn toàn, nguy cơ phát triển bệnh, rối loạn, tình trạng bệnh hoặc tình trạng tương tự ở đối tượng (như được xác định bởi, ví dụ, không còn các triệu chứng lâm sàng) hoặc trì hoãn sự khởi phát bệnh, thường trong trường hợp đối tượng mắc một bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể. Trong các trường hợp nhất định, thuật ngữ này cũng được dùng để chỉ việc làm chậm sự tiến triển bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh hoặc ức chế sự tiến triển của bệnh sang trạng thái nguy hại hay nói cách khác trạng thái không mong muốn.

Thuật ngữ “cần phòng ngừa” như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ sự phán đoán của thầy thuốc hoặc điều dưỡng viên khác mà đối tượng cần hoặc sẽ có lợi từ việc chăm sóc phòng ngừa. Sự phán đoán này được đưa ra dựa trên nhiều yếu tố thuộc lĩnh vực chuyên môn của thầy thuốc hoặc điều dưỡng viên.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu để điều trị” được dùng để chỉ việc cho đối tượng sử dụng một chất, một mình hoặc dưới dạng một phần của dược phẩm và ở dạng liều đơn hoặc ở dạng một phần của dãy liều, với lượng có thể có tác dụng dễ nhận thấy, tích cực đến triệu chứng, khía cạnh hoặc các đặc điểm bất kỳ của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh nếu được sử dụng cho bệnh nhân. Lượng hữu hiệu để điều trị có thể được xác định bằng cách đánh giá các tác dụng sinh lý có liên quan. Ví dụ, trong trường hợp tình trạng tăng đường huyết, thử nghiệm về cải thiện khả năng dung nạp glucoza hoặc giảm hoặc hạ glucoza huyết có thể được sử dụng để xác định liệu lượng chất dùng điều trị có hữu hiệu để điều trị tình trạng tăng đường huyết hay không. Ví dụ, lượng hữu hiệu để điều trị là lượng đủ để làm giảm hoặc hạ lượng (ví dụ, mức cơ sở) glucoza trong huyết tương lúc đói (fasting plasma glucoza-FPG), trong đó, ví dụ, lượng này đủ để làm giảm lượng FPG lớn hơn 200mg/dl xuống dưới 200mg/dl, trong đó lượng này là đủ để làm giảm lượng FPG nằm trong khoảng từ 175mg/dl đến 200mg/dl xuống dưới mức ban đầu, trong đó lượng này đủ để làm giảm lượng FPG nằm trong khoảng từ 150mg/dl đến 175mg/dl xuống dưới mức ban đầu, trong đó lượng này đủ để làm giảm lượng FPG nằm trong khoảng từ 125mg/dl đến 150mg/dl xuống dưới mức ban đầu, và v.v. (ví dụ, làm giảm lượng FPG xuống dưới 125mg/dl, xuống dưới 120mg/dl, xuống dưới 115mg/dl, xuống dưới 110mg/dl, v.v.). Trong trường hợp lượng HbA1c, lượng hữu hiệu này là lượng đủ để làm giảm hoặc hạ từ hơn 10% xuống 9%, từ hơn 9% xuống 8%, từ hơn 8% xuống 7%, từ hơn 7% xuống 6%, từ hơn 6% xuống 5%, và v.v.. Cụ thể hơn là, giảm hoặc hạ 0,1%, 0,25%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,5%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50%, hoặc nhiều hơn lượng HbA1c được đề xuất theo sáng chế. Lượng hữu hiệu để điều trị có thể được điều chỉnh theo phác đồ dùng liều và phân tích chẩn đoán tình trạng bệnh của đối tượng và tình trạng tương tự.

Thuật ngữ “với lượng đủ để đem lại sự thay đổi” có nghĩa là sự chênh lệch có thể nhận ra giữa lượng chất chỉ thị được đo trước (ví dụ, lượng cơ sở) và sau khi dùng liệu pháp cụ thể. Chất chỉ thị bao gồm thông số khách quan (ví dụ, lượng glucoza hoặc insulin hoặc sự hấp thu thức ăn) hoặc thông số chủ quan (ví dụ, cảm giác khỏe mạnh hoặc thèm ăn của đối tượng).

Thuật ngữ “khả năng dung nạp glucoza”, như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ khả năng kiểm soát lượng glucoza trong huyết tương và/hoặc insulin trong huyết

tương của đối tượng khi khả năng hấp thu glucoza thay đổi bất thường. Ví dụ, khả năng dung nạp glucoza bao gồm khả năng làm giảm lượng glucoza trong huyết tương của đối tượng trở lại mức được xác định trước khi hấp thu glucoza, trong thời gian 120 phút.

Thuật ngữ “bệnh tiểu đường” và “thuộc bệnh tiểu đường” được dùng để chỉ bệnh chuyển hóa carbohydrat tiến triển có liên quan đến việc tổng hợp hoặc sử dụng insulin không đủ, thường được đặc trưng bởi tăng đường huyết và glucoza niệu. Thuật ngữ “tiền tiểu đường” và “thuộc tiền tiểu đường” được dùng để chỉ tình trạng trong đó đối tượng không có các đặc điểm, triệu chứng và dấu hiệu tương tự thường thấy ở bệnh tiểu đường, nhưng có các đặc điểm, triệu chứng và dấu hiệu tương tự mà nếu không được điều trị, có thể tiến triển thành bệnh tiểu đường. Các tình trạng bệnh này có thể được xác định bằng cách sử dụng, ví dụ, xét nghiệm glucoza trong huyết tương lúc đói (FPG) hoặc xét nghiệm khả năng dung nạp glucoza qua đường miệng (oral glucoza tolerance test – OGTT). Cả hai xét nghiệm này đều yêu cầu đối tượng phải nhịn đói trong ít nhất 8 giờ trước khi bắt đầu xét nghiệm. Trong xét nghiệm FPG, lượng glucoza huyết của đối tượng được đo sau khi nhịn đói; thông thường, đối tượng nhịn đói qua đêm và glucoza huyết được đo vào buổi sáng trước khi đối tượng ăn. Một đối tượng khỏe mạnh thường có nồng độ FPG nằm trong khoảng từ 90mg/dl đến 100mg/dl, một đối tượng mắc “chứng tiền tiểu đường” thường có nồng độ FPG nằm trong khoảng từ 100mg/dl đến 125mg/dl, và một đối tượng bị “bệnh tiểu đường” thường có lượng FPG cao hơn 126mg/dl. Trong xét nghiệm OGTT, glucoza huyết của đối tượng được đo sau khi nhịn đói và đo lại hai giờ sau khi uống đồ uống giàu glucoza. Hai giờ sau khi uống đồ uống giàu glucoza, một người khỏe mạnh thường có nồng độ glucoza huyết thấp hơn 140mg/dl, một đối tượng mắc chứng tiền tiểu đường thường có nồng độ glucoza huyết nằm trong khoảng từ 140mg/dl đến 199mg/dl, và một đối tượng mắc bệnh tiểu đường thường có nồng độ glucoza huyết bằng khoảng 200mg/dl hoặc cao hơn. Trong khi các giá trị glucoza huyết nêu trên thuộc về các đối tượng người, thì glucoza huyết bình thường, tăng glucoza huyết vừa phải và tăng glucoza huyết hiển nhiên được chia theo mức khác ở các đối tượng chuột. Một con chuột khỏe mạnh sau khi nhịn đói bốn giờ thường có nồng độ FPG nằm trong khoảng từ 100mg/dl đến 150mg/dl, một con chuột bị “chứng tiền tiểu đường” thường có nồng độ FPG nằm trong khoảng từ 175mg/dl đến 250mg/dl và một con chuột bị “bệnh tiểu đường” thường có nồng độ FPG cao hơn 250mg/dl.

Thuật ngữ “kháng insulin” như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ tình trạng bệnh mà lượng insulin bình thường không thể tạo ra đáp ứng phân tử hoặc sinh lý bình thường. Trong một vài trường hợp, lượng insulin sinh lý cực cao, được tổng hợp nội sinh hoặc được dùng ngoại sinh, có thể giải quyết được tình trạng kháng insulin, hoàn toàn hoặc một phần, và tạo ra đáp ứng sinh học.

Thuật ngữ “hội chứng chuyển hóa” được dùng để chỉ một nhóm đặc điểm có liên quan bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tăng insulin huyết, dung nạp glucoza bất thường, béo phì, phân bố lại mỡ đến bộ phận cơ thể phía trên hoặc khoang bụng, huyết áp cao, rối loạn tiêu sợi huyết, và rối loạn lipid huyết được đặc trưng bởi triglycerit cao, lipoprotein tỷ trọng cao (HDL)-cholesterol thấp, và lượng các hạt lipoprotein tỷ trọng thấp đậm đặc nhỏ (low density lipoprotein-LDL) cao. Các đối tượng mắc hội chứng chuyển hóa có nguy cơ phát triển bệnh tiểu đường typ 2 và/hoặc các rối loạn khác (ví dụ, bệnh xơ vữa động mạch).

Thuật ngữ “rối loạn chuyển hóa glucoza” bao gồm rối loạn bất kỳ được đặc trưng bởi một triệu chứng lâm sàng hoặc một tổ hợp nhiều triệu chứng lâm sàng có liên quan đến lượng glucoza tăng và/hoặc lượng insulin tăng ở một đối tượng so với một người khỏe mạnh. Lượng glucoza và/hoặc insulin tăng có thể thấy ở các bệnh, các rối loạn và các tình trạng bệnh sau: tăng glucoza huyết, bệnh tiểu đường typ II, bệnh tiểu đường thai kỳ, bệnh tiểu đường typ I, kháng insulin, khả năng dung nạp glucoza suy giảm, tăng insulin huyết, khả năng chuyển hóa glucoza suy giảm, tiền tiểu đường, các rối loạn chuyển hóa khác (như hội chứng chuyển hóa, mà cũng được dùng để chỉ hội chứng X), và bệnh béo phì, trong số các bệnh khác. Polypeptit theo sáng chế, và được phẩm chứa chúng, có thể được sử dụng, ví dụ, để đạt được và/hoặc duy trì sự cân bằng glucoza nội mô, ví dụ, để làm giảm lượng glucoza trong máu và/hoặc để làm giảm lượng insulin đến khoảng thường thấy ở đối tượng khỏe mạnh.

Thuật ngữ “tăng glucoza huyết”, như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ tình trạng bệnh trong đó lượng glucoza tuần hoàn trong máu của một đối tượng tăng so với đối tượng khỏe mạnh. Tăng glucoza huyết có thể được chẩn đoán bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm đo lượng glucoza trong máu khi đói như được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “tăng insulin huyết”, như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ tình trạng bệnh trong đó lượng insulin tuần hoàn tăng khi, đồng thời với, lượng glucoza

huyết tăng hoặc bình thường. Tăng insulin huyết có thể là do tình trạng kháng insulin mà có liên quan đến tình trạng rối loạn lipid huyết, như triglyxerit cao, cholesterol cao, lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL) cao và lipoprotein tỷ trọng cao (high-density lipoprotein-HDL) thấp; lượng axit uric cao; hội chứng buồng trứng đa nang; bệnh tiểu đường typ II và béo phì. Tăng insulin huyết có thể được chẩn đoán khi lượng insulin trong huyết tương cao hơn $2 \mu\text{U/mL}$.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “rối loạn thể trọng” được dùng để chỉ tình trạng bệnh có liên quan đến thể trọng quá thừa và/hoặc chứng thèm ăn tăng. Nhiều thông số khác nhau được sử dụng để xác định liệu một đối tượng có thừa cân so với đối tượng khỏe mạnh đối chứng hay không, bao gồm độ tuổi, chiều cao, giới tính và tình trạng sức khỏe của đối tượng. Ví dụ, một đối tượng có thể được coi là thừa cân hoặc béo phì bằng cách đánh giá chỉ số khối cơ thể (Body Mass Index-BMI) của đối tượng này, mà được tính toán bằng cách lấy cân nặng của đối tượng tính theo kilogam chia cho bình phương chiều cao của đối tượng tính theo mét vuông. Một người trưởng thành có chỉ số BMI nằm trong khoảng từ $\sim 18,5\text{kg/m}^2$ đến $\sim 24,9\text{kg/m}^2$ được coi là có cân nặng bình thường; một người trưởng thành có chỉ số BMI nằm trong khoảng từ $\sim 25\text{kg/m}^2$ đến $\sim 29,9\text{kg/m}^2$ có thể được coi là thừa cân (tiền béo phì); và một người trưởng thành có chỉ số BMI bằng $\sim 30\text{kg/m}^2$ hoặc cao hơn có thể được coi là béo phì. Chứng thèm ăn tăng thường dẫn đến thể trọng dư thừa. Một vài tình trạng bệnh có liên quan đến chứng thèm ăn tăng, bao gồm, ví dụ, hội chứng ăn đêm, mà được đặc trưng bởi chứng chán ăn vào buổi sáng và ăn nhiều vào buổi tối thường có liên quan đến chứng mất ngủ, tuy nhiên có thể có liên quan đến tổn thương ở vùng dưới đồi.

Thuật ngữ “các chất hoạt hóa” được dùng để chỉ các chất mà, ví dụ, kích thích, làm tăng, hoạt hóa, tạo điều kiện thuận lợi, tăng cường hoạt hóa, làm nhạy hoặc điều hòa tăng chức năng hoặc hoạt tính của một hoặc nhiều chất, ví dụ, polypeptit được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn chuyển hóa. Ngoài ra, các chất hoạt hóa bao gồm các chất mà hoạt động thông qua cơ chế hoạt động giống như các polypeptit theo sáng chế (tức là, các chất mà điều biến con đường tín hiệu giống các polypeptit theo cách tương tự với cách của các polypeptit) và có khả năng gây ra đáp ứng sinh học tương đương với (hoặc lớn hơn) so với các polypeptit. Ví dụ về các chất hoạt hóa bao gồm các chất chủ vận như các hợp chất phân tử nhỏ.

Thuật ngữ “các chất điều biến” nói chung được dùng để chỉ các polypeptit theo sáng chế và các chất hoạt hóa.

Thuật ngữ “điều biến”, “sự điều biến” và thuật ngữ tương tự được dùng để chỉ khả năng một chất (ví dụ, chất hoạt hóa) làm tăng chức năng hoặc hoạt tính của một hoặc nhiều polypeptit (hoặc các phân tử axit nucleic mã hóa chúng), trực tiếp hoặc gián tiếp; hoặc khả năng một chất tạo ra tác dụng tương đương với tác dụng của một hoặc nhiều polypeptit.

Thuật ngữ “polypeptit,” “peptit,” và “protein”, được sử dụng thay thế cho nhau ở đây, được dùng để chỉ dạng polyme của axit amin có chiều dài bất kỳ, mà có thể bao gồm axit amin được mã hóa di truyền và không được mã hóa di truyền, axit amin dẫn xuất hoặc được cải biến về mặt hóa học hoặc sinh học, và các polypeptit có khung polypeptit được cải biến. Thuật ngữ này bao gồm các protein dung hợp, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các protein dung hợp có trình tự axit amin khác nguồn gốc, các protein dung hợp có các trình tự dẫn cùng loại và khác nguồn gốc, có hoặc không có các gốc methionin ở đầu cuối N; các protein được gắn đuôi miễn dịch; và dạng tương tự. Theo các phương án cụ thể, thuật ngữ này được dùng để chỉ dạng polyme của axit amin có chiều dài bất kỳ mà bao gồm axit amin được mã hóa di truyền. Theo các phương án cụ thể, thuật ngữ này được dùng để chỉ dạng polyme của axit amin có chiều dài bất kỳ mà bao gồm các axit amin được mã hóa di truyền được dung hợp với một trình tự axit amin khác nguồn gốc. Theo các phương án cụ thể, thuật ngữ này được dùng để chỉ trình tự axit amin có chiều dài gồm 112 axit amin, tùy ý được dung hợp với trình tự khác nguồn gốc. Theo các phương án cụ thể, thích hợp, khi được dùng để chỉ các protein và các phân tử được bộc lộ và được mô tả ở đây, thuật ngữ “polypeptit,” “peptit,” và “protein” được dùng để chỉ polypeptit như được mô tả ở đây.

Cần hiểu rằng bản mô tả này viện dẫn đến axit amin theo ký hiệu một chữ cái hoặc ba chữ cái. Để thuận tiện cho người đọc, ký hiệu một hoặc ba chữ cái của axit amin được thể hiện dưới đây:

G	Glyxin	Gly		P	Prolin	Pro
A	Alanin	Ala		V	Valin	Val
L	Leuxin	Leu		I	Isoleuxin	Ile
M	Methionin	Met		C	Xystein	Cys
F	Phenylalanin	Phe		Y	Tyrosin	Tyr
W	Tryptophan	Trp		H	Histidin	His
K	Lysin	Lys		R	Arginin	Arg
Q	Glutamin	Gln		N	Asparagin	Asn
E	Axit glutamic	Glu		D	Axit Aspartic	Asp
S	Serin	Ser		T	Threonin	Thr

Thuật ngữ “biến thể” được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm các biến thể có nguồn gốc trong tự nhiên (ví dụ, các thể tương đồng và các biến thể alen) và các biến thể không có nguồn gốc trong tự nhiên (ví dụ, được cải biến bằng cách tái tổ hợp). Các biến thể có nguồn gốc trong tự nhiên bao gồm các thể tương đồng, tức là, các axit nucleic và các polypeptit khác nhau về trình tự nucleotit hoặc axit amin, tương ứng, từ loài này đến loài khác. Các biến thể có nguồn gốc trong tự nhiên bao gồm các biến thể alen, tức là, các axit nucleic và các polypeptit khác nhau về trình tự nucleotit hoặc axit amin, tương ứng, từ cá thể này đến cá thể khác trong cùng một loài. Các biến thể không có nguồn gốc trong tự nhiên bao gồm các axit nucleic và các polypeptit mà có sự thay đổi về trình tự nucleotit hoặc axit amin, tương ứng, trong đó sự thay đổi trình tự này là nhân tạo, ví dụ sự thay đổi được tạo ra trong phòng thí nghiệm hoặc nhà máy nhờ sự can thiệp của con người (“bàn tay của con người”).

Thuật ngữ “nguyên thể” hoặc “kiểu đại”, đối với GDF15, được dùng để chỉ GDF15 có nguồn gốc trong tự nhiên, có hoạt tính sinh học, kể cả các biến thể của GDF15 có nguồn gốc trong tự nhiên, có hoạt tính sinh học. Thuật ngữ này bao gồm cả trình tự trưởng thành của GDF15 của người gồm 112 axit amin (SEQ ID NO: 1).

Thuật ngữ “protein đột biến” như được sử dụng ở đây nói chung được dùng để chỉ các protein tái tổ hợp, tức là, polypeptit có sự thay đổi nhân tạo ở trình tự axit amin, ví dụ, sự thay đổi ở trình tự axit amin được tạo ra trong phòng thí nghiệm hoặc nhà máy nhờ sự can thiệp của con người (“bàn tay của con người”). Các polypeptit này thường bị thay thế hoặc mất một hoặc nhiều axit amin và thường thu được từ các gen đã tách dòng mà được gây đột biến ngẫu nhiên hoặc trực tiếp vị trí, hoặc từ các gen tổng hợp hoàn toàn. Do đó, “các protein đột biến GDF15” theo sáng chế bao gồm, ví dụ, các axit

amin thay thế và/hoặc axit amin bị mất (ví dụ, các đoạn cắt ở đầu tận cùng N gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, hoặc 14 axit amin hoặc nhiều hơn) so với polypeptit đối chứng, ví dụ, so với GDF15 trưởng thành của người (SEQ ID NO: 1).

Như được sử dụng ở đây đối với GDF15 nguyên thể của người hoặc protein đột biến GDF15, thuật ngữ “được cải biến”, “sự cải biến” và thuật ngữ tương tự được dùng để chỉ một hoặc nhiều thay đổi mà làm thay đổi đặc tính của GDF15 của người, biến thể GDF15 có nguồn gốc trong tự nhiên, hoặc protein đột biến GDF15, trong đó sự thay đổi này không làm thay đổi trình tự axit amin gốc của GDF15. Đặc tính này bao gồm, ví dụ, độ hòa tan, thời gian bán thải trong hệ tuần hoàn, độ ổn định, độ thanh thải, khả năng miễn dịch hoặc khả năng gây dị ứng, và khả năng sản xuất (ví dụ, chi phí và năng suất). “Cải biến” bao gồm cải biến hóa học cộng hóa trị không làm thay đổi chính trình tự axit amin gốc của polypeptit GDF15 (nguyên thể hoặc protein đột biến). Các thay đổi đối với GDF15 của người, biến thể GDF15 có nguồn gốc trong tự nhiên, hoặc protein đột biến GDF15 mà có thể được tiến hành bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, pegyl hóa (gắn kết cộng hóa trị một hoặc nhiều phân tử polyetylen glycol (PEG), hoặc dẫn xuất của nó); glycosyl hóa (ví dụ, N-glycosyl hóa), polysialyl hóa và hesyl hóa; dung hợp protein liên kết với maltoza; dung hợp albumin (ví dụ, dung hợp HSA); gắn kết với albumin thông qua, ví dụ, một chuỗi axit béo được tiếp hợp (axyl hóa); dung hợp Fc; và dung hợp với phân tử giả PEG. Một vài phương án cụ thể đề xuất các cải biến có liên quan đến polyetylen glycol, các phương án cụ thể khác đề xuất các cải biến có liên quan đến albumin, và các phương án cụ thể khác nữa đề xuất các cải biến có liên quan đến glycosyl hóa, hoặc tổ hợp của chúng.

Các thuật ngữ “ADN”, “axit nucleic”, “phân tử axit nucleic”, “polynucleotit” và thuật ngữ tương tự được sử dụng thay thế cho nhau ở đây được dùng để chỉ dạng polyme của các nucleotit có chiều dài bất kỳ, deoxyribonucleotit hoặc ribonucleotit, hoặc các dạng tương đồng của chúng. Ví dụ không giới hạn về polynucleotit bao gồm các axit nucleic mạch thẳng hoặc mạch vòng, ARN thông tin (mARN), ADN bổ trợ (cADN), polynucleotit tái tổ hợp, vật truyền, mẫu dò, đoạn môi và dạng tương tự.

Thuật ngữ “mẫu dò” được dùng để chỉ đoạn ADN hoặc ARN tương ứng với một gen hoặc trình tự quan tâm, trong đó đoạn này được đánh dấu phóng xạ (ví dụ, bằng cách gắn kết ^{32}P hoặc ^{35}S) hoặc với một vài phân tử để phát hiện khác, như biotin, digoxigenin hoặc fluorescein. Khi duỗi ADN hoặc ARN có các trình tự bổ sung sẽ lai,

mẫu dò có thể được sử dụng, ví dụ, để đánh dấu mảng virus, khuẩn lạc vi khuẩn hoặc vạch trên gel chứa gen quan tâm. Mẫu dò có thể là một ADN đã được tách dòng hoặc có thể là dải ADN tổng hợp; dạng mẫu dò sau có thể được sử dụng để tạo ra cADN hoặc dòng bộ gen từ protein phân lập bằng cách, ví dụ, giải trình tự một lượng nhỏ một phần protein, tạo ra trình tự axit nucleic mã hóa protein, tổng hợp oligonucleotit mang trình tự đó, đánh dấu phóng xạ trình tự này và sử dụng nó làm mẫu dò để sàng lọc thư viện cADN hoặc thư viện bộ gen.

Thuật ngữ “khác nguồn gốc” được dùng để chỉ hai thành phần mà có cấu trúc thu được từ các nguồn khác nhau. Ví dụ, trong trường hợp polypeptit, polypeptit “khác nguồn gốc” có thể bao gồm các trình tự axit amin được liên kết chức năng mà thu được từ các polypeptit khác nhau (ví dụ, thành phần thứ nhất là polypeptit tái tổ hợp và thành phần thứ hai thu được từ polypeptit GDF15 nguyên thể). Tương tự, trong trường hợp polynucleotit mã hóa polypeptit khả năng, polynucleotit “khác nguồn gốc” có thể bao gồm các trình tự axit nucleic được liên kết chức năng thu được từ các gen khác nhau (ví dụ, thành phần thứ nhất thu được từ axit nucleic mã hóa polypeptit theo một phương án được mô tả ở đây và thành phần thứ hai thu được từ axit nucleic mã hóa polypeptit vận chuyển). Các axit nucleic “khác nguồn gốc” khác được lấy làm ví dụ bao gồm các cấu trúc biểu hiện trong đó axit nucleic bao gồm trình tự mã hóa được liên kết chức năng với một yếu tố điều hòa (ví dụ, trình tự khởi đầu) mà có nguồn gốc di truyền khác với nguồn gốc của trình tự mã hóa (ví dụ, để tạo ra sự biểu hiện trong tế bào chủ quan tâm, mà có thể có nguồn gốc di truyền khác so với trình tự khởi đầu, trình tự mã hóa hoặc cả hai trình tự này). Ví dụ, trình tự khởi đầu T7 được liên kết chức năng với một polynucleotit mã hóa polypeptit GDF15 hoặc vùng của nó được cho là axit nucleic khác nguồn gốc. Trong trường hợp tế bào tái tổ hợp, thuật ngữ “khác nguồn gốc” có thể được dùng để chỉ sự có mặt của axit nucleic (hoặc sản phẩm gen, như polypeptit) có nguồn gốc di truyền khác so với tế bào chủ trong đó có mặt nó.

Thuật ngữ “được liên kết chức năng” được dùng để chỉ liên kết giữa các phân tử để tạo ra chức năng mong muốn. Ví dụ, “được liên kết chức năng” trong trường hợp các axit nucleic được dùng để chỉ liên kết chức năng giữa các trình tự axit nucleic. Bằng cách lấy ví dụ, trình tự kiểm soát sự biểu hiện axit nucleic (như trình tự khởi đầu, trình tự tín hiệu, hoặc mảng các vị trí gắn kết với yếu tố phiên mã) có thể được liên kết chức năng với polynucleotit thứ hai, trong đó trình tự kiểm soát sự biểu hiện tác động đến

quá trình phiên mã và/hoặc dịch mã của polynucleotit thứ hai. Trong trường hợp polypeptit, “được liên kết chức năng” được dùng để chỉ liên kết chức năng giữa các trình tự axit amin (ví dụ, các vùng khác nhau) để tạo ra hoạt tính được mô tả của polypeptit.

Các thuật ngữ “đầu cuối N” (hoặc “đầu cuối amino”) và “đầu cuối C” (hoặc “đầu cuối carboxyl”) được sử dụng ở đây trong trường hợp cấu trúc của polypeptit để chỉ các đầu amino và carboxyl xa nhất của polypeptit, tương ứng, trong khi đó thuật ngữ “đầu tận cùng N” và “đầu tận cùng C” được dùng để chỉ các vị trí tương đối trong trình tự axit amin của polypeptit hướng lần lượt về đầu cuối N và đầu cuối C, và có thể bao gồm các gốc ở lần lượt đầu cuối N và đầu cuối C. Các thuật ngữ “ngay đầu tận cùng N” hoặc “ngay đầu tận cùng C” được dùng để chỉ vị trí của gốc axit amin thứ nhất so với gốc axit amin thứ hai, trong đó các gốc axit amin thứ nhất và thứ hai được liên kết cộng hóa trị để tạo ra trình tự axit amin liền kề.

Thuật ngữ “thu được từ”, trong trường hợp trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit (ví dụ, trình tự axit amin “thu được từ” polypeptit GDF15), có nghĩa là polypeptit hoặc axit nucleic có trình tự dựa trên trình tự của polypeptit hoặc axit nucleic viện dẫn (ví dụ, polypeptit GDF15 có nguồn gốc trong tự nhiên hoặc axit nucleic mã hóa GDF15), và không có nghĩa là giới hạn ở nguồn hoặc phương pháp mà protein hoặc axit nucleic được tạo ra. Bằng cách ví dụ, thuật ngữ “thu được từ” bao gồm các dạng tương đồng hoặc biến thể của các trình tự axit amin hoặc ADN viện dẫn.

Trong trường hợp polypeptit, thuật ngữ “được phân lập” được dùng để chỉ polypeptit quan tâm, nếu có nguồn gốc trong tự nhiên, là ở trong môi trường khác với môi trường mà trong đó nó có nguồn gốc tự nhiên. Thuật ngữ “phân lập” được hiểu là bao gồm các polypeptit mà trong các mẫu được làm giàu đáng kể polypeptit quan tâm và/hoặc trong đó polypeptit quan tâm được tinh chế một phần hoặc đáng kể. Nếu polypeptit không có nguồn gốc trong tự nhiên, thì thuật ngữ “phân lập” chỉ polypeptit đã được tách ra từ môi trường trong đó nó được tạo ra bằng cách tổng hợp hoặc tái tổ hợp.

Thuật ngữ “được làm giàu” có nghĩa là một mẫu được thao tác theo cách không tự nhiên (ví dụ, trong phòng thí nghiệm, ví dụ, bởi nhà khoa học hoặc nhà lâm sàng) sao cho polypeptit quan tâm có mặt với a) nồng độ lớn hơn (ví dụ, lớn hơn ít nhất 3 lần, lớn hơn ít nhất 4 lần, lớn hơn ít nhất 8 lần, lớn hơn ít nhất 64 lần, hoặc lớn hơn nữa) so

với nồng độ của polypeptit có trong mẫu ban đầu, như mẫu sinh học (ví dụ, mẫu trong đó polypeptit có nguồn gốc trong tự nhiên hoặc trong đó có sau khi sử dụng), hoặc b) nồng độ lớn hơn môi trường mà polypeptit này được tạo ra (ví dụ, như trong tế bào vi khuẩn).

Thuật ngữ “hầu như tinh khiết” được dùng để chỉ một thành phần (ví dụ, polypeptit) chiếm hơn 50% tổng lượng chế phẩm, và thường lớn hơn 60% tổng lượng polypeptit. Thông thường hơn nữa, thuật ngữ “hầu như tinh khiết” được dùng để chỉ chế phẩm trong đó ít nhất 75%, ít nhất 85%, ít nhất 90% hoặc nhiều hơn tổng lượng chế phẩm là thành phần quan tâm. Trong một vài trường hợp, polypeptit sẽ chiếm hơn 90%, hoặc hơn 95% tổng lượng chế phẩm.

Thuật ngữ “kháng thể” (antibody-Ab) và “globulin miễn dịch” (immunoglobulin-Ig) được dùng để chỉ glycoprotein có các đặc điểm cấu trúc như nhau. Trong khi kháng thể có tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên đặc hiệu, thì globulin miễn dịch bao gồm cả kháng thể và các phân tử khác giống kháng thể thiếu tính đặc hiệu với kháng nguyên. Kháng thể được mô tả chi tiết dưới đây.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” được dùng để chỉ kháng thể thu được từ một quần thể kháng thể hầu như tương đồng, tức là, mỗi kháng thể bao gồm trong quần thể là giống nhau ngoại trừ các đột biến có nguồn gốc trong tự nhiên có thể có với lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao, trực tiếp nhằm vào một vị trí kháng nguyên. Ngược lại, các chế phẩm kháng thể đa dòng, có thể bao gồm các kháng thể khác nhau trực tiếp nhằm vào các quyết định kháng nguyên khác nhau (epitop), mỗi kháng thể đơn dòng nhằm vào một quyết định trên kháng nguyên.

Trong phạm vi kháng thể, thuật ngữ “phân lập” được dùng để chỉ kháng thể được tách ra và/hoặc được thu hồi từ các tạp chất trong môi trường tự nhiên của nó; các tạp chất này bao gồm các nguyên liệu có thể gây trở ngại cho việc sử dụng kháng thể này để chẩn đoán hoặc điều trị, và có thể bao gồm các enzym, các hormone, và các chất hòa tan có protein hoặc không có protein khác.

Thuật ngữ “thay thế axit amin bảo toàn” được dùng để chỉ việc thay thế các gốc axit amin trong các nhóm sau: 1) L, I, M, V, F; 2) R, K; 3) F, Y, H, W, R; 4) G, A, T, S; 5) Q, N; và 6) D, E. Thay thế axit amin bảo toàn có thể bảo toàn hoạt tính của protein bằng cách thay thế (các) axit amin trong protein này bằng axit amin với mạch bên có tính axit, tính bazơ, điện tích, độ phân cực hoặc kích thước của mạch bên tương tự.

Định hướng thay thế, thêm, hoặc loại bỏ có thể được dựa trên việc sắp thẳng hàng các trình tự axit amin của các protein biến thể khác nhau hoặc các protein từ các loài khác nhau.

Yếu tố biệt hóa tăng trưởng 15 (GDF15)

GDF15, cũng được biết đến là MIC-1 (xytokin ức chế đại thực bào-1), PDF (yếu tố biệt hóa tuyến tiền liệt), PLAB (protein tạo hình thể xương ở nhau thai), NAG-1 (gen hoạt hóa thuốc chống viêm không steroid (non-steroidal anti-inflammatory drug-NSAID)), TGF-PL, và PTGFB, là một thành viên thuộc siêu họ yếu tố tăng trưởng biến đổi β (transforming growth factor β -TGF- β). GDF15, được tổng hợp ở dạng tiền protein nội bào có kích thước 62kDa mà sau đó được phân cắt bằng proteaza giống furin, được tiết ra ở dạng protein được liên kết bằng liên kết disulfua có kích thước 25kDa. [Ví dụ, xem tài liệu, Fairlie *et al.*, J. Leukoc. Biol 65:2-5 (1999)]. mARN GDF15 được phát hiện thấy ở một vài mô, bao gồm gan, thận, tụy, ruột kết và nhau thai, và sự biểu hiện GDF15 ở gan có thể được điều hòa tăng đáng kể khi các cơ quan như gan, thận, tim và phổi bị tổn thương.

Tiền GDF15 là một polypeptit 308 axit amin (NCBI Ref. Seq.NP_004855.2) bao gồm một peptit tín hiệu gồm 29 axit amin, một tiền vùng chức năng gồm 167 axit amin, và vùng trưởng thành gồm 112 axit amin được cắt ra từ tiền vùng chức năng bởi proteaza giống furin. Polypeptit GDF15 gồm 308 axit amin được dùng để chỉ polypeptit GDF15 “có chiều dài đầy đủ”; polypeptit GDF15 gồm 112 axit amin (axit amin 197 đến 308 của GDF15 “có chiều dài đầy đủ”) là một polypeptit GDF15 “trưởng thành” (SEQ ID NO: 1). Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “GDF15” được dùng để chỉ trình tự trưởng thành của người gồm 112 axit amin. Ngoài ra, các số chỉ dẫn của các gốc GDF15 cụ thể được dùng để chỉ trình tự trưởng thành gồm 112 axit amin (tức là, gốc 1 là Ala (A), và gốc 112 là Ile (I); xem SEQ ID NO: 1). Lưu ý là, mặc dù tiền trình tự axit amin của GDF15 dự báo ba vị trí cắt, tạo ra ba dạng giả định của GDF15 “trưởng thành” của người (tức là, 110, 112 và 115 axit amin), thì trình tự trưởng thành gồm 112 axit amin được chấp nhận là đúng.

Sáng chế mô tả các gen trực giao của GDF15, và các dạng cải biến của chúng, từ loài động vật có vú khác, và việc sử dụng chúng, bao gồm chuột (NP_035949), tinh tinh (XP_524157), đười ươi (XP_002828972), khỉ Rhesus (EHH29815), gấu trúc khổng

lò (XP_002912774), vượn (XP_003275874), chuột lang (XP_003465238), chồn sương (AER98997), bò (NP_001193227), lợn (NP_001167527), chó (XP_541938) và thú mỏ vịt (*Ornithorhynchus anatinus*; AFV61279). Dạng trưởng thành của GDF15 của người có gần 67% axit amin tương đồng với gen trực giao của chuột.

Để thuận tiện, các phân tử GDF15 của người đã biến đổi, các biến thể GDF15 (ví dụ, các protein đột biến), và các protein đột biến GDF15 đã biến đổi được mô tả từ đây trở đi nói chung được dùng để chỉ “(các) polypeptit”. Cần lưu ý rằng bất kỳ một viện dẫn “người” đối với các polypeptit và phân tử axit nucleic theo sáng chế không có nghĩa là giới hạn ở cách hoặc nguồn mà polypeptit hoặc axit nucleic thu được, mà còn chỉ trình tự tương ứng với trình tự của polypeptit hoặc phân tử axit nucleic của người có nguồn gốc trong tự nhiên. Theo các phương án cụ thể, các phân tử GDF15 của người đã biến đổi là các dime được N-glycosyl hóa. Theo các phương án cụ thể, các phân tử GDF15 của người đã biến đổi là các đồng dime được N-glycosyl hóa. Ngoài các polypeptit của người và các phân tử axit nucleic mã hóa chúng, sáng chế đề xuất các polypeptit có liên quan đến GDF15 và các phân tử axit nucleic tương ứng từ các loài khác.

A. Các polypeptit có các đặc tính vật lý mong muốn

Sáng chế đề xuất, một phần, các polypeptit mà bao gồm trình tự axit amin liên kế ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 (GDF15 trưởng thành của người có chiều dài 112 axit amin). Các polypeptit này có thể bao gồm một hoặc nhiều axit amin thay thế và/hoặc mất so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Theo các phương án nhất định, ngoài các axit amin thay thế, polypeptit theo sáng chế cũng có thể bao gồm các axit amin bị mất so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Theo một vài phương án, polypeptit theo sáng chế có thể bao gồm các axit amin bị mất so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Để thuận tiện và rõ ràng, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được sử dụng làm trình tự viện dẫn cho các polypeptit nêu ở đây. Do đó, các vị trí gốc axit amin được đánh số ở đây có viện dẫn đến SEQ ID NO: 1. Trình tự SEQ ID NO: 1 được thể hiện dưới đây:

```
ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAP
CCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLAKDCHCI
```

Theo một vài phương án, polypeptit theo sáng chế có thể bao gồm một, hai, ba hoặc nhiều axit amin thay thế, thêm hoặc mất ở một hoặc nhiều vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N ở vùng mà vị trí này không có trong SEQ ID NO: 1. Vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N bao gồm trình tự NXS/T, trong đó N là Asn; X là một axit amin ngoại trừ prolin; sau đó là Ser (S) hoặc Thr (T).

Ví dụ về polypeptit theo sáng chế bao gồm các polypeptit có một, hai, ba, bốn hoặc nhiều vị trí liên ứng glycosyl hóa (ví dụ, các vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N) ở vị trí axit amin mà vị trí này không có trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo các phương án nhất định, polypeptit này có thể bao gồm một axit amin thay thế so với SEQ ID NO: 1 mà tạo ra một vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N ở vị trí thay thế (ví dụ, trình tự NGD trong SEQ ID NO: 1 có thể được biến đổi thành NGT/S bởi một axit amin thay thế; vị trí thay thế được gạch chân). Trong các trường hợp khác, polypeptit này có thể bao gồm hai axit amin thay thế so với SEQ ID NO: 1 mà tạo ra một vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N ở vị trí thay thế (ví dụ, trình tự KTD trong SEQ ID NO: 1 có thể được biến đổi thành NTT/S nhờ thay thế hai axit amin; các vị trí thay thế được gạch chân). Theo một vài phương án, polypeptit này có thể bao gồm ba axit amin thay thế so với SEQ ID NO: 1 mà tạo ra một vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N ở vị trí thay thế (ví dụ, trình tự GPG trong SEQ ID NO: 1 có thể được biến đổi thành NTT/S nhờ thay thế ba axit amin; vị trí thay thế được gạch chân).

Theo các phương án nhất định, polypeptit này có thể bao gồm một hoặc nhiều axit amin bị mất so với SEQ ID NO: 1 mà tạo ra vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N ở vị trí bị mất. Ví dụ, trình tự NGDHCPLGPGRCCRLHT trong SEQ ID NO: 1 có thể được biến đổi bằng cách loại bỏ axit amin D đến H (được gạch chân)) do đó tạo ra vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N: NGT.

Theo các phương án nhất định, polypeptit này có thể bao gồm một hoặc nhiều axit amin thêm so với SEQ ID NO: 1 mà tạo ra vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N ở (các) chỗ thêm. Ví dụ về việc tạo ra vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N bằng cách thêm một axit amin bao gồm bổ sung N vào trình tự LHT trong SEQ ID NO: 1, nhờ đó tạo ra trình tự LNHT, trong đó NHT là vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N.

Như nêu trên, polypeptit này có thể bao gồm một hoặc nhiều axit amin thay thế so với SEQ ID NO: 1 và các axit amin thay thế này có thể được đánh số như vị trí của axit amin tương ứng trong SEQ ID NO: 1.

Theo các phương án nhất định, polypeptit này có thể bao gồm trình tự axit amin liền kề mà ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó trình tự axit amin liền kề có ít nhất một trong số các cặp thay thế sau so với axit amin tương ứng trong SEQ ID NO: 1:

- i) D5T và R21N hoặc D5S và R21N;
- ii) R16N và H18T hoặc R16N và H18S;
- iii) S23N và E25T hoặc S23N và E25S;
- iv) L24N và D26T hoặc L24N và D26S;
- v) S50N và F52T; S50N và F52S; F52N và A54T; hoặc F52N và A54S;
- vi) Q51N và R53T; Q51N và R53S; R53N và A55T; hoặc R53N và A55S;
- vi) S64N và H66T hoặc S64N và H66S;
- vii) L65N và R67T hoặc L65N và R67S;
- viii) S82N và N84T hoặc S82N và N84S;
- ix) K91N và D93T; K91N và D93S; D93N và G95T; hoặc D93N và G95S;
- x) T94N và V96T; T94N và V96S; V96N và L98T; hoặc V96N và L98S;
- xi) S97N và Q99T hoặc S97N và Q99S; và
- xii) A106N và D108T hoặc A106N và D108S.

Ví dụ, các axit amin thay thế ở mục i) trên đây, có nghĩa là polypeptit có threonin (T) hoặc serin (S) ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin số 5 trong SEQ ID NO:1, trong đó trong SEQ ID NO: 1 asparat (D) có mặt ở vị trí axit amin số 5. Việc thay thế D ở vị trí 5 bằng T hoặc S có thể được ký hiệu là D5T/S. Vị trí của axit amin tương ứng trong một polypeptit so với SEQ ID NO: 1 có thể được xác định bằng cách sắp thẳng hàng các trình tự axit amin.

Theo các phương án nhất định, polypeptit này có thể bao gồm hai axit amin thay thế (một cặp axit amin thay thế) mà tạo ra một trình tự liên ứng N-glycosyl hóa ở một vị trí mà trình tự liên ứng N-glycosyl hóa không có mặt trong SEQ ID NO: 1. Ví dụ về các axit amin thay thế này bao gồm R16N và H18T/S; K91N và D93T/S; T94N và V96T/S; và các axit amin thay thế khác nêu trên. R16N và H18T/S có nghĩa là polypeptit có N ở vị trí tương ứng với vị trí 16 nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó ở

SEQ ID NO: 1 R có mặt và polypeptit có T hoặc S ở vị trí tương ứng với vị trí 18 trong SEQ ID NO: 1, trong đó H là có mặt. Vì trình tự RXH (ở vị trí 16 đến 18) trong SEQ ID NO: 1 không bao gồm gốc bất kỳ cho trình tự liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N, nên cặp axit amin thay thế sẽ tạo ra trình tự liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N.

Theo các phương án khác, thay thế một axit amin đủ để tạo ra trình tự liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N, ví dụ, vì trình tự NGD (ở vị trí 3 đến 5) có mặt trong SEQ ID NO: 1, nên việc thay thế đơn D bằng T hoặc S tạo ra trình tự NGT hoặc NGS, tương ứng, đều là trình tự liên ứng N-glycosyl hóa.

Trong các trường hợp nhất định, nhiều hơn một trình tự liên ứng N-glycosyl hóa được đưa vào GDF15 kiểu đại. Ví dụ, trình tự axit amin của GDF15 kiểu đại có thể được cải biến bằng cách thay thế và/hoặc loại bỏ để tạo ra một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn bốn trình tự liên ứng N-glycosyl hóa. Theo các phương án nhất định, polypeptit có thể bao gồm 112 axit amin liên kề có mức tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với trình tự 112 axit amin của SEQ ID NO: 1, trong đó 112 axit amin liên kề bao gồm một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn bốn trình tự liên ứng N-glycosyl hóa, như, 1 đến 12, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 4, 1 đến 3, hoặc 1 đến 2 trình tự liên ứng N-glycosyl hóa.

Ví dụ về polypeptit có hai trình tự liên ứng N-glycosyl hóa bao gồm protein đột biến GDF15 có T/S ở vị trí 5 (so với SEQ ID NO: 1) và N ở vị trí 21 (so với SEQ ID NO: 1).

Polypeptit được lấy làm ví dụ theo sáng chế bao gồm các polypeptit có hai hoặc nhiều trình tự liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N. Ví dụ, polypeptit này có thể bao gồm một tổ hợp gồm hai hoặc nhiều cặp thay thế dưới đây:

- i) D5T và R21N hoặc D5S và R21N;
- ii) R16N và H18T hoặc R16N và H18S;
- iii) S23N và E25T hoặc S23N và E25S;
- iv) L24N và D26T hoặc L24N và D26S;
- v) S50N và F52T; S50N và F52S; F52N và A54T; hoặc F52N và A54S;
- vi) Q51N và R53T; Q51N và R53S; R53N và A55T; hoặc R53N và A55S;
- vii) S64N và H66T; hoặc S64N và H66S;
- viii) L65N và R67T; hoặc L65N và R67S;
- ix) S82N và N84T hoặc S82N và N84S;

- x) K91N và D93T; K91N và D93S; D93N và G95T; hoặc D93N và G95S;
- xi) T94N và V96T; T94N và V96S; V96N và L98T; hoặc V96N và L98S;
- xii) S97N và Q99T; hoặc S97N và Q99S; và
- xiii) A106N và D108T hoặc A106N và D108S.

Theo các phương án nhất định, polypeptit này có thể bao gồm trình tự axit amin liền kề ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó trình tự axit amin liền kề có ít nhất một trong số các cặp thay thế sau so với axit amin tương ứng trong SEQ ID NO: 1:

- i) D5T và R21N hoặc D5S và R21N;
- ii) R16N và H18T hoặc R16N và H18S;
- iii) S23N và E25T hoặc S23N và E25S;
- iv) S50N và F52T; S50N và F52S; F52N và A54T; hoặc F52N và A54S;
- v) Q51N và R53T; Q51N và R53S; R53N và A55T; hoặc R53N và A55S;
- vi) S64N và H66T; hoặc S64N và H66S;
- vii) K91N và D93T; K91N và D93S; D93N và G95T; hoặc D93N và G95S;
- viii) T94N và V96T; T94N và V96S; V96N và L98T; hoặc V96N và L98S;
- ix) S97N và Q99T; hoặc S97N và Q99S; và
- x) A106N và D108T hoặc A106N và D108S;

trong đó sự thay thế này tạo ra một hoặc nhiều vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N có trình tự NXS/T, trong đó N là Asn; X là một axit amin ngoại trừ prolin; sau đó là Ser (S) hoặc Thr (T) và trong đó một hoặc nhiều vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N còn được liên kết với N-glycan. Theo một phương án khác, polypeptit này tạo thành dime. Theo một phương án khác, polypeptit này có các đoạn cắt ở đầu tận cùng N và/hoặc các đoạn cắt ở đầu tận cùng C so với SEQ ID NO: 1. Các đoạn cắt này có thể bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc nhiều hơn 14 axit amin so với polypeptit viện dẫn, ví dụ, SEQ ID NO: 1. Theo một phương án cụ thể, polypeptit này có đoạn cắt gồm ba gốc đầu tiên ở đầu tận cùng N trong GDF15 (Δ ARN hoặc Δ N3). Theo một phương án khác, polypeptit có độ hòa tan là ít nhất 0,5mg/ml, ví dụ, ít nhất 1mg/ml, ít nhất 2mg/ml, ít nhất 3mg/ml, ít nhất 4mg/ml, ít nhất 5mg/ml, ít nhất 8mg/ml, ít nhất 10mg/ml, ít nhất 15mg/ml, ít nhất 20mg/ml, hoặc ít nhất 25mg/ml, ví dụ độ hòa tan nằm trong khoảng từ 0,5mg/ml đến 25mg/ml, từ

0,5mg/ml đến 20mg/ml, từ 1mg/ml đến 25mg/ml, từ 1mg/ml đến 20mg/ml, từ 3mg/ml đến 25mg/ml, từ 3mg/ml đến 20mg/ml, từ 5mg/ml đến 25mg/ml, từ 5mg/ml đến 20mg/ml, hoặc từ 5mg/ml đến 18mg/ml trong dung dịch đệm. Trong các trường hợp nhất định, polypeptit có độ hòa tan là ít nhất 0,5mg/ml, ví dụ, ít nhất 1mg/ml, ít nhất 2mg/ml, ít nhất 3mg/ml, ít nhất 4mg/ml, ít nhất 5mg/ml, ít nhất 8mg/ml, ít nhất 10mg/ml, ít nhất 15mg/ml, ít nhất 20mg/ml, hoặc ít nhất 25mg/ml, ví dụ độ hòa tan nằm trong khoảng từ 0,5mg/ml đến 25mg/ml, từ 0,5mg/ml đến 20mg/ml, từ 1mg/ml đến 25mg/ml, từ 1mg/ml đến 20mg/ml, từ 3mg/ml đến 25mg/ml, từ 3mg/ml đến 20mg/ml, từ 5mg/ml đến 25mg/ml, từ 5mg/ml đến 20mg/ml, hoặc từ 5mg/ml đến 18mg/ml trong dung dịch đệm. Dung dịch đệm này có thể là dung dịch đệm phosphat, dung dịch đệm Tris, dung dịch đệm HEPES, dung dịch đệm MOPS, dung dịch đệm PIPES, hoặc dung dịch đệm tương tự, hoặc hỗn hợp của chúng. Trong các trường hợp nhất định, dung dịch đệm này có thể bao gồm dung dịch nước muối được đệm phosphat. Trong các trường hợp nhất định, dung dịch đệm này có thể bao gồm Tris, kali phosphat và natri clorua. Trong một vài trường hợp, dung dịch đệm này có thể bao gồm Tris, kali phosphat, natri clorua, và axit formic. Ví dụ, dung dịch đệm này có thể bao gồm Tris 10mM đến 100mM pH7, kali phosphat 1mM đến 50mM, natri clorua 100mM đến 200mM, và axit formic 10mS/cm đến 30mS/cm. Theo các phương án khác, polypeptit này làm giảm lượng glucoza trong máu, thể trọng, và/hoặc sự hấp thu thức ăn ít nhất 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% so với trước khi dùng polypeptit.

Theo các phương án nhất định, polypeptit này có thể bao gồm trình tự axit amin liền kề ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó trình tự axit amin liền kề có ít nhất một trong số các cặp thay thế sau so với axit amin tương ứng trong SEQ ID NO: 1:

- i) D5T và R21N;
- ii) S23N và E25T;
- iii) F52N và A54T;
- iv) R53N và A55T;
- v) S64N và H66T;
- vi) K91N và D93T;
- vii) D93N và G95T;

viii) S97N và Q99T; và

ix) A106N và D108T;

trong đó sự thay thế này tạo ra một hoặc nhiều vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N có trình tự NXS/T, trong đó N là Asn; X là một axit amin ngoại trừ prolin; sau đó là Ser (S) hoặc Thr (T) và trong đó một hoặc nhiều vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N còn được liên kết với N-glycan. Theo một phương án khác, polypeptit này tạo thành dime. Theo một phương án khác, polypeptit này có các đoạn cắt ở đầu tận cùng N và/hoặc các đoạn cắt ở đầu tận cùng C so với SEQ ID NO: 1. Các đoạn cắt này có thể bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc nhiều hơn 14 axit amin so với polypeptit viện dẫn, ví dụ, SEQ ID NO: 1. Theo một phương án cụ thể, polypeptit có đoạn cắt gồm ba gốc đầu tiên ở đầu tận cùng N trong GDF15 (Δ ARN hoặc Δ N3). Theo một phương án khác, polypeptit có độ hòa tan là ít nhất 0,5mg/ml, ví dụ, ít nhất 1mg/ml, ít nhất 2mg/ml, ít nhất 3mg/ml, ít nhất 4mg/ml, ít nhất 5mg/ml, ít nhất 8mg/ml, ít nhất 10mg/ml, ít nhất 15mg/ml, ít nhất 20mg/ml, hoặc ít nhất 25mg/ml, ví dụ độ hòa tan nằm trong khoảng từ 0,5mg/ml đến 25mg/ml, từ 0,5mg/ml đến 20mg/ml, từ 1mg/ml đến 25mg/ml, từ 1mg/ml đến 20mg/ml, từ 3mg/ml đến 25mg/ml, từ 3mg/ml đến 20mg/ml, từ 5mg/ml đến 25mg/ml, từ 5mg/ml đến 20mg/ml, hoặc từ 5mg/ml đến 18mg/ml trong dung dịch đệm. Trong các trường hợp nhất định, polypeptit có độ hòa tan là ít nhất 0,5mg/ml, ví dụ, ít nhất 1mg/ml, ít nhất 2mg/ml, ít nhất 3mg/ml, ít nhất 4mg/ml, ít nhất 5mg/ml, ít nhất 8mg/ml, ít nhất 10mg/ml, ít nhất 15mg/ml, ít nhất 20mg/ml, hoặc ít nhất 25mg/ml, ví dụ độ hòa tan nằm trong khoảng từ 0,5mg/ml đến 25mg/ml, từ 0,5mg/ml đến 20mg/ml, từ 1mg/ml đến 25mg/ml, từ 1mg/ml đến 20mg/ml, từ 3mg/ml đến 25mg/ml, từ 3mg/ml đến 20mg/ml, từ 5mg/ml đến 25mg/ml, từ 5mg/ml đến 20mg/ml, hoặc từ 5mg/ml đến 18mg/ml trong dung dịch đệm. Dung dịch đệm này có thể là dung dịch đệm phosphat, dung dịch đệm Tris, dung dịch đệm HEPES, dung dịch đệm MOPS, dung dịch đệm PIPES, hoặc dung dịch đệm tương tự, hoặc hỗn hợp của chúng. Trong các trường hợp nhất định, dung dịch đệm này có thể bao gồm dung dịch nước muối được đệm phosphat. Trong các trường hợp nhất định, dung dịch đệm này có thể bao gồm Tris, kali phosphat và natri clorua. Trong một vài trường hợp, dung dịch đệm này có thể bao gồm Tris, kali phosphat, natri clorua, và axit formic. Ví dụ, dung dịch đệm này có thể bao

gồm Tris 10mM-100mM pH7, kali phosphat 1mM-50mM, natri clorua 100mM-200mM, và axit formic 10mS/cm-30mS/cm. Theo các phương án khác, polypeptit làm giảm lượng glucoza trong máu, thể trọng, và/hoặc sự hấp thu thức ăn ít nhất 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% so với trước khi dùng polypeptit. Theo các phương án cụ thể, polypeptit bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 30. Theo các phương án cụ thể, polypeptit bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 hoặc SEQ ID NO: 100. Theo các phương án nhất định, polypeptit này có thể bao gồm trình tự axit amin liên kề ít nhất 95% tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó trình tự axit amin liên kề có ít nhất một trong số các cặp thay thế dưới đây so với axit amin tương ứng trong SEQ ID NO: 1:

- i) D5T và R21N;
- ii) S64N và H66T;
- iii) K91N và D93T;
- iv) D93N và G95T; và
- v) S97N và Q99T;

trong đó sự thay thế này tạo ra một hoặc nhiều vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N có trình tự NXS/T, trong đó N là Asn; X là axit amin ngoại trừ prolin; sau đó là Ser (S) hoặc Thr (T) trong đó một hoặc nhiều vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N còn được liên kết với N-glycan; trong đó polypeptit này còn tạo thành dime; và trong đó polypeptit này còn có độ hòa tan là ít nhất 1mg/ml trong dung dịch đệm.

Theo các phương án khác, polypeptit có độ hòa tan là ít nhất 5mg/ml trong dung dịch đệm. Dung dịch đệm này có thể là dung dịch đệm phosphat, dung dịch đệm Tris, dung dịch đệm HEPES, dung dịch đệm MOPS, dung dịch đệm PIPES, hoặc dung dịch đệm tương tự, hoặc hỗn hợp của chúng. Trong các trường hợp nhất định, dung dịch đệm này có thể bao gồm dung dịch nước muối được đệm phosphat. Trong các trường hợp nhất định, dung dịch đệm này có thể bao gồm Tris, kali phosphat và natri clorua. Trong một vài trường hợp, dung dịch đệm này có thể bao gồm Tris, kali phosphat, natri

clorua, và axit formic. Ví dụ, dung dịch đệm này có thể bao gồm Tris 10mM đến 100mM pH7, kali phosphat 1mM đến 50mM, natri clorua 100mM đến 200mM, và axit formic 10mS/cm đến 30mS/cm. Theo các phương án khác, polypeptit này làm giảm lượng glucoza trong máu, thể trọng, và/hoặc sự hấp thu thức ăn ít nhất 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% so với trước khi dùng polypeptit. Theo một phương án khác, polypeptit có các đoạn cắt ở đầu tận cùng N và/hoặc các đoạn cắt ở đầu tận cùng C so với SEQ ID NO: 1. Các đoạn cắt này có thể bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc nhiều hơn 14 axit amin so với polypeptit viện dẫn, ví dụ, SEQ ID NO: 1. Theo một phương án cụ thể, polypeptit có đoạn cắt bao gồm ba gốc đầu tiên ở đầu tận cùng N trong GDF15 (Δ ARN hoặc Δ N3). Theo các phương án cụ thể, polypeptit bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17 hoặc SEQ ID NO: 30. Theo các phương án cụ thể, polypeptit bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96 hoặc SEQ ID NO: 100.

Theo các phương án nhất định, polypeptit này có thể bao gồm 112 axit amin liên kế có mức tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với trình tự 112 axit amin của SEQ ID NO: 1, trong đó 112 axit amin liên kế bao gồm một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn bốn cặp thay thế nêu trên.

Fig.1 thể hiện trình tự axit amin của các polypeptit được lấy làm ví dụ (được đánh số từ 1 đến 17) được mô tả trong sáng chế được sắp thẳng hàng với trình tự axit amin của GDF15 trưởng thành kiểu dại của người (WT hGDF15; SEQ ID NO: 1). Trong Fig.1, các polypeptit bao gồm hai vị trí liên ứng được glycosyl hóa liên kết với N (thể đột biến được đánh số 1; SEQ ID NO: 2) cũng như là các polypeptit mà bao gồm một vị trí liên ứng được glycosyl hóa liên kết với N (thể đột biến được đánh số 2 đến 17; SEQ ID NO: 3 đến 18, tương ứng) được thể hiện.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất dime được N-glycosyl của GDF15 đã biến đổi, trong đó dime này bao gồm hai polypeptit được mô tả ở đây được liên kết cộng hóa trị với nhau. Theo các phương án cụ thể, mỗi polypeptit trong số hai polypeptit này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 30 hoặc trình tự axit amin khác tối

đa 5 axit amin; trong đó các polypeptit này có ít nhất một vị trí N-glycosyl hóa mà được N-glycosyl hóa. Theo các phương án cụ thể, mỗi polypeptit trong số hai polypeptit này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 30 hoặc một trình tự axit amin khác tối đa 2 axit amin; trong đó các polypeptit này có ít nhất một vị trí N-glycosyl hóa mà được N-glycosyl hóa. Theo các phương án cụ thể, mỗi polypeptit trong số hai polypeptit này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 hoặc SEQ ID NO: 100 hoặc một trình tự axit amin khác tối đa 5 axit amin; trong đó các polypeptit bao gồm ít nhất một vị trí N-glycosyl hóa mà được N-glycosyl hóa. Theo các phương án cụ thể, mỗi polypeptit trong số hai polypeptit này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 hoặc SEQ ID NO: 100 hoặc một trình tự axit amin khác tối đa 2 axit amin; trong đó các polypeptit này có ít nhất một vị trí N-glycosyl hóa mà được N-glycosyl hóa. Theo các phương án khác, dime được N-glycosyl hóa của GDF15 đã biến đổi là một đồng dime được liên kết bằng liên kết disulfua liên chuỗi. Theo các phương án khác, dime được N-glycosyl hóa của GDF15 đã biến đổi là một đồng dime có hai polypeptit như được mô tả ở đây, mỗi polypeptit bao gồm các trình tự axit amin như nhau, trong đó các polypeptit này có ít nhất một vị trí N-glycosyl hóa mà được N-glycosyl hóa.

Sáng chế cũng bao gồm các polypeptit mà là các đoạn có hoạt tính (ví dụ, các trình tự phụ) của các polypeptit được mô tả trên đây. Chiều dài của các đoạn có hoạt tính hoặc các trình tự phụ có thể là từ 40 axit amin đến 111 axit amin, ví dụ, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 106, 109, hoặc tối đa 111 axit amin.

Các polypeptit có mức tương đồng trình tự xác định so với trình tự viện dẫn ở một chiều dài xác định gồm các axit amin liên kề (ví dụ, “cửa sổ so sánh”). Các phương pháp sắp thẳng hàng các trình tự để so sánh là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sắp thẳng hàng tối ưu các trình tự để so sánh có thể được tiến hành, ví dụ bằng thuật toán tương đồng cục bộ của Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), bằng thuật toán sắp thẳng hàng tương đồng của Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443

(1970), bằng cách tra cứu phương pháp tương đồng của Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), bằng cách thực hiện bằng máy tính các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA trong khối chương trình phần mềm Wisconsin Genetics, Madison, Wis.), hoặc bằng cách sắp thẳng hàng thủ công và quan sát bằng mắt thường (ví dụ, xem tài liệu, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds. 1995 bản phụ lục)).

Theo một ví dụ, polypeptit thích hợp có thể bao gồm trình tự axit amin có ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, ít nhất khoảng 98%, hoặc ít nhất khoảng 99%, trình tự axit amin tương đồng với đoạn duỗi liên kề gồm 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 hoặc tối đa 112 axit amin trong SEQ ID NO: 1.

Các đoạn được lấy làm ví dụ của các polypeptit được mô tả ở đây bao gồm các polypeptit mà có các axit amin bị mất so với SEQ ID NO: 1. Ví dụ, các polypeptit này có thể có các đoạn cắt ở đầu tận cùng N và/hoặc các đoạn cắt ở đầu tận cùng C so với SEQ ID NO: 1. Các đoạn cắt này có thể bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc nhiều hơn 14 axit amin so với polypeptit viện dẫn, ví dụ, SEQ ID NO: 1. Theo các phương án nhất định, polypeptit quan tâm có thể bao gồm một hoặc nhiều axit amin thay thế ở trình tự liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N, như trình tự được mô tả ở đây, và các đoạn cắt ở đầu tận cùng N và/hoặc các đoạn cắt ở đầu tận cùng C so với SEQ ID NO: 1.

Theo các phương án nhất định, polypeptit có thể có chiều dài ít nhất là 98 axit amin và có mức tương đồng trình tự axit amin ít nhất là 90% so với đoạn duỗi tương ứng gồm 98 axit amin trong SEQ ID NO: 1. Polypeptit này có thể không có từ ba đến mười bốn axit amin đầu tiên (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, hoặc 14 axit amin) có mặt ở đầu cuối N của SEQ ID NO: 1, trong khi đó vẫn có axit amin này ở đầu cuối C của SEQ ID NO: 1. Nói cách khác, (các) axit amin bị mất tương ứng với các axit amin ở đầu cuối N của SEQ ID NO: 1.

Theo các phương án nhất định, protein đột biến GDF15 có thể có chiều dài ít nhất 106 axit amin và có mức tương đồng trình tự axit amin ít nhất là 90% so với đoạn duỗi tương ứng gồm 106 axit amin trong SEQ ID NO: 1. Protein đột biến GDF15 có thể không có sáu axit amin đầu tiên ở đầu cuối N của SEQ ID NO: 1.

Theo các phương án nhất định, polypeptit có thể có chiều dài gồm ít nhất 109 axit amin và có mức tương đồng trình tự axit amin ít nhất là 90% so với đoạn duỗi tương ứng gồm 109 axit amin trong SEQ ID NO: 1. Protein đột biến GDF15 có thể không có ba axit amin đầu tiên ở đầu cuối N của SEQ ID NO: 1.

Polypeptit được lấy làm ví dụ theo sáng chế được thể hiện trong Fig.2. Các polypeptit được lấy làm ví dụ (được đánh số từ 1 đến 17) được thể hiện trong Fig.1 có chiều dài bằng chiều dài của hGDF15 WT. Các polypeptit được lấy làm ví dụ (được đánh số từ 18 đến 34; SEQ ID NO: 19 đến 35) được thể hiện trong Fig.2 có chiều dài gồm 109 axit amin vì các polypeptit này bị mất ba axit amin ở đầu tận cùng N ($\Delta N3$) so với hGDF15 WT. Tuy nhiên, khi đề cập đến vị trí của các axit amin thay thế, số gốc được thể hiện là số gốc mà tương ứng với vị trí trong hGDF15 WT trưởng thành (WT; SEQ ID NO: 1). Do đó, axit amin G ở đầu cuối N của các polypeptit được dùng để chỉ là gốc 4 mặc dù nó là axit amin thứ nhất trong trình tự axit amin của polypeptit.

Như nêu trên, các đoạn polypeptit này có thể bao gồm một hoặc nhiều axit amin thay thế ở trình tự liên ứng N-glycosyl hóa so với trình tự của SEQ ID NO: 1, như, một, hai hoặc nhiều hơn hai axit amin thay thế được mô tả ở đây.

Như nêu trên và như được mô tả chi tiết hơn dưới đây, polypeptit theo sáng chế có thể được cải biến nhờ, ví dụ, pegyl hóa (gắn kết cộng hóa trị một hoặc nhiều phân tử polyetylen glycol (PEG), hoặc dẫn xuất của nó); glycosyl hóa (ví dụ, N-glycosyl hóa); polysialyl hóa; các phân tử dung hợp albumin bao gồm albumin huyết thanh (ví dụ, albumin huyết thanh của người (HSA), albumin huyết thanh của chó, hoặc albumin huyết thanh của bò (BSA)); gắn kết albumin nhờ, ví dụ, chuỗi axit béo được tiếp hợp (axyl hóa); dung hợp Fc; và dung hợp với phân tử giả PEG. Theo các phương án nhất định, các cải biến được tiến hành theo cách đặc hiệu vị trí. Theo các phương án khác, các phân tử cải biến bao gồm trình tự liên kết. Trình tự liên kết có thể tiếp hợp gốc cải biến với polypeptit.

Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất việc cải biến GDF15 trưởng thành của người và các protein đột biến GDF15 (như các polypeptit được mô tả trên đây) bằng cách tiếp hợp với albumin. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất việc cải biến các polypeptit nhờ N-glycosyl hóa hoặc O-glycosyl hóa. Các đặc điểm của các albumin và các thể tiếp hợp polypeptit của chúng (ví dụ, các protein dung hợp), và các polypeptit được glycosyl hóa được mô tả thêm dưới đây.

Các cải biến cụ thể để cải biến và/hoặc bất chức chức năng của GDF15

Polypeptit có thể bao gồm một hoặc nhiều cải biến để tăng cường đặc tính mong muốn ở một protein được bào chế để điều trị (ví dụ, thời gian bán thải trong huyết thanh), để làm tăng lượng kháng thể dùng trong các thử nghiệm phát hiện (ví dụ, các đuôi epitop), để dễ dàng tinh chế protein, v.v.. Các cải biến này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, pegyl hóa (gắn kết cộng hóa trị một hoặc nhiều phân tử polyetylen glycol (PEG), hoặc các dẫn xuất của chúng); glycosyl hóa (được liên kết với N và O); polysialyl hóa; dung hợp albumin; gắn kết với albumin nhờ chuỗi axit béo được tiếp hợp (axyl hóa); các protein dung hợp-Fc; và dung hợp với phân tử giả PEG.

Như nêu ở đây, sáng chế đề xuất các phân tử dung hợp bao gồm polypeptit GDF15 trưởng thành (ví dụ, GDF15 trưởng thành của người) hoặc polypeptit của protein đột biến GDF15 (ví dụ, protein đột biến của GDF15 trưởng thành của người), trong đó polypeptit GDF15 trưởng thành hoặc polypeptit protein đột biến GDF15 bao gồm ít nhất một cải biến mà không làm thay đổi trình tự axit amin của nó, và trong đó cải biến này giúp cải thiện ít nhất một đặc tính vật lý của polypeptit hoặc polypeptit của protein đột biến. Theo một phương án, cải biến polypeptit GDF15 hoặc polypeptit của protein đột biến GDF15 bao gồm tiếp hợp với albumin huyết thanh (ví dụ, albumin huyết thanh của người (HSA), albumin huyết thanh của chó, hoặc albumin huyết thanh của bò (BSA)). Theo một vài phương án, đặc tính vật lý này là độ hòa tan.

Theo các phương án trong đó phân tử dung hợp bao gồm polypeptit GDF15 đã biến đổi hoặc protein đột biến GDF15 (như các polypeptit được mô tả trên đây), một trong số các phân tử này được tiếp hợp với albumin, độ hòa tan của phân tử dung hợp thường được cải thiện so với GDF15 của người tái tổ hợp không được dung hợp. Theo các phương án nhất định, phân tử dung hợp có độ hòa tan là ít nhất 1mg/ml trong dung dịch nước muối được đệm phosphat (PBS) ở độ pH 7,0. Theo các phương án khác, phân tử dung hợp có độ hòa tan là ít nhất 2mg/ml, ít nhất 3mg/ml, ít nhất 4mg/ml, hoặc ít nhất 5mg/ml. Theo các phương án khác, phân tử dung hợp có độ hòa tan là ít nhất 6mg/ml trong dung dịch nước muối được đệm phosphat (PBS) ở độ pH 7,0, ít nhất 7mg/ml, ít nhất 8mg/ml, ít nhất 9mg/ml, hoặc ít nhất 10mg/ml. Theo các phương án cụ thể, phân tử dung hợp có độ hòa tan lớn hơn 10mg/ml.

Pegyl hóa: Hiệu quả lâm sàng của các protein điều trị thường bị hạn chế bởi thời gian bán thải trong huyết tương ngắn và nhạy với sự thoái biến proteaza. Các nghiên

cứu về các protein điều trị khác nhau (ví dụ, filgrastim) đã cho thấy rằng các khó khăn này có thể được khắc phục nhờ các cải biến khác nhau, bao gồm tiếp hợp hoặc liên kết trình tự polypeptit với polyme bất kỳ trong số nhiều polyme không có protein, ví dụ, polyetylen glycol (PEG), polypropylen glycol, hoặc polyoxyalkylen (xem, ví dụ, thường nhờ một gốc liên kết được liên kết cộng hóa trị với cả protein và polyme không có protein, ví dụ, PEG). Các phân tử sinh học được tiếp hợp với PEG này được thể hiện là có các đặc tính hữu dụng trong lâm sàng, bao gồm độ ổn định nhiệt và vật lý tốt hơn, khả năng bảo vệ chống lại sự nhạy cảm với sự thoái biến bởi enzym, độ hòa tan tăng, thời gian bán thải trong hệ tuần hoàn *in vivo* lâu hơn và độ thanh thải giảm, khả năng sinh miễn dịch và tính kháng nguyên giảm, và độc tính giảm.

PEG thích hợp để tiếp hợp với trình tự polypeptit thường hòa tan trong nước ở nhiệt độ trong phòng, và có công thức chung $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, trong đó R là hydro hoặc nhóm bảo vệ như nhóm alkyl hoặc alkanol, và trong đó n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 1000. Nếu R là nhóm bảo vệ, thì nó thường có từ 1 đến 8 nguyên tử cacbon. PEG tiếp hợp với trình tự polypeptit có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Các dẫn xuất PEG mạch nhánh, “PEG hình sao” và PEG nhiều nhánh được mô tả trong sáng chế. Khối lượng phân tử của PEG được sử dụng trong sáng chế không giới hạn ở một khoảng cụ thể nào, nhưng theo một vài phương án nhất định phân tử này có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 500 đến 20.000 trong khi các phương án khác có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 4.000 đến 10.000.

Sáng chế cũng mô tả các dược phẩm chứa các thể tiếp hợp, trong đó PEG có các giá trị n khác nhau và do đó các PEG khác nhau có mặt theo một tỷ lệ cụ thể. Ví dụ, một vài dược phẩm chứa hỗn hợp các thể tiếp hợp, trong đó n=1, 2, 3 và 4. Trong một vài dược phẩm, tỷ lệ thể tiếp hợp trong đó n=1 là nằm trong khoảng từ 18 đến 25%, tỷ lệ thể tiếp hợp trong đó n=2 là nằm trong khoảng từ 50 đến 66%, tỷ lệ thể tiếp hợp trong đó n=3 là nằm trong khoảng từ 12 đến 16%, và tỷ lệ thể tiếp hợp trong đó n=4 tối đa là 5%. Các dược phẩm này có thể được bào chế bằng các điều kiện phản ứng và các phương pháp tinh chế đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, phương pháp sắc ký trao đổi cation có thể được sử dụng để tách các thể tiếp hợp, và sau đó phân đoạn mà chứa thể tiếp hợp có số PEG gắn kết mong muốn được xác định, được tinh chế từ các trình tự protein không cải biến và từ các thể tiếp hợp có số PEG gắn kết khác.

PEG có thể gắn kết với polypeptit theo sáng chế nhờ nhóm phản ứng cuối. Nhóm phản ứng cuối có thể là trung gian liên kết giữa các nhóm amino hoặc carboxyl tự do của một hoặc nhiều trình tự polypeptit và polyetylen glycol. Nhóm phản ứng cuối có thể được gắn kết với đoạn đệm polyetylen glycol có chiều dài riêng biệt. Các đoạn đệm PEG làm tăng độ hòa tan của chất phản ứng và thể tiếp hợp, làm giảm thiểu các tác dụng độc và tác dụng miễn dịch so với các đoạn đệm không có PEG, và tạo ra một vài lựa chọn về các khoảng liên kết chéo đặc hiệu có lợi giữa PEG và polypeptit. Các đoạn đệm PEG được lấy làm ví dụ có các nhóm phản ứng bao gồm các trình tự liên kết chéo được pegyl hóa phản ứng với amin (ví dụ, bis(succinimidyl)penta(etylen glycol) (BS-(PEG)₅)); các trình tự liên kết chéo được pegyl hóa phản ứng với sulfhydryl (1,11-bis-maleimidotrietylen glycol (BM(PEG)₃)); các trình tự liên kết chéo được pegyl hóa hai chức năng (NHS-PEG_n-maleimide succinimidyl-([N-maleimidopropionamido]-etylen glycol)este (SM(PEG)_n); n=2-24). Đoạn đệm PEG có thể được liên kết với nhóm amino tự do. Các đoạn đệm PEG bao gồm N-hydroxysuccinylimit polyetylen glycol mà có thể được điều chế bằng cách hoạt hóa este axit succinic của polyetylen glycol với N-hydroxysuccinylimit. Polyetylen glycol đã hoạt hóa khác mà có thể được gắn kết với nhóm amino tự do là 2,4-bis(O-metoxypolyetylen glycol)-6-clo-s-triazin được điều chế bằng cách cho polyetylen glycol monometyl ete phản ứng với xyanuric clorua. Polyetylen glycol đã hoạt hóa khác mà được gắn kết với nhóm carboxyl tự do bao gồm polyoxyetylendiamin.

Việc tiếp hợp một hoặc nhiều trình tự polypeptit theo sáng chế với PEG có đoạn đệm có thể được tiến hành bằng nhiều phương pháp thông thường khác nhau. Ví dụ, phản ứng tiếp hợp này có thể được tiến hành trong dung dịch ở độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 10, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4°C đến nhiệt độ trong phòng, trong khoảng thời gian từ 30 phút đến 20 giờ, trong đó tỷ lệ mol giữa chất phản ứng với protein nằm trong khoảng từ 4:1 đến 30:1. Các điều kiện phản ứng có thể được chọn để hướng phản ứng về phía có mức thay thế mong muốn chiếm ưu thế. Nói chung, nhiệt độ thấp, độ pH thấp (ví dụ, độ pH=5), và thời gian phản ứng ngắn có xu hướng làm giảm số PEG gắn kết, trong khi đó nhiệt độ cao, độ pH từ trung tính đến cao (ví dụ, độ pH≥7), và thời gian phản ứng dài có xu hướng làm tăng số PEG gắn kết. Nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để kết thúc phản ứng.

Theo một vài phương án phản ứng này được kết thúc bằng cách axit hóa hỗn hợp phản ứng và đóng băng ở nhiệt độ, ví dụ, -20°C .

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng các phân tử giả PEG. Các phân tử giả PEG tái tổ hợp được phát triển mà vẫn giữ được các thuộc tính của PEG (ví dụ, thời gian bán thải trong huyết thanh tăng) đồng thời vẫn tạo ra được một vài đặc tính có lợi khác. Bằng cách lấy ví dụ, các chuỗi polypeptit đơn giản (bao gồm, ví dụ, Ala, Glu, Gly, Pro, Ser và Thr) có thể tạo ra cấu hình mở rộng tương tự với PEG có thể được tổng hợp bằng cách tái tổ hợp đã được dung hợp với được chất peptit hoặc protein quan tâm (ví dụ, công nghệ XTEN của Amunix; Mountain View, CA). Điều này tránh được bước tiếp hợp khác trong quá trình sản xuất. Hơn thế nữa, các công nghệ sinh học phân tử có sẵn cho phép kiểm soát thành phần mạch bên của các chuỗi polypeptit, cho phép tối ưu hóa các đặc tính sinh miễn dịch và bào chế.

Glycosyl hóa: Theo các mục đích của sáng chế, thuật ngữ “glycosyl hóa” có nghĩa rộng được dùng để chỉ quy trình gắn kết các glycan với protein, lipid hoặc các phân tử hữu cơ khác bằng enzym. Việc sử dụng thuật ngữ “glycosyl hóa” theo sáng chế thường được dự định có nghĩa là thêm hoặc loại bỏ một hoặc nhiều gốc carbohydrat (hoặc loại bỏ vị trí glycosyl hóa cơ bản hoặc loại bỏ quá trình glycosyl hóa bằng phương pháp hóa học và/hoặc enzym), và/hoặc thêm một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa mà có thể có hoặc không có trong trình tự nguyên thể. Ngoài ra, thuật ngữ này còn bao gồm các thay đổi định tính về quá trình glycosyl hóa của các protein nguyên thể có liên quan đến sự thay đổi bản chất và tỷ lệ của các gốc carbohydrat khác nhau có mặt.

Glycosyl hóa có thể tác động mạnh đến các đặc tính vật lý của protein và cũng có thể quan trọng đối với độ ổn định, sự tiết, và sự khu trú trong tế bào của protein. Quả thực, glycosyl hóa các polypeptit của protein đột biến GDF15 được mô tả ở đây giúp cải thiện có lợi các đặc tính vật lý của chúng. Bằng cách lấy ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, độ hòa tan của các protein đột biến GDF15 có thể được cải thiện bằng cách glycosyl hóa, và việc cải thiện như vậy có thể là quan trọng (xem các ví dụ). Các polypeptit của protein đột biến GDF15 được glycosyl hóa được mô tả ở đây có độ hòa tan cao hơn so với GDF15 kiểu dại, mà không được glycosyl hóa. Theo các phương án nhất định, các protein đột biến GDF15 được glycosyl hóa được mô tả ở đây có độ hòa tan là ít nhất 0,5mg/ml, ví dụ, ít nhất 1mg/ml, ít nhất 2mg/ml, ít nhất 3mg/ml, ít nhất 4mg/ml, ít nhất 5mg/ml, ít nhất 8mg/ml, ít nhất 10mg/ml, ít nhất 15mg/ml, ít nhất

20mg/ml, hoặc ít nhất 25mg/ml, ví dụ độ hòa tan nằm trong khoảng từ 0,5mg/ml đến 25mg/ml, từ 0,5mg/ml đến 20mg/ml, từ 1mg/ml đến 25mg/ml, từ 1mg/ml đến 20mg/ml, từ 3mg/ml đến 25mg/ml, từ 3mg/ml đến 20mg/ml, từ 5mg/ml đến 25mg/ml, từ 5mg/ml đến 20mg/ml, hoặc từ 5mg/ml đến 18mg/ml trong dung dịch đệm. Trong các trường hợp nhất định, các protein đột biến GDF15 được glycosyl hóa được mô tả ở đây có thể có độ hòa tan là ít nhất 0,5mg/ml, ví dụ, ít nhất 1mg/ml, ít nhất 2mg/ml, ít nhất 3mg/ml, ít nhất 4mg/ml, ít nhất 5mg/ml, ít nhất 8mg/ml, ít nhất 10mg/ml, ít nhất 15mg/ml, ít nhất 20mg/ml, hoặc ít nhất 25mg/ml, ví dụ độ hòa tan nằm trong khoảng từ 0,5mg/ml đến 25mg/ml, từ 0,5mg/ml đến 20mg/ml, từ 1mg/ml đến 25mg/ml, từ 1mg/ml đến 20mg/ml, từ 3mg/ml đến 25mg/ml, từ 3mg/ml đến 20mg/ml, từ 5mg/ml đến 25mg/ml, từ 5mg/ml đến 20mg/ml, hoặc từ 5mg/ml đến 18mg/ml trong dung dịch đệm. Dung dịch đệm này có thể là dung dịch đệm phosphat, dung dịch đệm Tris, dung dịch đệm HEPES, dung dịch đệm MOPS, dung dịch đệm PIPES, hoặc dung dịch đệm tương tự, hoặc hỗn hợp của chúng. Trong các trường hợp nhất định, dung dịch đệm này có thể bao gồm dung dịch nước muối được đệm phosphat. Trong các trường hợp nhất định, dung dịch đệm này có thể bao gồm Tris, kali phosphat và natri clorua. Trong một vài trường hợp, dung dịch đệm này có thể bao gồm Tris, kali phosphat, natri clorua, và axit formic. Ví dụ, dung dịch đệm này có thể bao gồm Tris 10mM đến 100mM pH7, kali phosphat 1mM đến 50mM, natri clorua 100mM đến 200mM, và axit formic 10mS/cm đến 30mS/cm.

Các polypeptit của protein đột biến GDF15 được glycosyl hóa được mô tả ở đây là tốt hơn so với polypeptit GDF15 trưởng thành kiểu dại. Các polypeptit của protein đột biến GDF15 được glycosyl hóa này có đặc tính tốt hơn so với polypeptit GDF15 trưởng thành kiểu dại bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở một hoặc nhiều đặc tính sau: hiệu suất trong môi trường nuôi cấy tế bào cao hơn, sự tạo thành dime tốt hơn, độ hòa tan tốt hơn, và khả năng gây miễn dịch giảm. Sự cải thiện độ hòa tan được thể hiện bởi các protein đột biến GDF15 đã biến đổi này có thể, ví dụ, làm cho quá trình bào chế chế phẩm thích hợp hơn để dùng làm thuốc so với các protein đột biến GDF15/GDF15 không được glycosyl hóa. Các polypeptit của protein đột biến GDF15/GDF15 được glycosyl hóa cũng có thể có độ ổn định cao hơn. Hơn thế nữa, các polypeptit có thể cải thiện một hoặc nhiều đặc tính dược động học, như thời gian bán thải.

Việc bổ sung các vị trí glycosyl hóa có thể được thực hiện bằng cách thay đổi trình tự axit amin như được mô tả trên đây. Sự thay đổi polypeptit này có thể được tiến hành bằng cách thêm hoặc thay thế, một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin (đối với các vị trí glycosyl hóa được liên kết với O) hoặc các gốc asparagin (đối với các vị trí glycosyl hóa được liên kết với N). Các cấu trúc của các oligosacarit được liên kết với N và được liên kết với O và các gốc đường được tìm thấy ở mỗi loại có thể khác nhau. Một loại đường mà thường được tìm thấy ở cả hai oligosacarit này là axit N-axetylneuraminic (dưới đây được dùng để chỉ là axit sialic). Axit sialic thường là gốc cuối của cả oligosacarit được liên kết với N và được liên kết với O và, vì điện tích âm của nó, có thể tạo ra các đặc tính axit cho glycoprotein. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất cách tạo ra và sử dụng các biến thể N-glycosyl hóa như được mô tả trên đây.

Một phương pháp khác làm tăng số gốc carbohydrat trên polypeptit là liên kết hóa học hoặc enzym các glycozit với polypeptit.

Các tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary-CHO) thiếu hụt dihydrofolat reductaza (dihydrofolate reductase-DHFR) là các tế bào chủ thường được sử dụng để tổng hợp các glycoprotein tái tổ hợp. Các tế bào này không biểu hiện enzym beta-galactosit alpha-2,6-sialyltransferaza và do đó không bổ sung axit sialic trong liên kết alpha-2,6 vào các oligosacarit được liên kết N của các glycoprotein được tổng hợp trong các tế bào này.

Polysialyl hóa: Sáng chế còn bộc lộ việc sử dụng phương pháp polysialyl hóa, tiếp hợp các peptit và các protein với axit polysialic (polysialic acid-“PSA”) được liên kết α -(2 $\rightarrow$ 8) để thoát biến sinh học có nguồn gốc trong tự nhiên để cải thiện độ ổn định và các đặc tính dược động học *in vivo* của chúng. PSA là một polyme tự nhiên không độc, dễ thoát biến sinh học, rất ưa nước, có khối lượng phân tử biểu kiến cao trong máu mà làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh của nó. Ngoài ra, polysialyl hóa một nhóm các peptit và protein điều trị dẫn đến làm giảm đáng kể sự phân giải protein, duy trì được hoạt tính *in vivo*, và làm giảm khả năng sinh miễn dịch và tính kháng nguyên (ví dụ, xem tài liệu: G. Gregoriadis *et al.*, *Int. J. Pharmaceutics* 300(1-2):125-30). Đối với các cải biến với các thể tiếp hợp khác (ví dụ, PEG), có rất nhiều kỹ thuật khác nhau để polysialyl hóa đặc hiệu vị trí (ví dụ, xem tài liệu, T. Lindhout *et al.*, *PNAS* 108(18)7397-7402 (2011)).

Các protein dung hợp. Sáng chế đề xuất các protein dung hợp của GDF15 trưởng thành kiểu đại (ví dụ, GDF15 của người), cũng như là các protein dung hợp của polypeptit theo sáng chế (ví dụ, các phân tử GDF15 của người đã biến đổi, các protein đột biến của GDF15 của người, các protein đột biến GDF15 đã biến đổi, và các dạng tương tự). Các protein dung hợp này thường bao gồm polypeptit không phải GDF15 (ví dụ, albumin (ví dụ, HSA) hoặc đoạn của nó: vùng gắn kết với albumin (albumin binding domain – ABD); polypeptit Fc; vùng gắn kết với maltoza (maltose binding domain – MBD), mà có thể được dùng để chỉ ở đây là “phần dung hợp”, được tiếp hợp với polypeptit GDF15 kiểu đại hoặc polypeptit theo sáng chế ở đầu cuối N hoặc đầu cuối C của nó. Tùy ý, phần dung hợp này có thể được tiếp hợp với GDF15 kiểu đại hoặc polypeptit nhờ polypeptit liên kết. Polypeptit liên kết này có thể tùy ý là trình tự liên kết phân cắt được, ví dụ, trình tự liên kết phân cắt được nhờ enzym. Ví dụ về các phần dung hợp được mô tả dưới đây.

Dung hợp albumin: Phần dung hợp thích hợp để tiếp hợp bao gồm các albumin như albumin huyết thanh của người (HSA), albumin huyết thanh của chó, và albumin huyết thanh của bò (BSA).

HSA trưởng thành, một polypeptit 585 axit amin (~67 kDa) có thời gian bán thải trong huyết thanh ~20 ngày, về cơ bản có vai trò duy trì áp suất máu thẩm thấu thể keo, độ pH trong máu, và vận chuyển và phân phối nhiều phối tử nội sinh và ngoại sinh. Protein này có ba vùng tương đồng về cấu trúc (các vùng I, II và III), gần như đều có cấu hình xoắn alpha, và có độ ổn định cao nhờ 17 cầu nối disulfua. Ba vùng gắn kết với được chất chủ yếu của albumin được bố trí trên mỗi trong số ba vùng này trong các vùng phụ IB, IIA và IIIA.

Quá trình tổng hợp albumin diễn ra ở gan, mà tạo ra sản phẩm preproalbumin sơ cấp có đời sống ngắn. Do đó, HSA có chiều dài đầy đủ gồm một peptit tín hiệu có 18 axit amin sau đó là một tiền vùng chức năng gồm 6 axit amin; peptit có 24 gốc axit amin này có thể được gọi là tiền vùng chức năng có trình tự tín hiệu. HSA có thể được biểu hiện và được tiết ra bằng cách sử dụng peptit tín hiệu nội sinh của nó dưới dạng tiền vùng chức năng có trình tự tín hiệu. Theo cách khác, HSA có thể được biểu hiện và được tiết ra bằng cách sử dụng peptit tín hiệu IgK được dung hợp với HSA trưởng thành. Preproalbumin được phân cắt nhanh nhờ đồng dịch mã trong mạng lưới nội chất ở đầu cuối amino của nó để tạo ra proalbumin, tiền polypeptit gồm 609 axit amin ổn

định. Sau đó, proalbumin đi qua thể Golgi, tại đây nó được chuyển hóa thành albumin trưởng thành có 585 axit amin nhờ phân cắt ở đầu tận cùng amino phụ thuộc vào furin. Trừ khi được quy định theo cách khác, “albumin” hoặc “albumin trưởng thành” được dùng để chỉ HSA.

Trình tự axit amin gốc, cấu trúc và chức năng của albumin được bảo toàn cao qua các loài, như là các quá trình tổng hợp và tiết albumin. Các protein albumin huyết thanh tương đương với HSA được tìm thấy ở, ví dụ, khỉ cynomolgus, bò, chó, thỏ và chuột. Trong số các loài không phải người, albumin huyết thanh của bò (BSA) là albumin có cấu trúc tương tự nhất với HSA [ví dụ, xem tài liệu, Kosa *et al.*, *J Pharm Sci.* 96(11):3117-24 (tháng 11 năm 2007)]. Sáng chế đề xuất việc sử dụng albumin từ các loài không phải người, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các albumin nêu trên, dùng để, ví dụ, dung hợp với polypeptit GDF15. Theo các phương án nhất định, loài không phải người này là bò. Theo các phương án khác, loài không phải người này là khỉ cynomolgus.

Theo sáng chế, albumin có thể được tiếp hợp với phân tử dược chất (ví dụ, polypeptit được mô tả ở đây) ở đầu cuối carboxyl, đầu cuối amino, cả đầu cuối carboxyl và amino, hoặc ở trong (ví dụ, xem patent Mỹ số USP 5,876,969 và USP 7,056,701). Ngoài ra, sáng chế đề xuất các protein dung hợp albumin bao gồm nhiều hơn một phân tử dược chất tương đồng (ví dụ, nhiều phân tử protein đột biến GDF15) hoặc khác nguồn gốc (ví dụ, phân tử protein đột biến GDF15 và chất chống tiểu đường riêng).

Trong các thể tiếp hợp HSA – polypeptit được mô tả bởi sáng chế, nhiều dạng albumin có thể được sử dụng, như các biến thể HSA, như, các đoạn. Các dạng này thường có một hoặc nhiều hoạt tính albumin mong muốn. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các protein dung hợp bao gồm phân tử dược chất polypeptit được dung hợp trực tiếp hoặc gián tiếp với albumin, đoạn albumin, và biến thể albumin, v.v., trong đó protein dung hợp có độ ổn định trong huyết tương cao hơn so với phân tử dược chất không được dung hợp và/hoặc protein dung hợp vẫn giữ được hoạt tính điều trị của phân tử dược chất không được dung hợp. Theo một vài phương án, dung hợp gián tiếp được thực hiện nhờ trình tự liên kết, như trình tự liên kết peptit hoặc phiên bản cải biến của nó.

HSA có thể được tiếp hợp thông qua một trình tự liên kết với polypeptit được mô tả ở đây để tạo ra protein dung hợp. Ví dụ về các trình tự liên kết thích hợp được mô tả ở đây. Một vài phương án đề xuất trình tự liên kết peptit có, ví dụ, bốn đến ba mươi axit amin.

Theo các phương án trong đó protein dung hợp bao gồm trình tự liên kết, trình tự liên kết này có thể là trình tự liên kết không phân cắt được. Ví dụ, theo một phương án sáng chế mô tả phân tử dung hợp trong đó tiền trình tự axit amin của HSA hoặc HSA trưởng thành được dung hợp với đầu cuối N của GDF15 trưởng thành của người hoặc trình tự axit amin của protein đột biến GDF15 nhờ một trình tự liên kết $(G_4S)_3$ không phân cắt được.

Theo các phương án khác, trong đó protein dung hợp bao gồm trình tự liên kết, trình tự liên kết này có thể là trình tự liên kết phân cắt được. Ví dụ, sáng chế mô tả phân tử dung hợp trong đó tiền trình tự axit amin của HSA hoặc trình tự axit amin của HSA trưởng thành được dung hợp với đầu cuối N của GDF15 trưởng thành của người hoặc trình tự axit amin của protein đột biến GDF15 được đề cập ở đây thông qua trình tự liên kết phân cắt được-yếu tố $(G_4S)_2$ Xa nhạy với proteaza.

Cấu trúc của các phân tử HSA-trình tự liên kết phân cắt được-GDF15 trưởng thành tái tổ hợp /protein đột biến GDF15, cũng như là cấu trúc của các phân tử dung hợp GDF15 trưởng thành tái tổ hợp/protein đột biến GDF15-trình tự liên kết phân cắt được-HSA, có thể được sử dụng để dễ dàng đánh giá, ví dụ, độ hòa tan và xác định hiệu quả *in vivo* của GDF15/protein đột biến GDF15. Theo các phương án này, GDF15/protein đột biến GDF15 có thể được cắt từ chaperon HSA nhờ phân cắt nội bào hoặc nhờ phân cắt enzym *in vitro*. Theo một vài phương án, phân cắt được thực hiện bằng cách phân cắt trình tự liên kết phân cắt được nhờ phân giải protein sử dụng proteaza tồn tại bất kỳ. Theo các phương án khác, các protein đột biến GDF15 cũng có thể được tạo ra dưới dạng các thể dung hợp không chứa HSA bằng cách cho peptit tín hiệu dung hợp với các polypeptit được đề cập ở đây.

Phân cắt nội bào có thể được tiến hành nhờ enzym, ví dụ, furin hoặc caspaza. Tế bào chủ biểu hiện protein dung hợp có thể biểu hiện một lượng nhỏ các enzym nội sinh này, mà có thể phân cắt một phần các phân tử dung hợp nội bào; do đó, một vài polypeptit được tiết ra từ tế bào mà không được tiếp hợp với HSA, trong khi đó một vài polypeptit được tiết ra ở dạng các phân tử dung hợp chứa HSA. Các phương án theo

sáng chế mô tả việc sử dụng các cấu trúc dung hợp chứa furin khác nhau. Ví dụ, các cấu trúc có thể được thiết kế để bao gồm trình tự RGRR (SEQ ID NO: 36), RKRRKR (SEQ ID NO: 37), RKKR (SEQ ID NO: 38), hoặc RRRKKR (SEQ ID NO: 39). Các cấu trúc này có thể có cấu trúc chung sau: Igk-HSA-(G₄S)₂-trình tự furin-hGDF15.

Sáng chế cũng đề xuất cách phân cắt ngoại bào (ví dụ, phân cắt *ex vivo*) nhờ đó phân tử dung hợp được tiết ra từ tế bào, được tinh chế, sau đó được phân cắt (ví dụ, bằng cách sử dụng, ví dụ, trình tự liên kết nhạy-phân giải protein yếu tố Xa hoặc enterokinaza). Cần hiểu rằng việc phân cắt có thể tách toàn bộ phức hợp HSA-trình tự liên kết khỏi polypeptit (ví dụ, GDF15 trưởng thành hoặc protein đột biến GDF15), hoặc một phần phức hợp HSA-trình tự liên kết.

Như được mô tả trên đây, việc dung hợp albumin với một hoặc nhiều polypeptit theo sáng chế có thể, ví dụ, được thực hiện bằng cách thao tác di truyền, sao cho ADN mã hóa HSA, hoặc đoạn của nó, được liên kết với ADN mã hóa một hoặc nhiều trình tự polypeptit. Sau đó, tế bào chủ thích hợp có thể được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm các trình tự nucleotit được dung hợp ở dạng, ví dụ, plasmit thích hợp, để biểu hiện polypeptit dung hợp. Sự biểu hiện này có thể được thực hiện *in vitro* từ, ví dụ, tế bào không nhân hoặc tế bào có nhân điển hình, hoặc *in vivo* từ, ví dụ, sinh vật chuyển gen. Theo một vài phương án của sáng chế, sự biểu hiện protein dung hợp được thực hiện trong các dòng tế bào của động vật có vú, ví dụ, các dòng tế bào CHO. Biến nạp được sử dụng rộng rãi ở đây được dùng để chỉ sự thay đổi di truyền của tế bào thu được từ sự hấp thu trực tiếp, sự kết hợp và biểu hiện vật liệu di truyền ngoại sinh (ADN ngoại sinh) từ môi trường xung quanh của nó và tiếp nhận thông qua (các) màng tế bào. Sự biến nạp xảy ra tự nhiên ở một vài loài vi khuẩn, nhưng nó cũng có thể chịu tác động bởi phương pháp nhân tạo ở các tế bào khác.

Ngoài ra, chính albumin có thể được cải biến để kéo dài thời gian bán thải trong hệ tuần hoàn. Việc dung hợp albumin đã biến đổi với một hoặc nhiều polypeptit theo sáng chế có thể đạt được bằng cách thao tác di truyền/các kỹ thuật tái tổ hợp được mô tả trên đây hoặc bằng cách tiếp hợp hóa học; phân tử dung hợp thu được có thời gian bán thải dài hơn so với thời gian bán thải của các phân tử dung hợp có albumin không được cải biến (ví dụ, xem công bố đơn quốc tế số WO2011/051489).

Các nền công nghệ đã biết rõ hiện nay để dung hợp di truyền và tiếp hợp hóa học các polypeptit (ví dụ, các polypeptit được mô tả ở đây) và albumin tái tổ hợp. Bằng

cách lấy ví dụ, nền công nghệ ALBUFUSE® flex (Novozymes Biopharma A/S; Denmark) có thể được sử dụng để thực hiện dung hợp di truyền một hoặc nhiều phân tử albumin tái tổ hợp với một hoặc nhiều polypeptit, nhờ đó tạo ra cADN liên kết mã hóa (các) polypeptit và (các) albumin để tạo ra một protein tương đồng. Nền này có thể được sử dụng với, ví dụ, các hệ biểu hiện nấm men và tế bào chủ của động vật có vú. Bằng cách lấy ví dụ khác, nền RECOMBUMIN® Flex (Novozymes Biopharma A/S; Denmark) có thể được sử dụng để tiến hành tiếp hợp hóa học polypeptit theo sáng chế với albumin tái tổ hợp, mà không cần tạo dẫn xuất thêm albumin. Mặc dù tiếp hợp có thể được tiến hành ở một vài gốc axit amin (ví dụ, lysin và tyrosin), nhưng thiol tự do ở Cys34 là một lựa chọn chung do tính đặc hiệu vị trí tạo ra sản phẩm cuối tương đồng hơn.

Các phương pháp gắn kết với albumin khác: một vài phương pháp gắn kết albumin đã được phát triển như là các phương pháp thay thế để dung hợp trực tiếp, bao gồm gắn kết với albumin nhờ chuỗi axit béo đã tiếp hợp (axyl hóa). Do albumin huyết thanh là một protein vận chuyển các axit béo, nên các phối tử tự nhiên này có hoạt tính gắn kết với albumin đã được sử dụng để kéo dài thời gian bán thải của các protein điều trị nhỏ. Ví dụ, insulin detemir (LEVEMIR), một dược chất đã được thông qua để điều trị bệnh tiểu đường, bao gồm một chuỗi myristyl được tiếp hợp với insulin đã biến đổi di truyền, tạo ra chất tương tự insulin tác dụng kéo dài.

Sáng chế còn đề xuất các protein dung hợp mà bao gồm trình tự polypeptit của vùng gắn kết với albumin (albumin binding domain-ABD) và trình tự của một hoặc nhiều polypeptit được mô tả ở đây. Trình tự polypeptit ABD bất kỳ được mô tả ở đây hoặc trong tài liệu tham khảo có thể là một thành phần của các protein dung hợp. Các thành phần của các protein dung hợp có thể tùy ý được liên kết cộng hóa trị nhờ trình tự liên kết, như các trình tự liên kết được mô tả ở đây. Theo một vài phương án của sáng chế, các protein dung hợp bao gồm trình tự polypeptit ABD như là gốc ở đầu tận cùng N và các polypeptit được mô tả ở đây như là gốc ở đầu tận cùng C.

Sáng chế còn đề xuất các protein dung hợp bao gồm một đoạn của polypeptit gắn kết với albumin, đoạn này về cơ bản vẫn gắn kết với albumin; hoặc multimer của các polypeptit gắn kết với albumin hoặc các đoạn của chúng bao gồm ít nhất hai polypeptit gắn kết với albumin hoặc các đoạn của chúng làm các đơn vị monome.

Không giới hạn ở lý thuyết bất kỳ, được cho rằng các polypeptit được mô tả ở đây gắn kết với trình tự polypeptit ABD, nhờ đó càng hóa được các polypeptit ở đối tượng dẫn đến làm tăng thời gian tác dụng ở đối tượng.

Để bàn luận chung về ABD và các công nghệ có liên quan, xem các công bố đơn quốc tế số WO 2012/050923, WO 2012/050930, WO 2012/004384 và WO 2009/016043.

Các protein dung hợp với protein liên kết với maltoza hoặc các đoạn của nó: Sáng chế còn đề xuất các protein dung hợp mà bao gồm protein liên kết với maltoza (maltose binding protein-MBP), hoặc đoạn của nó, và trình tự axit amin của một hoặc nhiều polypeptit được mô tả ở đây. Theo một vài phương án, đoạn MBP bao gồm vùng gắn kết với maltoza (maltose binding domain-MBD). MBP bất kỳ, hoặc đoạn của nó, hoặc trình tự polypeptit MBD được mô tả ở đây hoặc đã biết trong lĩnh vực này có thể là một thành phần của các protein dung hợp theo sáng chế. Các thành phần của protein dung hợp có thể tùy ý được liên kết cộng hóa trị nhờ trình tự liên kết, như các trình tự liên kết được mô tả ở đây. Theo một vài phương án của sáng chế, các protein dung hợp bao gồm MBP, hoặc đoạn của nó, hoặc trình tự polypeptit MBD như là gốc ở đầu tận cùng N và các polypeptit được mô tả ở đây như là gốc ở đầu tận cùng C.

Sáng chế còn đề xuất các protein dung hợp bao gồm một đoạn của polypeptit MBP hoặc MBD, đoạn này hầu như vẫn giữ được hoạt tính gắn kết với maltoza; hoặc multime của các polypeptit gắn kết với maltoza, hoặc các đoạn của chúng (ví dụ, multime của MBD) bao gồm ít nhất hai polypeptit gắn kết với maltoza, hoặc các đoạn của chúng, như là các đơn vị monome (ví dụ, hai hoặc nhiều polypeptit MBD).

Để bàn luận chung về MBP và MBD và các công nghệ có liên quan, ví dụ xem tài liệu, Kapust et al. (1999) *Protein Sci* 8(8):1668-74.

Các protein dung hợp Fc. Sáng chế còn đề xuất các protein dung hợp mà bao gồm polypeptit Fc hoặc đoạn của nó, và trình tự axit amin của một hoặc nhiều polypeptit được mô tả ở đây (ví dụ, các phân tử GDF15 của người, các phân tử GDF15 của người đã biến đổi, các protein đột biến GDF15, và các protein đột biến GDF15 đã biến đổi). Trình tự polypeptit Fc bất kỳ được mô tả ở đây hoặc đã biết trong lĩnh vực này có thể là một thành phần của protein dung hợp theo sáng chế. Các thành phần của các protein dung hợp có thể tùy ý được liên kết cộng hóa trị nhờ trình tự liên kết, như các trình tự liên kết được mô tả ở đây. Theo một vài phương án theo sáng chế, các

protein dung hợp bao gồm trình tự polypeptit Fc như là gốc ở đầu tận cùng N và các polypeptit được mô tả ở đây như là gốc ở đầu tận cùng C.

Sáng chế còn đề xuất các phần dung hợp polypeptit Fc, và các protein dung hợp bao gồm các phần này, trong đó phần dung hợp polypeptit Fc được cải biến là một phần của cặp Fc mang điện tích. Thuật ngữ “phần của cặp Fc mang điện tích” được dùng để chỉ (i) trình tự Fc “mang điện tích âm” (tùy ý thiếu vùng bản lề) và bao gồm đột biến cặp mang điện tích hoặc (ii) trình tự Fc “mang điện tích dương” (tùy ý thiếu vùng bản lề) và bao gồm đột biến cặp mang điện tích. Các thuật ngữ “mang điện tích dương” và “mang điện tích âm” được sử dụng trong bản mô tả này nhằm mô tả bản chất của các đột biến cặp điện tích trong các trình tự Fc, và không có nghĩa là toàn bộ trình tự hoặc cấu trúc cần có điện tích âm hoặc dương. Các trình tự axit amin Fc mang điện tích thích hợp để dùng trong các cấu trúc polypeptit (ví dụ, protein đột biến GDF15, các protein đột biến GDF15 đã biến đổi) theo sáng chế được mô tả trong, ví dụ công bố đơn quốc tế số WO 2013/113008.

Ví dụ về Fc mang điện tích dương (“Fc(+)”) bao gồm Fc bị đột biến axit aspartic thành lysin (E356K) và đột biến axit glutamic thành lysin (D399K) của trình tự Fc thiếu vùng bản lề. Ví dụ về Fc mang điện tích âm (“Fc(-)”) bao gồm Fc có hai đột biến lysin thành aspartat (K392D, K409D) trong trình tự Fc thiếu vùng bản lề. Lysin ở đầu tận cùng C (K477) cũng có thể tùy ý được loại bỏ. Nếu protein dung hợp Fc(+)polypeptit (ví dụ, protein dung hợp Fc(+)protein đột biến GDF15) và protein dung hợp Fc(-)Polypeptit (ví dụ, protein dung hợp Fc(-)protein đột biến GDF15) được ủ cùng nhau, thì các gốc aspartat liên kết với các gốc lysin nhờ lực tĩnh điện, tạo điều kiện cho sự tạo thành các dị dime Fc giữa các trình tự Fc(+) và Fc(-) của các protein dung hợp polypeptit GDF15.

Sáng chế còn đề xuất các cấu trúc được ký hiệu là các cấu trúc “bán” hoặc “bán Fc”, bao gồm hai trình tự Fc được liên kết nối tiếp bởi trình tự liên kết mà nối đầu cuối N của trình tự Fc thứ nhất với đầu cuối C của trình tự Fc thứ hai. Theo một vài phương án, monome bao gồm trình tự polypeptit (ví dụ, GDF15 trưởng thành đã biến đổi hoặc protein đột biến GDF15) được liên kết với trình tự Fc thứ nhất bởi một trình tự liên kết thứ nhất mà nối đầu cuối N của trình tự GDF15 với đầu cuối C của trình tự Fc thứ nhất, trong đó trình tự Fc thứ nhất được liên kết với trình tự Fc thứ hai bởi một trình tự liên kết thứ hai mà nối đầu cuối N của trình tự Fc thứ nhất với đầu cuối C của trình tự Fc

thứ hai. Các trình tự Fc thứ nhất và thứ hai cũng được liên kết bởi các vùng bản lề Fc. Hai monome này liên kết để tạo thành dimer trong đó các monome được liên kết nhờ liên kết disulfua nội chuỗi giữa hai trình tự polypeptit. Ví dụ về các polypeptit bán Fc thích hợp để dùng với các protein đột biến GDF15 theo sáng chế xem công bố đơn quốc tế số WO 2013/113008.

Sáng chế còn đề xuất các protein dung hợp có multimer của các polypeptit Fc, hoặc các đoạn của chúng, bao gồm một phần của cặp Fc mang điện tích (ví dụ, multimer của Fc).

Tiếp hợp với các phân tử khác: Các thành phần và phân tử thích hợp khác để tiếp hợp bao gồm, ví dụ, thyroglobulin; giải độc tố uốn ván; giải độc tố bạch hầu; axit polyamino như poly(D-lysine:axit D-glutamic); các polypeptit VP6 của virus rota; hemagglutinin của virus cúm, nucleoprotein của virus cúm; xyanin huyết của con sao sao có lỗ khóa (Keyhole Limpet Hemocyanin-KLH); và protein lõi của virus viêm gan B và kháng nguyên bề mặt; hoặc tổ hợp bất kỳ của các thành phần nêu trên.

Do đó, sáng chế đề xuất sự tiếp hợp một hoặc nhiều thành phần hoặc phân tử khác ở đầu cuối N và/hoặc đầu cuối C của trình tự polypeptit, như protein khác (ví dụ, protein có trình tự axit amin khác nguồn gốc với protein của đối tượng), hoặc phân tử chất mang. Do đó, trình tự polypeptit được lấy làm ví dụ có thể được đề xuất ở dạng thể tiếp hợp với phân tử hoặc thành phần khác.

à thể tiếp hợp có thể tạo ra trình tự polypeptit mà vẫn giữ được hoạt tính với chức năng hoặc hoạt tính bổ sung hoặc hỗ trợ của phân tử thứ hai. Ví dụ, trình tự polypeptit có thể được tiếp hợp với một phân tử, ví dụ, để làm tăng độ hòa tan, thời gian bảo quản, *in vivo* hoặc thời gian bán thải trong hạn dùng hoặc độ ổn định, làm giảm khả năng sinh miễn dịch, giải phóng chậm hoặc có kiểm soát *in vivo*, v.v.. Các chức năng hoặc hoạt tính khác bao gồm thể tiếp hợp mà làm giảm độc tính so với trình tự polypeptit không được tiếp hợp, thể tiếp hợp mà nhằm vào loại tế bào hoặc cơ quan hiệu quả hơn so với trình tự polypeptit không được tiếp hợp, hoặc được chất để chống lại thêm nguyên nhân hoặc các tác dụng có liên quan đến bệnh hoặc rối loạn như nêu ở đây (ví dụ, bệnh tiểu đường).

Polypeptit có thể cũng được tiếp hợp với các đại phân tử được chuyển hóa chậm, lớn như protein; polysaccharit, như sepharosa, agarosa, xenluloza, các hạt xenluloza; axit amin dạng polyme như axit polyglutamic, polylysine; các copolyme axit amin; các hạt

virut đã bất hoạt; các độc tố vi khuẩn đã bất hoạt như giải độc tố từ các phân tử độc tố bạch hầu, uốn ván, tả, độc tố bạch cầu; vi khuẩn đã bất hoạt; và các tế bào nhánh. Các dạng tiếp hợp này, nếu muốn, có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể chống lại polypeptit theo sáng chế.

Các thành phần và các phân tử dự tuyển khác để tiếp hợp bao gồm các phân tử thích hợp để phân tách hoặc tinh chế. Các ví dụ không giới hạn cụ thể bao gồm các phân tử gắn kết, như biotin (cặp gắn kết đặc hiệu biotin-avidin), kháng thể, thụ thể, phối tử, lectin, hoặc phân tử mà bao gồm giá thể rắn, bao gồm, ví dụ, các hạt nhựa hoặc polystyren, đĩa hoặc hạt, hạt từ, que thử, và màng.

Các phương pháp tinh chế như sắc ký trao đổi cation có thể được sử dụng để tách các thể tiếp hợp nhờ sự chênh lệch điện tích, các phương pháp này tách các thể tiếp hợp một cách hiệu quả thành các phân tử có khối lượng khác nhau. Ví dụ, cột trao đổi cation có thể được nạp và sau đó rửa bằng natri axetat ~20mM, pH ~4, và sau đó giải hấp bằng NaCl gradien tuyến tính (0M đến 0,5M) được đệm ở độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 5,5, ví dụ ở độ pH ~4,5. Lượng các phân đoạn thu được bằng sắc ký trao đổi cation có thể được xác định bằng khối lượng phân tử sử dụng các phương pháp thông thường, ví dụ, đo phổ khối, SDS-PAGE, hoặc các phương pháp đã biết khác để tách các thực thể phân tử theo khối lượng.

Các cải biến khác: Sáng chế đề xuất việc sử dụng các cải biến khác, hiện đã biết hoặc được phát triển trong tương lai, của các polypeptit để cải thiện một hoặc nhiều đặc tính. Một phương pháp như vậy để kéo dài thời gian bán thải trong hệ tuần hoàn, làm tăng độ ổn định, làm giảm sự thanh thải, hoặc thay đổi khả năng sinh miễn dịch hoặc tính kháng nguyên của polypeptit theo sáng chế bao gồm cải biến các trình tự polypeptit bằng cách hesyl hóa, mà sử dụng các dẫn xuất hydroxyetyl tinh bột được liên kết với các phân tử khác để cải biến các đặc tính của phân tử. Các khía cạnh khác nhau của phương pháp hesyl hóa được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2007/0134197 và 2006/0258607.

Sáng chế đề xuất các phân tử dung hợp bao gồm SUMO làm đuôi dung hợp (LifeSensors, Inc.; Malvern, PA). Dung hợp polypeptit được mô tả ở đây với SUMO có thể tạo ra một vài tác dụng có lợi lên polypeptit, bao gồm tăng cường sự biểu hiện, cải thiện độ hòa tan, và/hoặc hỗ trợ sự phát triển các phương pháp tinh chế. Các SUMO proteaza nhận diện cấu trúc bậc ba của SUMO và phân cắt protein dung hợp ở đầu cuối

C của SUMO, do đó giải phóng polypeptit được mô tả ở đây với axit amin ở đầu tận cùng N mong muốn.

Các trình tự liên kết: Bất kỳ thành phần và phân tử nêu trên được sử dụng để cải biến các trình tự polypeptit theo sáng chế có thể tùy ý được tiếp hợp thông qua trình tự liên kết. Các trình tự liên kết thích hợp bao gồm “các trình tự liên kết linh động” mà thường có chiều dài đủ để cho phép sự dịch chuyển nào đó giữa các trình tự polypeptit đã biến đổi và các thành phần và các phân tử được liên kết. Các phân tử liên kết có thể có chiều dài gồm 6 đến 50 nguyên tử. Các phân tử liên kết cũng có thể là, ví dụ, các oligome aryl axetylen, etylen glycol có từ 2 đến 10 đơn vị monome, diamine, diaxit, axit amin, hoặc hỗn hợp của chúng. Các trình tự liên kết thích hợp có thể dễ dàng được chọn và có thể có chiều dài thích hợp bất kỳ, như 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10 đến 20, 20 đến 30, 30 đến 50 axit amin.

Các trình tự liên kết linh động được lấy làm ví dụ bao gồm các polyme glyxin (G)_n, polyme glyxin-alanine, polyme alanine-serine, polyme glyxin-serine (ví dụ, (G_mS_o)_n, ($GSGGS$)_n, ($G_mS_oG_m$)_n, ($G_mS_oG_mS_oG_m$)_n, ($GSGGS_m$)_n, ($GSGS_mG$)_n và ($GGGS_m$)_n, và tổ hợp của chúng, trong đó mỗi m, n, và o độc lập được chọn từ một số nguyên trong số ít nhất các số nguyên từ 1 đến 20, ví dụ, 1 đến 18, 2 đến 16, 3 đến 14, 4 đến 12, 5 đến 10, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10), và các trình tự liên kết linh động khác. Các polyme glyxin và glyxin-serine không được tạo cấu trúc một cách tương đối, và do đó có thể được dùng làm liên kết trung gian giữa các thành phần. Các trình tự liên kết linh động được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở GGSG, GGSGG, GSGSG, GSGGG, GGGSG, và GSSSG.

Các trình tự liên kết linh động khác bao gồm các polyme glyxin (G)_n hoặc các polyme glyxin-serine (ví dụ, (GS)_n, ($GSGGS$)_n, ($GGGS$)_n và ($GGGGS$)_n, trong đó n=1 đến 50, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10 đến 20, 20 đến 30, 30 đến 50). Các trình tự liên kết linh động được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở GGGS (SEQ ID NO: 40), GGGGS (SEQ ID NO: 41), GGSG (SEQ ID NO: 42), GGSGG (SEQ ID NO: 43), GSGSG (SEQ ID NO: 44), GSGGG (SEQ ID NO: 45), GGGSG (SEQ ID NO: 46), và GSSSG (SEQ ID NO: 47). Multimer (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10 đến 20, 20 đến 30, hoặc 30 đến 50) của các trình tự liên kết này có thể được liên kết với nhau để tạo ra các trình tự liên kết linh động được dùng để tiếp hợp trình tự axit amin khác nguồn gốc với các polypeptit được mô tả ở đây. Như được mô tả ở đây, trình

tự axit amin khác nguồn gốc có thể là một trình tự tín hiệu và/hoặc phân dung hợp, như, albumin, trình tự Fc, và dạng tương tự.

Ví dụ về các trình tự liên kết bao gồm, ví dụ, (GGGGS)_n, trong đó n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10 (ví dụ, n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10); GGGSGGGSIEGR (SEQ ID NO: 48); GGGGG (SEQ ID NO: 49); EGGGS (SEQ ID NO: 50).

Trong một vài trường hợp, trình tự liên kết có thể là trình tự liên kết phân cắt được, ví dụ, trình tự liên kết phân cắt được nhờ enzyme. Trong các trường hợp khác, trình tự liên kết có thể là trình tự liên kết không phân cắt được, ví dụ, trình tự liên kết mà không được phân cắt bằng enzyme trong các điều kiện sinh lý thông thường *in vivo*.

Ví dụ, trình tự liên kết phân cắt được nhờ phân giải protein có thể bao gồm vị trí phân cắt metalloproteinaza chất nền (matrix metalloproteinase – MMP) ví dụ, vị trí phân cắt của MMP được chọn từ collagenaza-1, -2, và -3 (MMP-1, -8, và -13), gelatinaza A và B (MMP-2 và -9), stromelysin 1, 2, và 3 (MMP-3, -10, và -11), matrilysin (MMP-7), và metalloproteinaza màng (MT1-MMP và MT2-MMP). Trình tự phân cắt của MMP-9 là Pro-X-X-Hy (trong đó, X là gốc tùy ý; Hy, gốc kỵ nước) (SEQ ID NO: 51), ví dụ, Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr) (SEQ ID NO: 52), ví dụ, Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser (SEQ ID NO: 53) hoặc Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr (SEQ ID NO: 54). Một ví dụ khác về vị trí phân cắt proteaza là vị trí phân cắt chất hoạt hóa plasminogen, ví dụ, vị trí phân cắt chất hoạt hóa plasminogen loại urokinaza (urokinase-type plasminogen activator – uPA) hoặc chất hoạt hóa plasminogen mô (tissue plasminogen activator – tPA). Ví dụ cụ thể về các trình tự phân cắt của uPA và tPA bao gồm các trình tự chứa Val-Gly-Arg. Một ví dụ khác là vị trí phân cắt thrombin, ví dụ, CGLVPAGSGP (SEQ ID NO: 55). Các trình tự liên kết thích hợp khác có các vị trí phân cắt proteaza bao gồm các trình tự liên kết có một hoặc nhiều trình tự axit amin sau: 1) SLLKSRMVPNFN (SEQ ID NO: 56) hoặc SLLIARRMPNFN (SEQ ID NO: 57), được phân cắt bởi cathepsin B; SKLVQASASGVN (SEQ ID NO: 58) hoặc SSYLKASDAPDN (SEQ ID NO: 59), được phân cắt bởi proteaza virus Epstein-Barr; RPKPQQFFGLMN (SEQ ID NO: 60) được phân cắt bởi MMP-3 (stromelysin); SLRPLALWRSFN (SEQ ID NO: 61) được phân cắt bởi MMP-7 (matrilysin); SPQGIAGQRNFN (SEQ ID NO: 62) được phân cắt bởi MMP-9; DVDERDVRGFASFL (SEQ ID NO: 63) được phân cắt bởi MMP giống thermolysin; SLPLGLWAPNFN (SEQ ID NO: 64) được phân cắt bởi

metalloproteinaza chất nền 2 (MMP-2); SLLIFRSWANFN (SEQ ID NO: 65) được phân cắt bởi cathepsin L; SGVVIATVIVIT (SEQ ID NO: 66) được phân cắt bởi cathepsin D; SLGPQGIWGQFN (SEQ ID NO: 67) được phân cắt bởi metalloproteinaza chất nền 1 (MMP-1); KKSPGRVVGGSV (SEQ ID NO: 68) được phân cắt bởi chất hoạt hóa plasminogen loại urokinaza; PQGLLGAPGILG (SEQ ID NO: 69) được phân cắt bởi metalloproteinaza chất nền màng typ 1 (membrane type 1 matrix metalloproteinase – MT – MMP); HGPEGLRVGFYESDVMGRGHARLVHVEEPHT (SEQ ID NO: 70) được phân cắt bởi stromelysin 3 (hoặc MMP-11), thermolysin, collagenaza nguyên bào sợi và stromelysin-1; GPQGLAGQRGIV (SEQ ID NO: 71) được phân cắt bởi metalloproteinaza chất nền 13 (collagenaza-3); GGSGQ-RGRKALE (SEQ ID NO: 72) được phân cắt bởi chất hoạt hóa plasminogen loại mô (tissue-type plasminogen activator – tPA); SLSALLSSDIFN (SEQ ID NO: 73) được phân cắt bởi kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt của người; SLPRFKIIGGFN (SEQ ID NO: 74) được phân cắt bởi kallikrein (hK3); SLLGIAVPGNFN (SEQ ID NO: 75) được phân cắt bởi elastaza bạch cầu trung tính; và FFKNIVTPRTPP (SEQ ID NO: 76) được phân cắt bởi calpain (protease trung tính được hoạt hóa bởi canxi).

Fig.3 thể hiện trình tự axit amin của hai protein dung hợp M1 (SEQ ID NO: 77) và M2 (SEQ ID NO: 78) được mô tả ở đây. Protein dung hợp M1 bao gồm liên kết từ đầu cuối N đến đầu cuối C, trình tự tín hiệu IgK (chữ in thường) được dung hợp với trình tự axit amin HSA được dung hợp với trình tự liên kết (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (được gạch chân) với đầu cuối N của GDF15 trưởng thành của người (in đậm). Protein dung hợp M2 bao gồm liên kết từ đầu cuối N đến đầu cuối C, trình tự tín hiệu IgK (chữ in thường) được dung hợp với trình tự axit amin HSA được dung hợp với trình tự liên kết (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (được gạch chân) với đầu cuối N của GDF15 trưởng thành của người (in đậm) bị mất 3-axit amin (Δ ARN).

Fig.5 thể hiện trình tự axit amin của hai protein dung hợp M3 (SEQ ID NO: 79) và M4 (SEQ ID NO: 80) được mô tả ở đây. Protein dung hợp M3 bao gồm liên kết từ đầu cuối N đến đầu cuối C, trình tự tín hiệu IgK (chữ thường) được dung hợp với trình tự axit amin của HSA được dung hợp với trình tự liên kết (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₅ (được gạch chân) với đầu cuối N của trình tự axit amin của GDF15 trưởng thành của người (in đậm) bị mất 3-axit amin (được ký hiệu là Δ ARN hoặc Δ N3). Protein dung

hợp M4 bao gồm liên kết từ đầu cuối N đến đầu cuối C, trình tự tín hiệu IgK (chữ in thường) được dung hợp với trình tự axit amin HSA được dung hợp với trình tự liên kết (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₅ (được gạch chân) với đầu cuối N của trình tự axit amin của GDF15 trưởng thành của người (in đậm) bao gồm đoạn cắt 6 axit amin (Δ ARNGDH) so với đầu cuối N của hGDF15 trưởng thành.

Sáng chế còn đề xuất các trình tự axit nucleic tái tổ hợp mã hóa các trình tự, các polypeptit và các dime được mô tả ở đây. Theo các phương án nhất định, axit nucleic tái tổ hợp mã hóa polypeptit có trình tự axit amin liên kết ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó trình tự axit amin liên kết có ít nhất một trong số các cặp thay thế sau so với axit amin tương ứng trong SEQ ID NO: 1:

- i) D5T và R21N hoặc D5S và R21N;
- ii) R16N và H18T hoặc R16N và H18S;
- iii) S23N và E25T hoặc S23N và E25S;
- iv) S50N và F52T; S50N và F52S; F52N và A54T; hoặc F52N và A54S;
- v) Q51N và R53T; Q51N và R53S; R53N và A55T; hoặc R53N và A55S;
- vi) S64N và H66T; hoặc S64N và H66S;
- vii) K91N và D93T; K91N và D93S; D93N và G95T; hoặc D93N và G95S;
- viii) T94N và V96T; T94N và V96S; V96N và L98T; hoặc V96N và L98S;
- ix) S97N và Q99T; hoặc S97N và Q99S; và
- x) A106N và D108T hoặc A106N và D108S;

trong đó sự thay thế này tạo ra một hoặc nhiều vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N có trình tự NXS/T, trong đó N là Asn; X là axit amin ngoại trừ prolin; sau đó là Ser (S) hoặc Thr (T) và trong đó một hoặc nhiều vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N nếu được biểu hiện còn được liên kết với N-glycan. Theo một phương án khác, axit nucleic tái tổ hợp mã hóa polypeptit mà nếu được biểu hiện tạo thành dime. Theo một phương án khác, axit nucleic tái tổ hợp mã hóa polypeptit có các đoạn cắt ở đầu tận cùng N và/hoặc các đoạn cắt ở đầu tận cùng C so với SEQ ID NO: 1. Các đoạn cắt này có thể bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc nhiều hơn mười bốn axit amin so với polypeptit viện dẫn, ví dụ, SEQ ID NO: 1. Theo một phương án cụ thể, axit nucleic tái tổ hợp mã hóa polypeptit có đoạn cắt gồm ba gốc đầu

tiên ở đầu tận cùng N trong GDF15 (Δ ARN hoặc Δ N3). Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic tái tổ hợp mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin được chọn từ: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 30 hoặc một trình tự axit amin khác tối đa 5 axit amin; trong đó polypeptit này nếu được biểu hiện bao gồm ít nhất một vị trí N-glycosyl hóa mà được N-glycosyl hóa. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic tái tổ hợp mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin được chọn từ: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 30 hoặc một trình tự axit amin khác tối đa 2 axit amin; trong đó polypeptit này nếu được biểu hiện bao gồm ít nhất một vị trí N-glycosyl hóa mà được N-glycosyl hóa. Theo các phương án cụ thể, axit nucleic tái tổ hợp mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin được chọn từ: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 hoặc SEQ ID NO: 100 hoặc một trình tự axit amin khác tối đa 5 axit amin; trong đó polypeptit này nếu được biểu hiện bao gồm ít nhất một vị trí N-glycosyl hóa được N-glycosyl hóa. Theo các phương án cụ thể, axit nucleic tái tổ hợp mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin được chọn từ: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 hoặc SEQ ID NO: 100 hoặc một trình tự axit amin khác tối đa 2 axit amin; trong đó polypeptit này nếu được biểu hiện bao gồm ít nhất một vị trí N-glycosyl hóa được N-glycosyl hóa. Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra đồng dime được N-glycosyl hóa của GDF15 đã biến đổi bao gồm bước biểu hiện axit nucleic tái tổ hợp nêu trên trong tế bào của động vật có vú, ví dụ tế bào CHO. Sáng chế còn đề xuất đồng dime được N-glycosyl hóa của GDF15 đã biến đổi được tổng hợp bằng phương pháp nêu trên.

Ngoài các trình tự axit amin và các trình tự axit nucleic cụ thể nêu ở đây, sáng chế còn đề xuất các polypeptit và các axit nucleic có các trình tự ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 95% tương đồng với các trình tự axit amin và axit nucleic này. Thuật ngữ “tương đồng” hoặc tỷ lệ “tương đồng,” trong phạm vi hai hoặc nhiều trình tự polynucleotit, hoặc hai hoặc nhiều trình tự axit amin, được dùng để chỉ

hai hoặc nhiều trình tự hoặc trình tự con giống nhau hoặc có tỷ lệ theo lý thuyết các gốc axit amin hoặc các nucleotit giống nhau (ví dụ, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 95% tương đồng ở vùng xác định), nếu so sánh và sắp thẳng hàng tương ứng tối đa ở vùng xác định. Sáng chế đặc biệt đề xuất các polypeptit có các trình tự axit amin mà ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% tương đồng về trình tự với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 đến 35 hoặc 77 đến 97.

Phương pháp tổng hợp các polypeptit

Polypeptit theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng phương pháp thích hợp bất kỳ, bao gồm các phương pháp tái tổ hợp và không tái tổ hợp (ví dụ, tổng hợp hóa học).

A. Tổng hợp hóa học

Nếu một polypeptit được tổng hợp hóa học, thì quá trình tổng hợp này có thể tiến hành ở pha lỏng hoặc pha rắn. Tổng hợp peptit ở pha rắn (Solid-phase peptide synthesis-SPPS) cho phép kết hợp các axit amin không tự nhiên và/hoặc cải biến khung peptit/protein. Các dạng SPPS khác nhau, như Fmoc và Boc, là có sẵn để tổng hợp polypeptit theo sáng chế. Chi tiết về quá trình tổng hợp hóa học là đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, Ganesan A. 2006 *Mini Rev. Med. Chem.* 6: 3-10; và Camarero J. A. *et al.*, 2005 *Protein Pept Lett.* 12: 723-8).

Tổng hợp peptit ở pha rắn có thể được tiến hành như được mô tả dưới đây. Các nhóm chức α ($N\alpha$) và các mạch bên phản ứng bất kỳ được bảo vệ bằng các nhóm không bền với axit hoặc các nhóm không bền với bazơ. Các nhóm bảo vệ này ổn định trong các điều kiện để liên kết các liên kết amit nhưng có thể được phân cắt dễ dàng mà không làm ảnh hưởng đến chuỗi peptit tạo thành. Các nhóm bảo vệ thích hợp cho nhóm chức α -amino bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm sau: t-butyloxycarbonyl (Boc), benzyloxycarbonyl (Z), o-chlorbenzyloxycarbonyl, bi-phenylisopropylloxycarbonyl, tert-amylloxycarbonyl (Amoc), α,α -dimethyl-3,5-dimethoxy-benzyloxycarbonyl, o-nitrosulphenyl, 2-cyano-t-butoxy-carbonyl, 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl (Dde) và nhóm tương tự.

Các nhóm bảo vệ mạch bên thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: acetetyl, allyl (All), allyloxycarbonyl (Alloc), benzyl (Bzl), benzyloxycarbonyl (Z), t-butyloxycarbonyl (Boc), benzyloxymethyl (Bom), o-bromobenzyloxycarbonyl, t-butyl

(tBu), t-butyl dimethylsilyl, 2-clobenzyl, 2-clobenzyloxycarbonyl (2-CIZ), 2,6-diclobenzyl, xyclohexyl, xyclopentyl, 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)etyl (Dde), isopropyl, 4-metoxi-2,3,6-trimetylbenzylsulfonyl (Mtr), 2,3,5,7,8-pentametylchroman-6-sulfonyl (Pmc), pivalyl, tetrahydropyran-2-yl, tosyl (Tos), 2,4,6-trimetoxibenzyl, trimethylsilyl và trityl (Trt).

Theo phương pháp tổng hợp ở pha rắn, axit amin ở đầu tận cùng C được liên kết với vật liệu mang thích hợp. Các vật liệu mang thích hợp là các vật liệu mà trở đối với các chất phản ứng và các điều kiện phản ứng đối với các phản ứng phân cắt và ngưng tụ từng bước của quy trình tổng hợp và không hòa tan trong môi trường phản ứng được sử dụng. Ví dụ về các vật liệu mang sẵn có trên thị trường bao gồm các copolyme styren/divinylbenzen mà đã được cải biến bằng các nhóm phản ứng và/hoặc polyetylen glycol; copolyme styren/divinylbenzen được clometyl hóa; copolyme styren/divinylbenzen được hydroxymetyl hóa hoặc được aminometyl hóa và vật liệu tương tự. Polystyren (1%)-divinylbenzen hoặc TentaGel® được dẫn xuất với rượu 4-benzyloxybenzyl (neo Wang) hoặc 2-clotrityl clorua có thể được sử dụng nếu được dự định để điều chế axit peptidic. Trong trường hợp peptit amit, polystyren (1%) divinylbenzen hoặc TentaGel® được tạo dẫn xuất với axit 5-(4'-aminometyl)-3',5'-dimetoxiphenoxi)-valeric (neo PAL) hoặc nhóm p-(2,4-dimetoxiphenyl-amino metyl)-phenoxi (neo amit Rink) có thể được sử dụng.

Liên kết với vật liệu mang dạng polyme có thể được thực hiện bằng cách cho axit amin được bảo vệ Fmoc ở đầu tận cùng C phản ứng với vật liệu mang có bổ sung chất hoạt hóa trong etanol, axetonitril, N,N-dimetylformamit (DMF), diclometan, tetrahydrofuran, N-metylpyrrolidon hoặc các dung môi tương tự ở nhiệt độ trong phòng hoặc nhiệt độ cao (ví dụ, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C) và thời gian phản ứng, ví dụ nằm trong khoảng từ 2 đến 72 giờ.

Việc liên kết axit amin được bảo vệ N α (ví dụ, axit amin Fmoc) với neo PAL, Wang hoặc Rink có thể, ví dụ, được tiến hành với sự trợ giúp của chất liên kết như N,N'-dixyclohexylcarbodiimit (DCC), N,N'-diisopropylcarbodiimit (DIC) hoặc các carbodiimit khác, 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroni tetraflorurat (TBTU) hoặc các muối uroni khác, o-axyl-ure, benzotriazol-1-yl-Tris-pyrrolidinophosphoni hexaflorophosphat (PyBOP) hoặc các muối phosphoni khác, N-hydroxysuccinimit, các N-hydroxyimit khác hoặc các oxim khi có mặt hoặc kể cả không có mặt

1-hydroxybenzotriazol hoặc 1-hydroxy-7-azabenzotriazol, ví dụ, với sự trợ giúp của TBTU có bổ sung hydroxybenzotriazol (HOBt), có hoặc không bổ sung bazơ như, ví dụ, diisopropyletylamin (DIEA), trietylamin hoặc N-metylmorpholin, ví dụ, diisopropyletylamin với thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 2 đến 72 giờ (ví dụ, 3 giờ nếu lượng axit amin hoặc chất liên kết vượt quá từ 1,5 đến 3 lần, ví dụ, vượt quá 2 lần và ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 50°C, ví dụ, 25°C trong dung môi như dimetylformamit, N-metylpyrrolidon hoặc diclometan, ví dụ, dimetylformamit).

Thay vì chất liên kết, cũng có thể sử dụng este hoạt động (ví dụ, pentaflorophenyl, p-nitrophenyl hoặc chất tương tự), anhydrit đối xứng của N α -Fmoc-axit amin, clorua axit của nó hoặc florua axit trong các điều kiện được mô tả trên đây.

Axit amin được bảo vệ N α (ví dụ, axit amin Fmoc) có thể được liên kết với nhựa 2-clotrityl trong diclometan có bổ sung DIEA với thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 10 đến 120 phút, ví dụ, 20 phút, nhưng không chỉ giới hạn ở sử dụng dung môi này và bazơ này.

Việc liên kết liên tục axit amin được bảo vệ có thể được tiến hành theo các phương pháp thông thường trong tổng hợp peptit, thường trong thiết bị tổng hợp peptit tự động. Sau khi phân cắt nhóm bảo vệ N α -Fmoc của axit amin được liên kết trên pha rắn bằng cách xử lý bằng, ví dụ, piperidin (10% đến 50%) trong dimetylformamit trong thời gian từ 5 đến 20 phút, ví dụ, 2 x 2 phút với 50% piperidin trong DMF và 1 x 15 phút với 20% piperidin trong DMF, axit amin được bảo vệ tiếp theo với lượng vượt quá từ 3 đến 10 lần, ví dụ vượt quá 10 lần, được liên kết với axit amin trước trong dung môi trơ, không chứa nước, phân cực như diclometan, DMF hoặc hỗn hợp hai dung môi này và ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 50°C, ví dụ ở nhiệt độ 25°C. Các chất phản ứng nêu trên để liên kết axit amin N α -Fmoc thứ nhất với neo PAL, Wang hoặc Rink là thích hợp làm chất liên kết. Các este hoạt động của axit amin được bảo vệ, hoặc clorua hoặc florua hoặc anhydrit đối xứng của chúng cũng có thể được sử dụng làm các chất liên kết khác.

Kết thúc quá trình tổng hợp trên pha rắn, peptit này được phân cắt từ vật liệu mang đồng thời phân cắt các nhóm bảo vệ ở mạch bên. Phân cắt có thể được tiến hành bằng axit trifloaxetic hoặc môi trường axit mạnh khác có bổ sung chất tẩy tạp với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 20% thể tích/thể tích như dimetylsulfua, etylmetylsulfua, thioanisol, thiocresol, m-cresol, anisol etandithiol, phenol hoặc nước, ví dụ, 15% thể

tích/thể tích dimethylsulfua/etandithiol/m-cresol 1:1:1, trong khoảng thời gian từ 0,5 đến 3 giờ, ví dụ, 2 giờ. Các peptit có các mạch bên được bảo vệ đầy đủ được tạo ra bằng cách phân cắt neo 2-clotrityl bằng axit axetic bằng/trifloetanol/diclometan 2:2:6. Peptit được bảo vệ có thể được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel. Nếu peptit được liên kết với pha rắn nhờ neo Wang và nếu nó được dự định để tạo ra peptit được alkylamit hóa ở đầu tận cùng C, thì sự phân cắt này có thể được tiến hành bằng cách phân hủy amin bằng alkylamin hoặc floalkylamin. Phân hủy amin được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10°C đến 50°C (ví dụ, khoảng 25°C), thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 12 đến 24 giờ (ví dụ, khoảng 18 giờ). Ngoài ra, peptit có thể được phân cắt khỏi vật liệu mang bằng cách este hóa lại, ví dụ bằng metanol.

Dung dịch axit được tạo thành có thể được trộn với ete lạnh hoặc n-hexan với lượng lớn hơn gấp 3 đến 20 lần, ví dụ dietyl ete với lượng lớn hơn gấp 10 lần để kết tủa peptit và nhờ đó tách được các chất tẩy tạp và phân cắt các nhóm bảo vệ còn lại trong ete. Quy trình tinh chế khác có thể được tiến hành bằng cách kết tủa lại peptit một vài lần từ axit axetic băng. Chất kết tủa thu được có thể được cho vào trong nước, hoặc tert-butanol hoặc hỗn hợp của hai dung môi này, ví dụ hỗn hợp tert-butanol/nước có tỷ lệ 1:1, và được sấy lạnh

Peptit thu được có thể được tinh chế bằng các phương pháp sắc ký khác nhau, bao gồm phương pháp sắc ký trao đổi ion qua nhựa bazơ yếu ở dạng axetat; sắc ký hấp phụ kỵ nước trên các copolyme polystyren/divinylbenzen không được tạo dẫn xuất (ví dụ, Amberlite® XAD); sắc ký hấp phụ trên silicagel; sắc ký trao đổi ion, ví dụ, trên carboxymetyl xenluloza; sắc ký phân bố, ví dụ trên Sephadex® G-25; sắc ký phân bố ngược dòng; hoặc sắc ký lỏng hiệu năng cao (high pressure liquid chromatography-HPLC) ví dụ HPLC pha đảo trên các pha octyl hoặc octadexylsilylsilica (ODS).

B. Tổng hợp nhờ tái tổ hợp

Nếu polypeptit được tổng hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp, thì polypeptit có thể được tổng hợp dưới dạng protein nội bào hoặc dưới dạng protein được tiết, bằng cách sử dụng cấu trúc thích hợp bất kỳ và tế bào chủ thích hợp bất kỳ, có thể là tế bào không nhân hoặc tế bào nhân thực, như tế bào chủ vi khuẩn (ví dụ, *E. coli*) hoặc nấm men, tương ứng. Các ví dụ khác về các tế bào có nhân thực có thể được sử dụng làm tế bào chủ bao gồm các tế bào côn trùng, tế bào của động vật có vú, và/hoặc tế bào thực vật. Nếu các tế bào chủ của động vật có vú được sử dụng, thì chúng có thể

bao gồm các tế bào của người (ví dụ, các tế bào HeLa, 293, H9 và Jurkat); các tế bào của chuột (ví dụ, các tế bào NIH3T3, L, và các tế bào C127); các tế bào của động vật linh trưởng (ví dụ, Cos 1, Cos 7 và CV1) và các tế bào của chuột đồng (ví dụ, tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary-CHO)). Theo các phương án cụ thể, polypeptit được tổng hợp trong tế bào CHO. Theo các phương án khác, polypeptit được tổng hợp trong tế bào nấm men và theo các phương án cụ thể có thể là tế bào nấm men được thao tác di truyền để tạo ra các glycoprotein có các N-glycan giống động vật có vú.

Nhiều hệ vật truyền chủ thích hợp để biểu hiện polypeptit có thể được sử dụng theo các quy trình chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ xem tài liệu, Sambrook *et al.*, 1989 *Current Protocols in Molecular Biology* Cold Spring Harbor Press, New York; và Ausubel *et al.* 1995 *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds. Wiley và Sons. Các phương pháp đưa nguyên liệu di truyền vào tế bào chủ bao gồm các phương pháp, ví dụ, biến nạp, xung điện, tiếp hợp, phương pháp dùng canxi phosphat và phương pháp tương tự. Phương pháp vận chuyển có thể được chọn để tạo ra sự biểu hiện ổn định axit nucleic mã hóa polypeptit được đưa vào. Axit nucleic mã hóa polypeptit có thể được đề xuất ở dạng yếu tố episom di truyền (ví dụ, plasmit) hoặc có thể được kết hợp vào bộ gen. Nhiều vật truyền thích hợp dùng để tổng hợp polypeptit quan tâm là sẵn có trên thị trường.

Các vật truyền có thể được duy trì ngoài nhiễm sắc thể trong tế bào chủ hoặc có thể được kết hợp vào bộ gen của tế bào chủ. Vật truyền biểu hiện cung cấp các trình tự điều hòa phiên mã và dịch mã và có thể cung cấp cho sự biểu hiện cơ định và dễ cảm ứng nếu vùng mã hóa được liên kết chức năng dưới sự kiểm soát phiên mã của vùng khởi đầu phiên mã, và vùng kết thúc dịch mã và phiên mã. Nói chung, các trình tự điều hòa phiên mã và dịch mã có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, các trình tự khởi đầu và kết thúc phiên mã, các trình tự khởi đầu và kết thúc dịch mã, và các trình tự tăng cường hoặc trình tự hoạt hóa. Các trình tự khởi đầu có thể là trình tự cơ bản hoặc dễ cảm ứng, và có thể là trình tự khởi đầu cơ định mạnh (ví dụ, T7).

Các cấu trúc biểu hiện thường có các vị trí giới hạn thích hợp nằm ở gần trình tự khởi đầu để cài các trình tự axit nucleic mã hóa các protein quan tâm. Chỉ thị chọn lọc hoạt động trong tế bào chủ biểu hiện có thể có mặt để dễ dàng chọn lọc các tế bào mang

vật truyền. Ngoài ra, cấu trúc biểu hiện có thể bao gồm các yếu tố khác. Ví dụ, vật truyền biểu hiện có thể có một hoặc hai hệ tái bản, do đó cho phép nó được duy trì trong tế bào sinh vật, ví dụ, trong tế bào động vật có vú hoặc tế bào côn trùng để biểu hiện và trong tế bào chủ không nhân để tách dòng và khuếch đại. Ngoài ra, cấu trúc biểu hiện có thể mang gen chỉ thị chọn lọc để cho phép chọn lọc các tế bào chủ đã biến nạp. Các gen chọn lọc là đã biết rõ trong lĩnh vực này và sẽ thay đổi theo thể bào chủ được sử dụng.

Phân lập và tinh chế protein có thể được thực hiện theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, protein có thể được phân lập từ dịch phân giải tế bào được biến đổi di truyền để biểu hiện protein một cách cơ định và/hoặc nhờ cảm ứng, hoặc từ hỗn hợp phản ứng tổng hợp bằng cách tinh chế ái lực miễn dịch, mà thường bao gồm cho mẫu này tiếp xúc với kháng thể kháng protein, rửa để loại bỏ nguyên liệu không gắn kết đặc hiệu, và giải hấp protein gắn kết đặc hiệu. Protein phân lập có thể còn được tinh chế bằng các phương pháp thẩm tách và phương pháp khác thường được sử dụng trong các phương pháp tinh chế protein. Theo một phương án, protein này có thể được phân lập bằng cách sử dụng các phương pháp sắc ký chelat kim loại. Các protein này có thể bao gồm các cải biến để dễ dàng phân lập.

Các polypeptit có thể được tổng hợp ở dạng phân lập hoặc gần như tinh khiết (ví dụ, không chứa các polypeptit khác). Các polypeptit có thể có mặt trong chế phẩm mà được làm giàu polypeptit này so với các thành phần khác có mặt trong đó (ví dụ, các polypeptit khác hoặc các thành phần tế bào chủ khác). Ví dụ, polypeptit đã tinh chế có thể được tạo ra sao cho polypeptit có mặt trong chế phẩm mà hầu như không chứa các protein được biểu hiện khác, ví dụ với lượng nhỏ hơn 90%, nhỏ hơn 60%, nhỏ hơn 50%, nhỏ hơn 40%, nhỏ hơn 30%, nhỏ hơn 20%, nhỏ hơn 10%, nhỏ hơn 5%, hoặc nhỏ hơn 1%, của chế phẩm chứa các protein được biểu hiện khác.

Các kháng thể

Sáng chế đề xuất các kháng thể, kể cả các kháng thể phân lập mà gắn kết đặc hiệu với polypeptit hoặc protein dung hợp theo sáng chế. Thuật ngữ “kháng thể” bao gồm kháng thể đơn dòng nguyên vẹn, kháng thể đa dòng, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép) được tạo thành từ ít nhất hai kháng thể nguyên vẹn, và các đoạn gắn kết kháng thể bao gồm Fab và F(ab)₂, miễn là chúng gắn kết đặc hiệu với

polypeptit hoặc protein dung hợp theo sáng chế. Đơn vị cấu trúc của nguyên kháng thể cơ bản bao gồm tetrame, và mỗi tetrame bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi “nhẹ” (khoảng 25 kDa) và một chuỗi “nặng” (khoảng 50kDa đến 70 kDa). Phần đầu tận cùng amino của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi có từ 100 đến 110 axit amin hoặc nhiều hơn chủ yếu có vai trò nhận diện kháng nguyên. Ngược lại, phần đầu tận cùng carboxy của mỗi chuỗi xác định một vùng cố định về cơ bản có chức năng hiệu ứng. Các chuỗi nhẹ của người được phân loại là kappa và lambda, trong khi đó các chuỗi nặng của người được phân loại là mu, delta, gamma, alpha, hoặc epsilon, và xác định isotyp của kháng thể như IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE, tương ứng. Các đoạn gắn kết được tạo ra bởi các kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc bằng cách phân cắt hóa học hoặc bằng enzym các kháng thể nguyên vẹn. Các đoạn gắn kết bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, và các kháng thể chuỗi đơn.

Mỗi chuỗi nặng có một vùng biến đổi (variable domain-VH) ở một đầu sau đó là số vùng cố định. Mỗi chuỗi nhẹ có một vùng biến đổi ở một đầu (VL) và một vùng cố định ở đầu còn lại; vùng cố định của chuỗi nhẹ được sắp thẳng hàng với vùng cố định thứ nhất của chuỗi nặng, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được sắp thẳng hàng với vùng biến đổi của chuỗi nặng. Trong các chuỗi nặng và nhẹ, các vùng biến đổi và cố định được liên kết với nhau bởi vùng "J" có khoảng 12 axit amin hoặc nhiều hơn, trong đó chuỗi nặng cũng bao gồm vùng "D" có khoảng hơn 10 axit amin. Các chuỗi kháng thể đều có cấu trúc chung giống nhau gồm các vùng khung (framework region – FR) tương đối được bảo toàn được liên kết bởi ba vùng siêu biến, cũng được gọi là “vùng quyết định bổ sung” hoặc “CDR”. Các CDR từ hai chuỗi của mỗi cặp được sắp thẳng hàng bởi các vùng khung, nhờ đó gắn kết được với epitop đặc hiệu. Từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bao gồm các vùng FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4.

Kháng thể nguyên vẹn có hai vị trí gắn kết và, trừ các kháng thể đặc hiệu kép hoặc có chức năng kép, thì hai vị trí gắn kết là giống nhau. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc có chức năng kép là một kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ khác nhau và hai vị trí gắn kết khác nhau. Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bởi nhiều phương pháp bao gồm dung hợp các tế bào lai hoặc liên kết các đoạn Fab.

Như nêu trên, các đoạn gắn kết có thể được tạo ra bằng cách phân cắt các kháng thể nguyên vẹn bằng enzym hoặc bằng phương pháp hóa học. Phân cắt các kháng thể

bằng enzym papain tạo ra hai đoạn gắn kết kháng nguyên giống nhau, cũng được biết đến là các đoạn “Fab”, và đoạn “Fc” không có hoạt tính gắn kết với kháng nguyên. Phân cắt kháng thể bằng enzym pepsin tạo ra đoạn $F(ab')_2$ trong đó hai nhánh của phân tử kháng thể vẫn được liên kết và bao gồm hai vị trí gắn kết với kháng nguyên. Đoạn $F(ab')_2$ có khả năng liên kết chéo với kháng nguyên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “Fab” được dùng để chỉ đoạn kháng thể mà bao gồm các vùng VH và VL cũng như là vùng cố định của chuỗi nhẹ và vùng CH1 của chuỗi nặng.

Nếu được sử dụng ở đây, thuật ngữ “Fv” được dùng để chỉ đoạn tối thiểu của kháng thể mà vẫn còn cả vị trí gắn kết với kháng nguyên và vị trí nhận diện kháng nguyên. Ở các phân tử có hai chuỗi Fv, thì vùng này bao gồm một dime có một vùng biến đổi chuỗi nặng và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết không cộng hóa trị. Ở các phân tử có một chuỗi Fv, một vùng biến đổi chuỗi nặng và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể được liên kết cộng hóa trị bởi trình tự liên kết peptit linh động sao cho các chuỗi nặng và nhẹ có thể liên kết với nhau theo kiểu cấu trúc “dime” tương tự với cấu trúc ở các phân tử có hai chuỗi Fv. Trong cấu hình này ba CDR của mỗi vùng biến đổi tương tác với nhau để xác định vị trí gắn kết với kháng nguyên trên bề mặt của dime VH-VL. Trong khi đó sáu CDR, nói chung, tạo ra tính đặc hiệu gắn kết với kháng nguyên cho kháng thể, thậm chí một vùng biến đổi (hoặc một nửa Fv chỉ bao gồm ba CDR đặc hiệu với kháng nguyên) có khả năng nhận diện và liên kết với kháng nguyên.

Nếu được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vùng quyết định bổ sung” hoặc “CDR” được dùng để chỉ các phần của thụ thể miễn dịch tiếp xúc với phối tử đặc hiệu và quyết định tính đặc hiệu của nó.

Thuật ngữ “vùng siêu biến” được dùng để chỉ các gốc axit amin của kháng thể mà gắn kết với kháng nguyên. Vùng siêu biến thường bao gồm các gốc axit amin từ CDR và/hoặc các gốc từ “vùng siêu biến”.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “epitop” được dùng để chỉ các vị trí gắn kết cho các kháng thể trên các kháng nguyên protein. Các quyết định epitop thường bao gồm các nhóm có hoạt tính hóa học trên bề mặt của các phân tử như axit amin hoặc các mạch bên của đường, cũng như là các đặc tính tích điện và cấu trúc ba chiều đặc hiệu. Kháng thể được cho là gắn kết với kháng nguyên nếu hằng số phân ly $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, hoặc $\leq 10\text{nM}$. Hằng số cân bằng (“ K_D ”) tăng có nghĩa là ái lực giữa epitop và kháng thể

nhỏ, trong khi đó hằng số cân bằng giảm có nghĩa là ái lực giữa epitop và kháng thể lớn. Kháng thể có K_D “không lớn hơn” một lượng nhất định có nghĩa là kháng thể này sẽ gắn kết với epitop với K_D nhất định hoặc lớn hơn. Trong khi K_D thể hiện các đặc tính gắn kết của epitop và kháng thể, thì thuật ngữ “hiệu lực” thể hiện hiệu quả của chính kháng thể đối với chức năng của kháng thể. Không nhất thiết phải có mối tương quan giữa hằng số cân bằng và hiệu lực, vì thế ví dụ, K_D tương đối thấp không tự động có nghĩa là hiệu lực cao.

Thuật ngữ “gắn kết chọn lọc” đối với kháng thể không có nghĩa là kháng thể chỉ gắn kết với một chất, mà còn có nghĩa là K_D của kháng thể với chất thứ nhất là nhỏ hơn K_D của kháng thể với chất thứ hai. Kháng thể mà chỉ gắn kết với một epitop chỉ gắn kết với một epitop đó.

Nếu được dùng cho người, các kháng thể mà bao gồm các vùng cố định và/hoặc biến đổi của loài gặm nhấm (tức là, chuột nhắt hoặc chuột cống) đôi khi có liên quan đến sự thanh thải nhanh khỏi cơ thể hoặc sự tạo ra đáp ứng miễn dịch bởi cơ thể chống lại kháng thể này. Để tránh sử dụng các kháng thể có nguồn gốc từ loài gặm nhấm, kháng thể đầy đủ của người có thể được tạo ra nhờ kết hợp chức năng của kháng thể của người vào loài gặm nhấm sao cho loài gặm nhấm tạo ra kháng thể của người đầy đủ. Trừ khi được quy định cụ thể ở đây, thuật ngữ kháng thể “của người” và “đầy đủ của người” có thể được sử dụng thay thế cho nhau. Thuật ngữ “đầy đủ của người” có thể hữu dụng khi phân biệt các kháng thể chỉ một phần có nguồn gốc từ người với các kháng thể mà hoàn toàn hoặc đầy đủ từ người. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu được các phương pháp khác nhau để tạo ra các kháng thể đầy đủ của người.

Để nhằm vào các đáp ứng kháng thể kháng chuột của người có thể có, kháng thể khảm hoặc mặt khác được làm tương thích với người có thể được sử dụng. Các kháng thể khảm có vùng cố định của người và vùng biến đổi của chuột, và vì thế, có thể quan sát thấy các đáp ứng kháng thể kháng khảm của người ở một vài bệnh nhân. Do đó, thích hợp là tạo ra các kháng thể của người đầy đủ chống lại các enzym multime để tránh các đáp ứng của kháng thể kháng chuột của người hoặc đáp ứng của kháng thể kháng khảm của người.

Các kháng thể đơn dòng đầy đủ của người có thể được tổng hợp, ví dụ, bằng cách tạo ra các dòng tế bào lai bằng các kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung

biên trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp tổng hợp khác có liên quan đến việc sử dụng các trình tự mã hóa các kháng thể cụ thể để biến nạp vào tế bào chủ thích hợp của động vật có vú, như tế bào CHO. Biến nạp có thể bằng phương pháp đã biết bất kỳ để đưa các polynucleotit vào tế bào chủ, bao gồm ví dụ, bao gói polynucleotit trong virut (hoặc trong vật truyền virut) và truyền virut (hoặc vật truyền) vào tế bào chủ hoặc các quy trình chuyển nhiễm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp đưa các polynucleotit khác nguồn gốc vào tế bào của động vật có vú là đã biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm chuyển nhiễm qua trung gian dextran, kết tủa bằng canxi phosphat, chuyển nhiễm qua trung gian polybren, dung hợp tế bào trần, xung điện, bao nang (các polynucleotit trong liposom, và vi tiêm trực tiếp ADN vào nhân. Các dòng tế bào của động vật có vú sẵn có dùng làm tế bào chủ để biểu hiện là đã biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào CHO, các tế bào HeLa, và các tế bào caxinôm tế bào gan của người.

Các kháng thể có thể được sử dụng để phát hiện polypeptit theo sáng chế. Ví dụ, các kháng thể có thể được sử dụng làm chất chẩn đoán bằng cách phát hiện lượng của một hoặc nhiều polypeptit theo sáng chế ở đối tượng, và so sánh lượng đã phát hiện với lượng đối chứng chuẩn hoặc với lượng cơ sở ở đối tượng được xác định trước (ví dụ, trước khi bị bệnh bất kỳ).

Một phương án khác, sáng chế bộc lộ cách sử dụng một hoặc nhiều kháng thể vùng chức năng của người (domain antibody-dAb). Các dAb là các đơn vị gắn kết chức năng nhỏ nhất của các kháng thể của người (IgG) và có các đặc tính độ ổn định và độ hòa tan tốt. Công nghệ tạo ra (các) dAb tiếp hợp với HSA (nhờ đó tạo ra “AlbudAb”; xem ví dụ patent châu Âu số, EP1517921B, công bố đơn quốc tế số WO2005/118642 và WO2006/051288) và phân tử quan tâm (ví dụ, trình tự polypeptit theo sáng chế). Các AlbudAb thường nhỏ hơn và dễ sản xuất hơn trong hệ biểu hiện vi sinh vật, như vi khuẩn hoặc nấm men, so với các công nghệ hiện nay được dùng để kéo dài thời gian bán thải trong huyết thanh của các polypeptit. Vì HSA có thời gian bán thải khoảng ba tuần, nên phân tử được tiếp hợp thu được cải thiện được thời gian bán thải của phân tử quan tâm. Sử dụng công nghệ dAb cũng có thể làm tăng hiệu quả của phân tử quan tâm.

Sử dụng để phòng ngừa và điều trị

Sáng chế bộc lộ phương pháp phòng hoặc điều trị các bệnh chuyển hóa hoặc bệnh có liên quan đến chuyển hóa, như, bệnh béo phì và các rối loạn thể trọng khác, tăng glucoza huyết, tăng insulin huyết, không dung nạp glucoza, và rối loạn chuyển hóa glucoza, bằng cách sử dụng các polypeptit, hoặc chế phẩm chứa chúng, như được mô tả ở đây. Các phương pháp này cũng có thể có tác dụng tốt đến một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan đến bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh nhờ, ví dụ, làm giảm mức độ nặng hoặc tần suất của triệu chứng. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị rối loạn thể trọng hoặc rối loạn chuyển hóa glucoza bằng cách sử dụng các polypeptit, dime được N-glycosyl hóa hoặc chế phẩm chứa chúng. Theo phương án cụ thể, sáng chế mô tả phương pháp làm giảm hấp thu thức ăn hoặc làm giảm thể trọng bằng cách sử dụng các polypeptit, dime được N-glycosyl hóa hoặc chế phẩm chứa chúng. Sáng chế còn bộc lộ cách sử dụng các trình tự nêu trên, các polypeptit, dime được N-glycosyl hóa hoặc chế phẩm chứa chúng để sản xuất thuốc để điều trị tình trạng bệnh được chọn từ bệnh chuyển hóa hoặc bệnh có liên quan đến chuyển hóa, như, bệnh béo phì và các rối loạn thể trọng khác, tăng glucoza huyết, tăng insulin huyết, không dung nạp glucoza, và rối loạn chuyển hóa glucoza. Sáng chế còn bộc lộ cách sử dụng các trình tự nêu trên, các polypeptit, dime được N-glycosyl hóa hoặc chế phẩm chứa chúng để sản xuất thuốc dùng để điều trị rối loạn chuyển hóa glucoza hoặc rối loạn thể trọng. Sáng chế còn bộc lộ cách sử dụng các trình tự nêu trên, các polypeptit, dime được N-glycosyl hóa hoặc chế phẩm chứa chúng để sản xuất thuốc dùng để làm giảm sự hấp thu thức ăn hoặc giảm thể trọng.

Để xác định liệu một đối tượng có phải là đối tượng dự tuyển để điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn thể trọng không (ví dụ, béo phì) bằng các phương pháp được đề xuất ở đây, các thông số như, nhưng không chỉ giới hạn ở, căn bệnh học và mức tình trạng bệnh của đối tượng (ví dụ, cách so sánh thừa cân ở đối tượng với đối tượng khỏe mạnh viện dẫn) cần được đánh giá. Ví dụ, người trưởng thành có BMI nằm trong khoảng từ $\sim 25\text{kg/m}^2$ đến $\sim 29,9\text{kg/m}^2$ có thể được coi là thừa cân (tiền béo phì), trong khi đó người trưởng thành có BMI $\sim 30\text{kg/m}^2$ hoặc cao hơn có thể được coi là béo phì. Như được bàn luận ở đây, các polypeptit theo sáng chế có thể có tác dụng ức chế sự thèm ăn, ví dụ, làm giảm sự thèm ăn dẫn đến làm giảm thể trọng.

Để xác định liệu một đối tượng có phải là đối tượng dự tuyển để điều trị hoặc phòng ngừa chứng tăng glucoza huyết, tăng insulin huyết, không dung nạp glucoza,

và/hoặc rối loạn glucoza bằng các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này, các phương pháp chẩn đoán khác nhau đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Các phương pháp này bao gồm các phương pháp được mô tả ở đây (ví dụ, đánh giá glucoza trong huyết tương lúc đói (FPG) và thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng (oral glucoza tolerance test-oGTT)).

Các polypeptit và các protein dung hợp được đề xuất theo sáng chế, nếu được dùng cho đối tượng để phòng hoặc điều trị các bệnh chuyển hóa hoặc các bệnh có liên quan đến chuyển hóa, như bệnh béo phì và các rối loạn thể trọng khác, tăng glucoza huyết, tăng insulin huyết, không dung nạp glucoza, rối loạn chuyển hóa glucoza, có thể dẫn đến làm giảm lượng glucoza trong máu, giảm thể trọng, và/hoặc giảm sự hấp thu thức ăn.

Theo các phương án nhất định, các polypeptit và các protein dung hợp được mô tả ở đây có thể làm giảm lượng glucoza trong máu, giảm thể trọng, và/hoặc giảm sự hấp thu thức ăn ít nhất 5% so với mức không dùng các polypeptit hoặc các protein dung hợp. Ví dụ, các polypeptit và các protein dung hợp được mô tả ở đây có thể làm giảm lượng glucoza trong máu, thể trọng, và/hoặc sự hấp thu thức ăn ít nhất 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% so với trước khi bắt đầu điều trị hoặc phòng ngừa.

Dược phẩm

Polypeptit theo sáng chế có thể ở dạng chế phẩm thích hợp để dùng cho đối tượng. Nói chung, các chế phẩm này là “dược phẩm” chứa một hoặc nhiều polypeptit và một hoặc nhiều chất pha loãng, chất mang hoặc tá dược được dùng hoặc sinh lý dụng. Theo các phương án nhất định, các polypeptit có mặt với lượng hữu hiệu để điều trị. Dược phẩm có thể được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế; do đó, ví dụ, các dược phẩm có thể được sử dụng *ex vivo* hoặc *in vivo* cho đối tượng để thực hiện các phương pháp phòng ngừa và điều trị và sử dụng được mô tả ở đây.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế tương thích với phương pháp dự định hoặc đường dùng; các đường dùng được lấy làm ví dụ được nêu ở đây. Ngoài ra, các dược phẩm có thể được dùng kết hợp các hoạt chất hoặc hợp chất điều trị khác (ví dụ, chất hạ glucoza) như được mô tả ở đây để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh, rối loạn và các tình trạng bệnh như được mô tả bởi sáng chế.

Dược phẩm này thường chứa một lượng hữu hiệu của ít nhất một trong số các polypeptit được mô tả bởi sáng chế và một hoặc nhiều chất bảo chế được dụng hoặc sinh lý dụng. Các chất pha loãng, chất mang hoặc tá dược được dụng hoặc sinh lý dụng thích hợp, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất chống oxy hóa (ví dụ, axit ascorbic và natri bisulfat), các chất bảo quản (ví dụ, rượu benzylic, metyl paraben, etyl hoặc n-propyl, p-hydroxybenzoat), chất nhũ hóa, chất tạo hỗn dịch, chất phân tán, dung môi, chất phụ gia, chất độn, chất tẩy, dung dịch đệm, chất dẫn, chất pha loãng, và/hoặc tá dược. Ví dụ, chất dẫn thích hợp có thể là dung dịch nước muối sinh lý hoặc dung dịch nước muối được đệm xitrat, có thể được bổ sung các nguyên liệu khác phổ biến ở dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa. Dung dịch nước muối được đệm trung tính hoặc dung dịch nước muối được trộn với albumin huyết thanh còn là các chất dẫn được lấy làm ví dụ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng biết được nhiều dung dịch đệm mà có thể được dùng trong các dược phẩm và các dạng liều. Các dung dịch đệm điển hình bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit yếu được dụng, bazơ yếu hoặc hỗn hợp của chúng. Theo một ví dụ, các thành phần đệm có thể là các nguyên liệu hòa tan trong nước như axit phosphoric, axit tartric, axit lactic, axit succinic, axit citric, axit axetic, axit ascorbic, axit aspartic, axit glutamic, và các muối của chúng. Các chất đệm chấp nhận được bao gồm, ví dụ, dung dịch đệm Tris, N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(axit 2-etansulfonic) (HEPES), axit 2-(N-morpholino)etansulfonic (MES), muối natri của axit 2-(N-Morpholino)etanesulfonic (MES), axit 3-(N-morpholino)propansulfonic (MOPS), và axit N-Tris[hydroxymetyl]metyl-3-amino-propansulfonic (TAPS).

Sau khi dược phẩm đã được bào chế, dược phẩm này có thể được bảo quản trong lọ vô trùng ở dạng dung dịch, hỗn dịch, gel, nhũ tương, chất rắn, hoặc bột được khử nước hoặc được đông khô. Các dược phẩm này có thể được bảo quản ở dạng sẵn có để dùng, dạng đông khô cần hoàn nguyên trước khi dùng, dạng lỏng cần pha loãng trước khi dùng, hoặc dạng được chấp nhận khác. Theo một vài phương án, dược phẩm được đề xuất trong đồ chứa dùng một lần (ví dụ, lọ dùng một lần, ampun, bơm tiêm, hoặc dụng cụ tiêm tự động (tương tự với, ví dụ EpiPen®)), trong khi đó đồ chứa dùng nhiều lần (ví dụ, lọ dùng nhiều lần) được đề xuất theo các phương án khác. Thiết bị phân phối thuốc bất kỳ có thể được dùng để phân phối các polypeptit, bao gồm các dụng cụ cấy (ví dụ, bơm có thể cấy được) và hệ ống thông, cả hai loại này đã biết rõ đối với người

có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các thuốc tiêm dự trữ, mà thường được dùng dưới da hoặc trong tĩnh mạch, cũng có thể được dùng để giải phóng các polypeptit được mô tả ở đây trong một khoảng thời gian xác định. Các thuốc tiêm dự trữ thường trên cơ sở chất rắn hoặc dầu và thường chứa ít nhất một trong số các thành phần bào chế nêu ở đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã quen với các dược phẩm có thể có và sử dụng các thuốc tiêm dự trữ.

Dược phẩm có thể ở dạng hỗn dịch chứa dầu hoặc chứa nước có thể tiêm được vô trùng. Hỗn dịch này có thể được bào chế theo giải pháp kỹ thuật đã biết nhờ sử dụng các chất gây rã hoặc chất làm ẩm và chất tạo hỗn dịch thích hợp nêu ở đây. Chế phẩm tiêm được vô trùng cũng có thể là dung dịch hoặc hỗn dịch tiêm được vô trùng trong chất pha loãng hoặc dung môi không độc dùng được ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, như dung dịch trong 1,3-butan diol. Các chất pha loãng, dung môi và môi trường phân tán chấp nhận được có thể được sử dụng bao gồm nước, dung dịch Ringer, dung dịch natri clorua đẳng trương, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) hoặc dung dịch nước muối được đệm phosphat (PBS), etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol lỏng), và hỗn hợp thích hợp của chúng. Ngoài ra, dầu không bay hơi vô trùng thường được dùng làm dung môi hoặc môi trường tạo hỗn dịch. Đối với mục đích này dầu trong không bay hơi có thể được sử dụng chứa mono- hoặc diglyxerit tổng hợp. Hơn thế nữa, các axit béo như axit oleic có thể được dùng để sản xuất thuốc tiêm. Bằng cách đưa chất làm chậm hấp thu vào (ví dụ, nhôm monostearat hoặc gelatin) có thể đạt được sự hấp thu kéo dài ở chế phẩm tiêm cụ thể.

Dược phẩm chứa hoạt chất (ví dụ, polypeptit theo sáng chế) có thể ở dạng thích hợp dùng qua đường miệng, ví dụ, ở dạng viên nén, viên nang, viên ngậm dẹp, viên hình thoi, hỗn dịch chứa nước hoặc chứa dầu, bột hoặc cốm dễ phân tán, nhũ tương, viên nang cứng hoặc mềm, hoặc siro, dung dịch, các hạt nhỏ hoặc cốm ngọt. Dược phẩm được dự định dùng qua đường miệng có thể được bào chế theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để sản xuất dược phẩm, và dược phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều chất như, ví dụ, chất làm ngọt, chất điều vị, chất tạo màu và chất bảo quản để tạo ra dược phẩm dễ chấp nhận và thích hợp. Viên nén, viên nang và dạng tương tự chứa hoạt chất cùng với các tá dược được dùng không độc thích hợp để bào chế viên nén. Các tá dược này có thể là, ví dụ, chất pha loãng, như canxi cacbonat, natri cacbonat, lactoza, canxi phosphat hoặc natri phosphat; chất tạo hạt và chất gây rã, ví dụ, tinh bột

ngô, hoặc axit alginic; chất liên kết, ví dụ tinh bột, gelatin hoặc acaxia, và chất làm trơn, ví dụ magie stearat, axit stearic hoặc bột talc.

Viên nén, viên nang và dạng tương tự thích hợp để dùng qua đường miệng có thể không được bao hoặc được bao bằng các kỹ thuật đã biết để làm chậm sự phân rã và sự hấp thu ở đường dạ dày ruột và nhờ đó tạo ra tác dụng kéo dài. Ví dụ, nguyên liệu làm trễ thời gian như glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl distearat có thể được sử dụng. Các dạng dược phẩm này cũng có thể được bao bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này để tạo thành các viên nén thẩm thấu dùng trong điều trị để giải phóng có kiểm soát. Các chất khác bao gồm các hạt thoái biến sinh học hoặc tương thích sinh học hoặc chất polyme như polyeste, axit polyamin, hydrogel, polyvinyl pyrrolidon, polyanhydrit, axit polyglycolic, etylen-vinylaxetat, metylxenluloza, carboxymetylxenluloza, protamin sulfat, hoặc copolyme lactit/glycolit, copolyme polylactit/glycolit, hoặc copolyme etyl-envinylaxetat để kiểm soát sự phân phối dược phẩm được dùng. Ví dụ, chất dùng qua đường miệng có thể được bày trong các vi nang được bào chế bằng các kỹ thuật tụ giọt hoặc polyme hóa bề mặt phân giới, nhờ sử dụng hydroxymetylxenluloza hoặc các vi nang gelatin hoặc vi nang poly (metylmecrolat), tương ứng, hoặc trong hệ phân phối thuốc dạng keo. Hệ phân tán dạng keo bao gồm các phức hợp đại phân tử, nang nano, tiểu cầu, vi hạt, và hệ trên cơ sở lipid, kể cả nhũ tương dầu trong nước, mixen, mixen kết hợp, và liposom. Các phương pháp bào chế liposom được mô tả trong, ví dụ, patent Mỹ số 4,235,871, 4,501,728, và 4,837,028. Các phương pháp bào chế các dược phẩm nêu trên là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các chế phẩm dùng qua đường miệng cũng có thể được thể hiện ở dạng viên nang gelatin cứng trong đó hoạt chất được trộn với chất pha loãng rắn trơ, ví dụ, canxi cacbonat, canxi phosphat, kaolin hoặc xenluloza vi tinh thể, hoặc ở dạng viên nang gelatin mềm trong đó hoạt chất được trộn với nước hoặc môi trường dầu, ví dụ dầu lạc, parafin lỏng, hoặc dầu oliu.

Hỗn dịch chứa nước chứa các nguyên liệu có hoạt tính cùng với các tá dược thích hợp để bào chế chúng. Các tá dược này có thể là chất tạo hỗn dịch, ví dụ natri carboxymetylxenluloza, metylxenluloza, hydroxy-propylmetylxenluloza, natri alginat, polyvinyl-pyrrolidon, gôm tragacan và gôm acacia; chất gây phân tán hoặc chất làm ẩm, ví dụ phosphatit có nguồn gốc trong tự nhiên (ví dụ, lecithin), hoặc các sản phẩm ngưng tụ của alkylen oxit và axit béo (ví dụ, polyoxy-etylen stearat), hoặc các sản phẩm

ngưng tụ của etylen oxit với rượu béo mạch dài (ví dụ, đối với heptadecaetylenoxyx-etanol), hoặc các sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với este riêng phần thu được từ các axit béo và hexitol (ví dụ, polyoxyetylen sorbitol monooleat), hoặc các sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với este riêng phần thu được từ axit béo và hexitol anhydrit (ví dụ, polyetylen sorbitan monooleat). Các hỗn dịch chứa nước cũng có thể chứa một hoặc nhiều chất bảo quản.

Các hỗn dịch chứa dầu có thể được bào chế bằng cách tạo hỗn dịch hoạt chất trong dầu thực vật, ví dụ dầu lạc, dầu oliu, dầu vừng hoặc dầu dừa, hoặc trong dầu khoáng như parafin lỏng. Các hỗn dịch chứa dầu có thể chứa chất làm đặc, ví dụ sáp ong, parafin rắn hoặc rượu xetylic. Các chất làm ngọt như các chất nêu trên, và các chất điều vị có thể được bổ sung để tạo ra chế phẩm dùng qua đường miệng có thể chấp nhận được.

Bột và cốm dễ phân tán thích hợp để bào chế hỗn dịch chứa nước bằng cách bổ sung nước để tạo ra hỗn hợp được chất với chất gây phân tán hoặc chất làm ẩm, chất tạo hỗn dịch và một hoặc nhiều chất bảo quản. Các chất gây phân tán hoặc làm ẩm và chất tạo hỗn dịch thích hợp được lấy làm ví dụ ở đây.

Dược phẩm theo sáng chế còn có thể ở dạng nhũ tương dầu trong nước. Pha dầu có thể là dầu thực vật, ví dụ dầu oliu hoặc dầu lạc, hoặc dầu khoáng, ví dụ, parafin lỏng, hoặc hỗn hợp của chúng. Các chất tạo nhũ tương thích hợp có thể là gồm có nguồn gốc trong tự nhiên, ví dụ, gồm acacia hoặc gồm tragacan; phosphatit có nguồn gốc trong tự nhiên, ví dụ, đậu tương, lecithin, và este hoặc este riêng phần thu được từ axit béo; hexitol anhydrit, ví dụ, sorbitan monooleat; và các sản phẩm ngưng tụ của các este riêng phần với etylen oxit, ví dụ, polyoxyetylen sorbitan monooleat.

Các chế phẩm cũng có thể bao gồm chất mang để bảo vệ chế phẩm tránh khỏi sự thoái biến hoặc bài tiết nhanh ra khỏi cơ thể, như chế phẩm giải phóng có kiểm soát, bao gồm miếng cấy, liposom, hydrogel, tiền dược chất và hệ phân phối được vi bao nang. Ví dụ, nguyên liệu làm trễ thời gian như glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl stearat một mình, hoặc kết hợp với sáp có thể được sử dụng.

Sáng chế bộc lộ cách sử dụng các polypeptit ở dạng thuốc đạn để dùng được chất qua đường trực tràng. Thuốc đạn có thể được bào chế bằng cách trộn dược chất với tá dược không gây kích ứng thích hợp mà ở dạng rắn ở nhiệt độ thông thường nhưng ở dạng lỏng ở nhiệt độ trực tràng và vì thế sẽ tan chảy trong trực tràng để giải phóng dược

chất. Các nguyên liệu như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bơ cacao và polyetylen glycol.

Các polypeptit được đề xuất theo sáng chế có thể ở dạng dược phẩm thích hợp khác bất kỳ (ví dụ, dạng xịt ở mũi hoặc dạng xông hít) hiện đã biết hoặc được phát triển trong tương lai.

Nồng độ của polypeptit hoặc đoạn của nó trong chế phẩm có thể khác nhau nhiều (ví dụ, từ ít hơn 0,1%, thường bằng hoặc ít nhất khoảng 2% đến 20% đến 50% hoặc cao hơn theo khối lượng) và chủ yếu thường được chọn dựa trên thể tích chất lỏng, độ nhớt và các yếu tố trên cơ sở đối tượng theo, ví dụ, cách dùng cụ thể được chọn.

Sáng chế cũng bộc lộ cách sử dụng công nghệ phân phối dự trữ của Nano Precision Medical (Nano Precision Medical; Emeryville, CA). Công nghệ này sử dụng màng ống nano titan oxit mà có tốc độ giải phóng bậc không các đại phân tử, như các chất điều trị protein và peptit. Màng tương thích sinh học được giữ trong miếng cấy dưới da, nhỏ mà có sự phân phối ở tốc độ ổn định, trong thời gian dài (ví dụ, tối đa một năm) các đại phân tử điều trị. Công nghệ này hiện nay được xem xét để phân phối các chất chủ vận GLP-1 để điều trị bệnh tiểu đường typ II. Theo các phương án nhất định, (các) polypeptit được mô tả ở đây có thể là chế phẩm có màng. Ví dụ, polypeptit này có thể được tẩm vào màng hoặc quanh màng. Màng này có thể có dạng đĩa, ống hoặc hình cầu. Theo các phương án nhất định, ống này có thể là ống nano hoặc hình cầu có thể là hình cầu nano.

Theo một vài phương án, các polypeptit được mô tả ở đây có thể được sử dụng cho đối tượng bằng cách sử dụng hệ phân phối trên cơ thể mà có thể được dính lên bệnh nhân và có thể phân phối một liều tiền định polypeptit cho bệnh nhân. Hệ phân phối trên cơ thể được lấy làm ví dụ bao gồm, miếng dán hoặc bơm. Trong các trường hợp nhất định, hệ phân phối trên cơ thể như các thiết bị tiêm trên cơ thể được dùng để phân phối Neulasta® có thể được dùng để phân phối các polypeptit được mô tả ở đây. Theo các phương án khác, bơm thẩm thấu, như bơm thẩm thấu cấy được (ví dụ, bơm DUROS® hoặc bơm thẩm thấu ALZET®) có thể được dùng để phân phối polypeptit được mô tả ở đây cho người bệnh.

Đường dùng

Sáng chế bộc lộ cách sử dụng các polypeptit được mô tả, và chế phẩm chứa chúng, theo cách thích hợp bất kỳ. Các đường dùng thích hợp bao gồm ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong bắp, tĩnh mạch, dưới da (ví dụ, tiêm hoặc cấy), trong màng bụng, trong bể não, trong khớp, trong màng bụng, trong não (trong nhu mô) và trong mạch não), qua đường miệng, trong mũi, âm đạo, dưới lưỡi, trong mắt, trực tràng, khu trú (ví dụ, qua da), dưới lưỡi và xông hít.

Các thuốc tiêm dự trữ, mà thường được dùng dưới da hoặc trong bắp, cũng có thể được dùng để giải phóng các polypeptit được mô tả ở đây trong một khoảng thời gian xác định. Các thuốc tiêm dự trữ thường trên cơ sở rắn hoặc dầu và thường chứa ít nhất một trong số các thành phần bào chế nêu ở đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết các chế phẩm có thể có và sử dụng các thuốc tiêm dự trữ.

Đối với các kháng thể, theo một phương án được lấy làm ví dụ kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo sáng chế được bảo quản ở nồng độ 10mg/ml trong dung dịch nước muối chứa nước đẳng trương vô trùng để tiêm ở nhiệt độ 4°C và được pha loãng trong 100ml hoặc 200ml natri clorua 0,9% trước khi tiêm cho đối tượng. Kháng thể được dùng bằng cách truyền tĩnh mạch trong khoảng thời gian 1 giờ ở liều nằm trong khoảng từ 0,2mg/kg đến 10mg/kg. Theo các phương án khác, kháng thể được dùng bằng cách truyền tĩnh mạch trong khoảng thời gian từ 15 phút đến 2 giờ. Cũng theo các phương án khác, cách thức sử dụng là tiêm nhanh dưới da.

Sáng chế bộc lộ các phương pháp mà trong đó polypeptit hoặc kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo sáng chế được dùng cho đối tượng ít nhất hai lần một ngày, ít nhất một lần một ngày, ít nhất 48 giờ một lần, ít nhất 72 giờ một lần, ít nhất một lần một tuần, ít nhất hai tuần một lần, ít nhất một tháng một lần, ít nhất hai tháng một lần, hoặc ít nhất ba tháng một lần, hoặc ít hơn.

Liệu pháp kết hợp

Sáng chế bộc lộ cách sử dụng các polypeptit kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị có hoạt tính khác hoặc các phương thức phòng hoặc điều trị khác. Theo liệu pháp kết hợp này, các hoạt chất khác nhau thường có cơ chế tác dụng khác nhau. Liệu pháp kết hợp như vậy có thể đặc biệt có lợi nhờ cho phép giảm liều của một hoặc nhiều

chất, nhờ đó làm giảm hoặc loại bỏ được các tác dụng bất lợi có liên quan đến một hoặc nhiều chất này; ngoài ra, liệu pháp kết hợp này có thể có tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa hiệp đồng lên bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cơ sở.

Thuật ngữ “kết hợp” được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là bao gồm các chất điều trị mà có thể được dùng riêng, ví dụ, được bào chế riêng để dùng riêng (ví dụ, như có thể được cung cấp trong kit), và các chất điều trị này có thể được dùng cùng nhau trong một chế phẩm (tức là, “đồng chế phẩm”).

Theo các phương án nhất định, các polypeptit được dùng hoặc sử dụng liên tiếp, ví dụ, trong đó một chất được dùng trước một hoặc nhiều chất khác. Theo các phương án khác, các polypeptit được dùng đồng thời, ví dụ, trong đó hai hoặc nhiều chất được dùng ở hoặc gần như cùng một thời điểm; hai hoặc nhiều chất có thể có mặt trong hai hoặc nhiều chế phẩm riêng biệt hoặc được kết hợp trong một chế phẩm (tức là, đồng chế phẩm). Bất kể là hai hoặc nhiều chất được dùng liên tiếp hay đồng thời, thì chúng đều được coi là được dùng kết hợp theo các mục đích của sáng chế.

Polypeptit theo sáng chế có thể được dùng cùng với các chất khác hữu dụng để điều trị, phòng ngừa, ức chế hoặc làm thuyên giảm bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh nêu ở đây, kể cả các chất mà thường được dùng cho các đối tượng bị béo phì, rối loạn ăn uống, tăng glucoza huyết, tăng insulin huyết, không dung nạp glucoza, và các rối loạn chuyển hóa glucoza khác.

Sáng chế đề xuất liệu pháp kết hợp nhiều chất (và các nhóm của chúng), bao gồm 1) insulin, chất giả insulin và các chất mà kích thích tiết insulin, bao gồm sulfonylure (ví dụ, clopropamit, tolazamit, axetohexamit, tolbutamit, glyburit, glimepirit, glipizit) và meglitinid (ví dụ, mitiglinid, repaglinid (PRANDIN) và nateglinid (STARLIX)); 2) điguanua (ví dụ, metformin (GLUCOPHAGE), và muối được dùng của nó, cụ thể là, metformin hydroclorua, và các chế phẩm giải phóng kéo dài của nó, như Glumetza™, Fortamet™, và GlucophageXR™) và các chất khác mà tác động nhờ thúc đẩy sử dụng glucoza, giảm tổng hợp glucoza ở gan và/hoặc giảm sự tổng hợp glucoza ở ruột; 3) các chất ức chế alpha-glucosidaza (ví dụ, acarboza, vogliboza và miglitol) và các chất khác mà làm chậm tiêu hóa carbohydrat và do đó hấp thu ở ruột và giảm sự tăng glucoza huyết sau bữa ăn; 4) thiazolidindion (ví dụ, rosiglitazon (AVANDIA), troglitazon (REZULIN), pioglitazon (ACTOS), glipizit, balaglitazon, rivoglitazon, netoglitazon, AMG 131, MBX2044, mitoglitazon, lobeglitazon, IDR-105,

troglitazon, englitazon, ciglitazon, adaglitazon, darglitazon tăng cường hoạt động của insulin (ví dụ, bằng cách gây nhạy cảm insulin) bao gồm insulin, và các chất giả insulin (ví dụ, insulin degludec, insulin glargin, insulin lispro, insulin detemir, insulin glulisin và các chế phẩm xông hít chứa chúng), do đó thúc đẩy việc sử dụng glucoza ở các mô ngoại biên; 5) các peptit giống glucagon bao gồm các chất ức chế DPP-IV (ví dụ, alogliptin, omarigliptin, linagliptin, vildagliptin (GALVUS) và sitagliptin (JANUVIA)) và peptit giống glucagon-1 (GLP-1) và chất chủ vận GLP-1 và chất tương tự (ví dụ, exenatit (BYETTA và ITCA 650 (bơm thẩm thấu được đặt dưới da để phân phối chất tương tự exenatit trong khoảng thời gian 12 tháng; Intarcia, Boston, MA)) và chất chủ vận thụ thể GLP-1 (ví dụ, dulaglutit, semaglutit, albiglutit, exenatit, liraglutit, lixisenatit, taspoglutit, CJC-1131, và BIM-51077, bao gồm các chế phẩm dùng trong mũi, qua da và dùng một lần một tuần chứa chúng); 6) và các chất tương tự kháng DPP-IV (chất giả incretin), chất chủ vận PPAR gama, chất chủ vận PPAR alpha như các dẫn xuất axit fenofibric (ví dụ, gemfibrozil, clofibrat, xiprofibrat, fenofibrat, bezafibrat), các chất chủ vận PPAR tác dụng kép (ví dụ, ZYH2, ZYH1, GFT505, chiglitazar, muraglitazar, aleglitazar, sodelglitazar, và naveglitazar), chất chủ vận PPAR tác dụng riêng, chất ức chế PTP1B (ví dụ, ISIS-113715 và TTP814), các chất ức chế SGLT (ví dụ, ASP1941, SGLT-3, empagliflozin, dapagliflozin, canagliflozin, BI-10773, PF-04971729, remogliflozin, TS-071, tofogliflozin, ipragliflozin, và LX-4211), các chất kích thích bài tiết insulin, chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin (ví dụ, alacepril, benazepril, captopril, ceronapril, cilazapril, delapril, enalapril, enalaprilat, fosinopril, imidapril, lisinopril, moveltipril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril, temocapril, hoặc trandolapril), chất đối kháng thụ thể angiotensin II (ví dụ, losartan tức là, COZAAR®, valsartan, candesartan, olmesartan, telmesartan và bất kỳ dược chất nào trong số các dược chất này được dùng kết hợp với hydroclorothiazit như HYZAAR®) hoặc các dược chất chống cao huyết áp khác như LCZ 696, chất chủ vận RXR, chất ức chế glycogen synthaza kinaza-3, các chất điều biến miễn dịch, các chất hủy giao cảm, các dược chất phong bế giải phóng adrenalin beta (ví dụ, propranolol, atenolol, bisoprolol, carvedilol, metoprolol, hoặc metoprolol tartat), các dược chất phong bế giải phóng adrenalin alpha (ví dụ, doxazocin, prazosin hoặc alpha metyldopa) các chất chủ vận giải phóng adrenalin alpha trung ương, các chất giãn mạch ngoại vi (ví dụ

hydralazin); chất chủ vận thụ thể tiết adrenalon beta-3, chất ức chế 11beta-HSD1, chất ức chế endopeptidaza trung ương (ví dụ, thiorphan và phosphoramidon), chất đối kháng aldosteron, chất ức chế aldosteron synthaza, chất ức chế renin (ví dụ, các dẫn xuất ure của di- và tri-peptit (xem patent Mỹ số 5,116,835), axit amin và dẫn xuất (patent Mỹ số 5,095,119 và 5,104,869), các chuỗi axit amin được liên kết bằng liên kết không peptit (patent Mỹ số 5,114,937), các dẫn xuất di- và tri-peptit (patent Mỹ số 5,106,835), peptidyl amino diol (patent Mỹ số 5,063,208 và 4,845,079) và peptidyl beta-aminoaxyl aminodiol carbamat (patent Mỹ số 5,089,471); cả nhiều chất tương tự peptit khác như được mô tả trong patent Mỹ số 5,071,837; 5,064,965; 5,063,207; 5,036,054; 5,036,053; 5,034,512 và 4,894,437, và các chất ức chế renin phân tử nhỏ (bao gồm diol sulfonamit và sulfinyl (patent Mỹ số 5,098,924), các dẫn xuất N-morpholino (patent Mỹ số 5,055,466), rượu N-heteroxyclic (patent Mỹ số 4,885,292) và pyroimidazon (patent Mỹ số 5,075,451); cả các dẫn xuất pepstatin (patent Mỹ số 4,980,283) và các dẫn xuất flo và clo của các peptit chứa staton (patent Mỹ số 5,066,643), enalkrein, RO 42-5892, A 65317, CP 80794, ES 1005, ES 8891, SQ 34017, aliskiren (2(S),4(S),5(S),7(S)-N-(2-carbamoyl-2-metylpropyl)-5-amino-4-hydroxy-2,7-diisopropyl-8-[4-metoxi-3-(3-metoxipropoxy)-phenyl]-octanamit hemifumarat) SPP600, SPP630 và SPP635), chất đối kháng thụ thể endothelin, chất ức chế phosphodiesteraza-5 (ví dụ, sildenafil, tadalafil và vardenafil), các chất gây giãn mạch, chất chặn kênh canxi (ví dụ, amlodipin, nifedipin, verapamil, diltiazem, gallopamil, niludipin, nimodipin, nicardipin), chất hoạt hóa kênh kali (ví dụ, nicorandil, pinacidil, cromakalim, minoxidil, aprilkalim, loprazolam), chất hạ lipid ví dụ, các chất ức chế HMG-CoA reductaza như simvastatin và lovastatin mà được bán trên thị trường dưới tên ZOCOR® và MEVACOR® ở dạng tiền dược chất lacton và có chức năng như là các chất ức chế sau khi dùng, và muối dược dụng của các chất ức chế dihydroxy axit vòng mở HMG-CoA reductaza như atorvastatin (cụ thể là muối canxi được bán dưới tên LIPITOR®), rosuvastatin (cụ thể là muối canxi được bán dưới tên CRESTOR®), pravastatin (cụ thể là muối natri được bán dưới tên PRAVACHOL®), cerivastatin, và fluvastatin (cụ thể là muối natri được bán dưới tên LESCOL®); chất ức chế hấp thu cholesterol như ezetimibe (ZETIA®) và ezetimibe kết hợp với chất hạ lipid khác như chất ức chế HMG-CoA reductaza nêu trên và cụ thể là với simvastatin (VYTORIN®) hoặc với atorvastatin canxi; dược chất làm tăng HDL (ví dụ, niacin và chất chủ vận thụ thể axit nicotinic, và các dạng giải phóng có kiểm soát

hoặc kéo dài của chúng, và/hoặc với chất ức chế HMG-CoA reductaza; chất chủ vận thụ thể niacin như acipimox và acifran, cũng như là chất chủ vận một phần thụ thể niacin; chất đối kháng thụ thể glucagon (ví dụ, MK-3577, MK-0893, LY-2409021 và KT6-971); các chất chelat hóa axit mật (ví dụ, colestilan, colestimit, colesevalam hydroclorua, colestipol, cholestyramin, và các dẫn xuất dialkylaminoalkyl của dextran liên kết chéo), các chất ức chế axyl CoA:cholesterol axyltransferaza, (ví dụ, avasimibe); các chất được dự định dùng để điều trị các tình trạng viêm, như aspirin, các chất chống viêm không steroid hoặc NSAID, glucocorticoid, và các chất ức chế xyclooxygenaza-2 hoặc COX-2 chọn lọc; các chất hoạt hóa glucokinaza (GKA) (ví dụ, AZD6370); các chất ức chế 11β -hydroxysteroid dehydrogenaza typ 1, (ví dụ, như các chất được mô tả trong patent Mỹ số 6,730,690, và LY-2523199); các chất ức chế CETP (ví dụ, anaxetrapib, evaxetrapib, và torxetrapib); các chất ức chế fructoza 1,6-bisphosphataza, (ví dụ, như các chất được mô tả trong patent Mỹ số 6,054,587; 6,110,903; 6,284,748; 6,399,782; và 6,489,476); các chất ức chế axetyl CoA carboxylaza-1 hoặc 2 (ACC1 hoặc ACC2); các chất ức chế PCSK9; các chất chủ vận một phần GPR-40; chất điều biến SCD; chất ức chế axit béo synthaza; chất đồng đẳng amylin và amylin (ví dụ, pramlintit); bao gồm các dạng muối được dùng của các hoạt chất trên đây có thể có về mặt hóa học.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất liệu pháp kết hợp với các chất và các phương pháp thúc đẩy việc giảm cân, như các chất kích thích sự chuyển hóa hoặc làm giảm sự thèm ăn, và thay đổi chế độ ăn và/hoặc chế độ tập luyện để thúc đẩy việc giảm cân.

Polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều chất khác theo cách thích hợp bất kỳ trong nhiều trường hợp. Theo một phương án, điều trị bằng ít nhất một hoạt chất và ít nhất một polypeptit theo sáng chế được duy trì qua một khoảng thời gian. Theo một phương án khác, điều trị bằng ít nhất một hoạt chất được giảm hoặc được gián đoạn (ví dụ, nếu đối tượng ổn định), trong khi đó điều trị bằng (các) polypeptit theo sáng chế được duy trì ở phác đồ dùng liều không đổi. Theo một phương án khác, điều trị bằng ít nhất một hoạt chất được giảm hoặc được gián đoạn (ví dụ, nếu đối tượng ổn định), trong khi đó điều trị bằng (các) polypeptit theo sáng chế được giảm (ví dụ, liều thấp hơn, tần suất dùng liều ít hơn hoặc phác đồ điều trị ngắn hơn). Theo một phương án khác, điều trị bằng ít nhất một hoạt chất được giảm hoặc được gián đoạn (ví dụ, nếu đối tượng ổn định), và điều trị bằng (các) polypeptit sáng

chế được tăng (ví dụ, liều cao hơn, tần suất dùng liều nhiều hơn hoặc phác đồ điều trị dài hơn). Theo các phương án khác, điều trị bằng ít nhất một hoạt chất được duy trì và điều trị bằng (các) polypeptit theo sáng chế được giảm hoặc được gián đoạn (ví dụ, liều giảm, tần suất dùng liều ít hơn hoặc phác đồ điều trị ngắn hơn). Theo các phương án khác, điều trị bằng ít nhất một hoạt chất và điều trị bằng (các) polypeptit theo sáng chế được giảm hoặc được gián đoạn (ví dụ, liều thấp hơn, tần suất dùng liều ít hơn hoặc phác đồ điều trị ngắn hơn).

Liều dùng

Polypeptit theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng với lượng tùy thuộc vào, ví dụ, mục đích dùng (ví dụ, mức độ tiêu tan bệnh mong muốn); độ tuổi, cân nặng, giới tính, và tình trạng sức khỏe và thể chất của đối tượng được điều trị; bản chất của polypeptit, và/hoặc chế phẩm được dùng; đường dùng; và bản chất của bệnh, rối loạn, tình trạng bệnh hoặc triệu chứng của chúng (ví dụ, mức độ nặng của rối loạn glucoza/insulin và giai đoạn của rối loạn). Phác đồ liều dùng cũng có thể cần xem xét đến sự tồn tại, bản chất và mức độ của các tác dụng phụ bất kỳ có liên quan đến (các) chất được dùng. Lượng liều hữu hiệu và phác đồ liều dùng có thể dễ dàng được xác định từ, ví dụ, các thử nghiệm về độ an toàn và thang liều, các nghiên cứu *in vivo* (ví dụ, các mẫu động vật), và các phương pháp khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Nói chung, các thông số liều dùng chỉ ra rằng lượng liều ít hơn lượng mà gây độc không hồi phục cho đối tượng (tức là, liều dung nạp tối đa, “MTD”) và không ít hơn lượng cần để thu được tác dụng đáng kể ở đối tượng. Các lượng này được xác định nhờ, ví dụ các thông số dược động học và dược lực học có liên quan đến sự hấp thu, sự phân bố, sự chuyển hóa và thải trừ (“ADME”), có tính đến đường dùng và các yếu tố khác.

Liều hữu hiệu (effective dose – ED) là liều hoặc lượng của một chất mà tạo ra đáp ứng điều trị hoặc tác dụng mong muốn ở vị trí nào đó của đối tượng sử dụng nó. Thuật ngữ “lượng hữu hiệu trung bình” hoặc ED50 của một chất là liều hoặc lượng của một chất mà tạo ra đáp ứng điều trị hoặc tác dụng mong muốn ở 50% quần thể được sử dụng. Mặc dù ED50 thường được dùng như là số đo mức độ tác dụng mong muốn thích hợp của chất, nhưng đây là liều mà không nhất thiết thầy thuốc lâm sàng thấy rằng cần

phải xem xét đến tất cả các yếu tố có liên quan. Do đó, trong một vài trường hợp lượng hữu hiệu lớn hơn ED50 tính toán, trong các trường hợp khác lượng hữu hiệu nhỏ hơn ED50 tính toán, và trong các trường hợp khác lượng hữu hiệu là bằng ED50 tính toán.

Ngoài ra, liều hữu hiệu của (các) polypeptit theo sáng chế có thể là lượng mà, nếu được dùng một hoặc nhiều liều cho đối tượng, tạo ra kết quả mong muốn so với đối tượng khỏe mạnh. Ví dụ, liều hữu hiệu có thể là liều mà nếu được dùng cho đối tượng có lượng insulin trong huyết tương và/hoặc glucoza trong huyết tương cao có thể đạt được mức giảm mong muốn ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, hoặc hơn 80% so với đối tượng khỏe mạnh.

Lượng liều thích hợp thường nằm trong khoảng từ 0,001mg/kg đến 100mg/kg thể trọng của bệnh nhân mỗi ngày, liều này có thể được dùng ở dạng một hoặc nhiều liều. Theo một vài phương án, lượng liều sẽ nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 25mg/kg mỗi ngày, và theo các phương án khác nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến 10mg/kg mỗi ngày. Lượng liều thích hợp có thể nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 25mg/kg mỗi ngày, nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến 10mg/kg mỗi ngày, hoặc nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến 5mg/kg mỗi ngày. Trong khoảng này, liều này có thể nằm trong khoảng từ 0,005mg/kg đến 0,05mg/kg, từ 0,05mg/kg đến 0,5mg/kg hoặc từ 0,5mg/kg đến 5,0mg/kg mỗi ngày.

Để dùng một chất qua đường miệng, thì các dược phẩm có thể được bào chế ở dạng viên nén, viên nang và dạng tương tự chứa hoạt chất với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1000 miligam, cụ thể là 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0, và 1000,0 miligam hoạt chất. (Các) polypeptit có thể được dùng theo phác đồ, ví dụ, từ 1 đến 4 lần mỗi ngày, và thường là một lần hoặc hai lần mỗi ngày.

Liều dùng của (các) polypeptit theo sáng chế có thể được lặp lại ở tần suất thích hợp, mà có thể nằm trong khoảng một lần một ngày đến ba tháng một lần, tùy thuộc vào các thông số dược động học của (các) polypeptit (ví dụ, thời gian bán thải) và đáp ứng dược lực học (ví dụ, khoảng thời gian tác dụng điều trị của (các) polypeptit). Theo một vài phương án, liều dùng thường được lặp lại từ một lần một tuần đến ba tháng một lần. Theo các phương án khác, (các) polypeptit được dùng thích hợp một tháng một lần.

Theo các phương án nhất định, liều dùng của (các) polypeptit được mô tả được chứa trong “dạng liều đơn vị”. Thuật ngữ “dạng liều đơn vị” được dùng để chỉ các đơn vị riêng rẽ, mỗi đơn vị chứa một lượng tiền định (các) polypeptit theo sáng chế, một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất khác, đủ để tạo ra tác dụng mong muốn. Cần hiểu rằng các thông số của dạng liều đơn vị sẽ tùy thuộc vào chất cụ thể và tác dụng đạt được.

Kit

Sáng chế còn đề xuất kit chứa (các) polypeptit được mô tả, và được phẩm chứa chúng. Kit này thường ở dạng cấu trúc vật lý gồm nhiều thành phần khác nhau, như được mô tả dưới đây, và có thể được sử dụng, ví dụ, để thực hiện các phương pháp được mô tả trên đây (ví dụ, cho đối tượng cần giảm cân sử dụng (các) polypeptit).

Kit có thể chứa một hoặc nhiều polypeptit được mô tả ở đây (được đề xuất trong, ví dụ, đồ chứa vô trùng), mà có thể ở dạng dược phẩm thích hợp để dùng cho đối tượng. (Các) polypeptit có thể được đề xuất ở dạng có sẵn để dùng hoặc ở dạng cần, ví dụ, hoàn nguyên hoặc pha loãng trước khi dùng. Nếu (các) polypeptit ở dạng cần được hoàn nguyên bởi người dùng, thì kit có thể cũng bao gồm các dung dịch đệm, tá dược được dùng, và dung dịch tương tự, được đóng gói cùng hoặc riêng với (các) polypeptit. Nếu liệu pháp kết hợp được đề cập, thì kit này có thể chứa một vài chất riêng rẽ hoặc chúng có thể được bao gồm trong kit. Mỗi thành phần của kit có thể được đựng trong đồ chứa riêng và tất cả các đồ chứa này có thể nằm trong một gói đơn. Kit theo sáng chế có thể được thiết kế cho các tình trạng bệnh cần để giữ các thành phần trong đó một cách thích hợp (ví dụ, giữ lạnh hoặc đông lạnh).

Kit có thể có nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng chứa thông tin xác định cho các thành phần trong đó và hướng dẫn sử dụng (ví dụ, các thông số liều dùng, dược học lâm sàng của (các) hoạt chất, kể cả cơ chế tác dụng, dược động học và dược lực học, các tác dụng bất lợi, chống chỉ định, v.v.). Nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng có thể bao gồm thông tin của nhà sản xuất như số lô và hạn dùng. Nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng có thể là, ví dụ được đưa vào trong cấu trúc vật lý chứa các thành phần, được để riêng trong cấu trúc vật lý, hoặc dán vào thành phần của kit (ví dụ, ampun, ống hoặc lọ). Các hướng dẫn được lấy làm ví dụ bao gồm các hướng dẫn làm giảm hoặc hạ lượng

glucoza trong máu, điều trị chứng tăng glucoza huyết, điều trị bệnh tiểu đường, v.v. bằng các chất điều biến được mô tả, và được phẩm chứa chúng.

Nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng có thể còn bao gồm, hoặc được đưa vào vật ghi đọc được bằng máy tính, như đĩa (ví dụ, đĩa cứng, thẻ, đĩa nhớ), đĩa quang như CD- hoặc DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, băng từ, hoặc vật ghi lưu trữ điện như RAM và ROM hoặc thiết bị ghép của vật ghi lưu trữ quang/từ tính này, vật ghi FLASH hoặc thẻ nhớ. Theo một vài phương án, hướng dẫn hiện nay không được bao gồm trong kit, mà các thiết bị để lấy được các hướng dẫn từ nguồn từ xa, ví dụ qua internet, được đề xuất.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được đề cập nhằm cung cấp cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này một bản mô tả đầy đủ về cách tiến hành và sử dụng sáng chế, và không được dự định là làm giới hạn phạm vi của sáng chế cũng không được dự định là các thử nghiệm dưới đây là tất cả hoặc các thử nghiệm duy nhất được tiến hành. Các nỗ lực được tiến hành nhằm đảm bảo độ chính xác đối với các số được sử dụng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v.), tuy nhiên một vài sai số thử nghiệm và độ lệch cần được tính đến.

Trừ khi được quy định theo cách khác, các phần là các phần theo khối lượng, khối lượng phân tử là khối lượng phân tử trung bình, nhiệt độ là độ C ($^{\circ}\text{C}$), và áp suất là ở hoặc gần áp suất khí quyển. Các thuật ngữ viết tắt chuẩn được sử dụng, bao gồm các thuật ngữ sau: bp = cặp bazơ (s); kb = kilobazơ; pl = picolit; s hoặc sec = giây; min = phút; h hoặc hr = giờ; aa = axit amin; kb = kilobazơ; nt = nucleotit; ng = nanogam; μg = microgam; mg = miligam; g = gam; kg = kilogam; dl hoặc dL = dexilit; μl hoặc μL = microlit; ml hoặc mL = mililit; l hoặc L = lit; μM = micromol; mM = milimol; M = mol; kDa = kilodalton; i.m. = trong bắp; i.p. = trong màng bụng; s.c. = dưới da; bid = hai lần một ngày; HPLC = sắc ký lỏng hiệu năng cao; BW = thể trọng; U = đơn vị; ns = không có ý nghĩa thống kê; PG = glucoza trong huyết tương lúc đói; FPI = insulin trong huyết tương lúc đói; ITT = thử nghiệm dung nạp insulin; PTT = thử nghiệm dung nạp pyruvat; oGTT = thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng; GSIS = tiết insulin được kích thích bởi glucoza; PBS = dung dịch nước muối được đệm phosphat; PCR = phản ứng chuỗi polymeaza; NHS = N-hydroxysuccinimit; DMEM = môi trường Eagle được cải biến của Dulbeco; GC = bản sao bộ gen; EDTA = axit etylendiamintetraaxetic.

Vật liệu và phương pháp

Các phương pháp và vật liệu sau được sử dụng trong các ví dụ dưới đây:

Động vật. Chuột đực C57BL/6J béo phì do chế độ ăn (Diet-induced obese – DIO) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được duy trì chế độ ăn giàu mỡ (D12492, Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ) chứa 60kcal% chất béo, 20kcal% protein và 20kcal% carbohydrat trong khoảng thời gian từ 12 tuần đến 20 tuần. Tất cả các nghiên cứu trên động vật đã được ủy ban sử dụng và chăm sóc động vật NGM thông qua. Chuột C57BL/6J DIO biểu hiện kiểu béo phì giống như người, trong đó tình trạng béo phì được cho là do hấp thụ quá nhiều calo. Chuột C57BL/6J là chuột dễ béo phì trong đó được thông báo là tăng cân, cũng như là tăng insulin huyết và đôi khi quan sát thấy tăng glucoza huyết. Giống này là giống được sử dụng phổ biến nhất để làm mẫu béo phì do chế độ ăn. (Nilsson C., *et al.*, *Acta Pharmacologica Sinica* (2012) 33: 173-181).

Các trình tự axit amin và axit nucleic. Số truy cập ngân hàng gen số BC000529.2 nêu cho cADN của ORF mã hóa các biến thể GDF15 của người, và số truy cập ngân hàng gen NP_004855.2 nêu cho trình tự axit amin được mã hóa bởi cADN. cADN của albumin huyết thanh của người hiện đại được mua từ Origene (SC319937), số đăng ký ngân hàng gen NM_000477.3, NP_000468).

Yếu tố Kozak và trình tự peptit tín hiệu IgK của người (5'CACCATGGACATG-AGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCC-AGATGT3') (SEQ ID NO: 98) được cài vào vật truyền pTT5 (National Research Council Canada) giữa vị trí PmeI và EcoRI. Trong khi cả hai vị trí giới hạn được loại, thì vị trí AgeI được tạo ra để tách dòng trong khung. Để tạo ra cấu trúc hIgK-GDF15, ADN GDF15 được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng đoạn xuôi: 5'-CTCC-GAGGTGCCAGATGTGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGG 3' (SEQ ID NO: 102) và đoạn ngược: 5'-CCTCGAGCGGCCGCTAGCTCATATGCAGTGG-CAGTCTTTGGCTAACAA 3' (SEQ ID NO: 99) và hỗn hợp PCR Sapphire (Clontech). Sản phẩm PCR được tinh chế bằng gel (kit chiết tách gel Qiagen) và được tách dòng trong pTT5-hIgK (được tuyến tính hóa bằng AgeI/HindIII) nhờ kỹ thuật dung hợp (Clontech). Để tạo ra cấu trúc hIgK-HSA-trình tự liên kết-GDF15, HSA-trình tự liên kết và GDF15 được khuếch đại bằng PCR riêng rẽ nhờ các đoạn mồi thích hợp. Sau khi tinh chế bằng gel, hai đoạn PCR và vật truyền pTT5 tuyến tính được ghép bằng

cách sử dụng hỗn hợp ghép gốc Gibson. Các tế bào dạng sao hoặc NEB 5 α được biến nạp bằng các phản ứng dung hợp và Gibson tương ứng, được cấy trên đĩa thạch-LB chứa carbenixilin và ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Các khuẩn lạc đơn được lấy ra và được phân tích bằng cách giải trình tự. ADN từ các khuẩn lạc dương tính được tinh chế (ADN-Maxi-prep, Qiagen), trình tự đầy đủ được xác định và được dùng để chuyển nhiễm vào các tế bào động vật có vú để biểu hiện protein tái tổ hợp.

Để tạo ra các protein đột biến đặc hiệu, tiến hành gây đột biến trực tiếp vị trí bằng kit QuikChange Lightning (Agilent) và các đoạn môi thích hợp.

Sự biểu hiện nhất thời. Tất cả các protein đột biến GDF15 được chuyển nhiễm nhất thời trong các tế bào Expi 293F (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Các tế bào thường được cấy chuyển trong môi trường biểu hiện Expi (Invitrogen) và được duy trì dưới dạng môi trường nuôi cấy hỗn dịch trong các bình lắc có kích thước khác nhau. Thông thường, các tế bào được cấy chuyển ở mật độ tế bào bằng 5e5 tế bào sống sót/ml và được nuôi cấy trong 3 ngày trước khi cấy chuyển. Các bình được giữ trong tủ ủ CO₂ được làm ẩm ở nhiệt độ 37°C và 5% lượng CO₂. Các tế bào được nuôi cấy trên bộ thiết bị lắc New Brunswick (New Brunswick Scientific Company, Edison, NJ) ở tốc độ lắc bằng 120 vòng/phút.

Tiến hành chuyển nhiễm khi mật độ tế bào trong môi trường nuôi cấy đạt tới 2,5e6 tế bào sống sót/ml ở mức độ sống sót lớn hơn 95%. Thông thường, đối với 50ml dịch chuyển nhiễm, 2,5e6 tế bào/ml X 50ml tế bào được cấy vào trong bình lắc có dung tích 250ml trong 42,5ml thể tích nuôi cấy. 50 μ g ADN plasmit bao gồm vật truyền biểu hiện mang gen quan tâm được pha loãng trước trong 2,5ml môi trường huyết thanh đã khử OPTI-MEM (Invitrogen). Cùng lúc đó tác nhân chuyển nhiễm Expifectamin (Invitrogen), 2,67 lần thể tích (của lượng ADN plasmit) cũng được pha loãng trong 2,5ml môi trường huyết thanh đã khử OPTI-MEM. Sau khi ủ trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng, tác nhân chuyển nhiễm đã pha loãng được bổ sung từ từ vào ADN plasmit đã pha loãng để tạo thành phức hợp khả biến chuyển nhiễm. Sau khi ủ trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng, 5ml phức hợp chuyển nhiễm được bổ sung vào 42,5ml môi trường nuôi cấy tế bào. Sau đó, các tế bào đã chuyển nhiễm được đặt trong tủ ủ CO₂ đã làm ẩm trên thiết bị lắc xoay tròn ở tốc độ 120 vòng/phút. 24 giờ sau khi chuyển nhiễm, môi trường chuyển nhiễm được nạp 250 μ l dung dịch gen tăng cường 1 (Invitrogen) và 2,5ml dung dịch gen tăng cường 2 (Invitrogen). Sau đó, môi trường

nuôi cấy này được đặt lại vào trong tủ ủ CO₂ đã làm ấm trên thiết bị lắc xoay tròn. 6 ngày đến 7 ngày sau chuyển nhiễm, môi trường nuôi cấy được thu hoạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong thời gian 30 phút trước khi được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc bằng 0,2µm (Nalgene). Sau đó, các mẫu được phân tích sự biểu hiện trên gel nhuộm coomassie.

Sự biểu hiện tế bào CHO ổn định. Các protein đột biến GDF15 được biểu hiện ổn định từ hệ GS Xceed™ với dòng tế bào chủ CHOK1SV GS-KO được dựa trên hệ biểu hiện đã có từ lâu của Lonza cho các tế bào CHOK1SV. Hệ GS Xceed cho phép các dòng tế bào biểu hiện cao được tạo ra là thích hợp để sản xuất cGMP. Hệ này bao gồm tế bào chủ CHOK1SV GS-KO mang cGMP, vật truyền biểu hiện GS, các quy trình đầy đủ để nuôi cấy tế bào, chuyển nhiễm, chọn lọc và sàng lọc các dòng tế bào, và các quy trình tổng hợp v8 (môi trường và nguyên liệu nạp). Để phát triển các dòng tế bào cho các protein đột biến GDF15, trước hết nên tuân thủ các khuyến cáo được gợi ý từ nhà sản xuất để tạo ra dòng tế bào không được tách dòng. Sau đó, các dòng tế bào không được tách dòng được tách dòng trong môi trường pha loãng giới hạn để phân lập các dòng tế bào đơn biểu hiện cao.

Tinh chế protein tái tổ hợp GDF15. Các phân tử dung hợp HSA-GDF15 được tinh chế từ môi trường nuôi cấy bằng cách bắt giữ nhờ ái lực với xanh sepharoza hoặc bắt giữ nhờ trao đổi ion. Ở cả hai trường hợp, các phân tử dung hợp HSA-GDF15 được giải hấp bằng gradien của muối thích hợp/các điều kiện pH thích hợp để giải hấp và phân tách tối ưu khỏi các tạp chất protein tế bào chủ. Sau đó, tất cả các phân tử dung hợp HSA-GDF15 được tinh chế tiếp bằng cách sử dụng cột GE Healthcare Superdex 200 (26/60) sử dụng 1X PBS làm dung dịch đệm chạy. Các phân tử dung hợp được tinh chế được xác định đặc điểm tiếp và được khẳng định trình tự bằng LC/MS (Agilent 6500-series Q-TOF), được khẳng định độ phân tán đơn nhờ HPLC lọc gel (Agilent 1200-HPLC) và gel SDS-PAGE (khử và không khử) có nhuộm coomassie và/hoặc bạc. Đối với các thử nghiệm *in vivo*, nội độc tố được khẳng định là nhỏ hơn 5EU/mg để tiêm dưới da.

Protein đột biến glycosyl hóa GDF15 được tinh chế từ môi trường nuôi cấy bằng cách bắt giữ nhờ trao đổi ion. Trong tất cả các trường hợp, các protein đột biến GDF15 được giải hấp bằng cách sử dụng gradien của muối/độ pH thích hợp để giải hấp và phân tách tối ưu khỏi các tạp chất protein tế bào chủ. Sau đó, tất cả các protein đột biến

GDF15 được tinh chế tiếp bằng cách sử dụng GE HiTrap Phenyl HP ở độ pH 8,0 nhờ gradien tuyến tính giảm của amoni sulfat. Các phân đoạn được đánh giá và được tập hợp dựa trên độ tinh khiết và các đặc tính glycosyl hóa nhờ sự chuyển dịch gel trên các gel SDS-PAGE không khử. Sau đó, các nhóm cuối của mỗi protein đột biến GDF15 còn được xác định đặc điểm tiếp và được khẳng định trình tự/glycan (+/- PNGase F, NEB Cat. #P0704S) bằng LC/MS (Agilent 6500-series Q-TOF), được khẳng định sự phân tán đơn nhờ lọc Gel-HPLC (Agilent 1200-HPLC) và gel SDS-PAGE (không khử và khử) nhờ nhuộm coomassie và/hoặc bạc. Tất cả các protein đột biến GDF15 được bảo chế trong natri axetat 10mM độ pH 4,0.

Đánh giá độ hòa tan của các protein đột biến GDF15 của người. Các protein đột biến được thẩm tách vào axit formic 0,01% (thể tích/thể tích) (pH 2,0) và được cô bằng cách sử dụng màng lọc siêu ly tâm Amicon được làm từ các nitroxenluloza tái tạo 10.000 NMWL (UFC901096), trong một vài trường hợp có nồng độ lớn hơn 10mg/ml. Nồng độ ban đầu của mỗi protein đột biến được xác định nhờ hấp thụ ở bước sóng 280nm và định luật Beer (hệ số tắt = 14400, khối lượng phân tử = 12.287Da). Sau đó, mỗi protein đột biến được pha loãng tuần tự gấp đôi lại vào axit formic 0,01% và 90µl mỗi dung dịch pha loãng được bổ sung vào đĩa loại 96 lỗ. 10µl 10X PBS (chứa Tris 0,5M độ pH 7,0) được bổ sung vào mỗi lỗ và độ pH được khẳng định là 7. Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng qua đêm kèm lắc, độ đục được đo ở bước sóng 370nm. Điểm thay đổi mà tại đó độ đục bắt đầu xuất hiện được chấp nhận là độ hòa tan tối đa của mỗi protein đột biến. Các protein đột biến được chia thành năm nhóm tùy theo mức độ đục của nó: < 0,2mg/ml = +; ≥ 0,2mg/ml = ++; ≥ 0,5mg/ml = +++; ≥ 1,0mg/ml = ++++; ≥ 5,0mg/ml = +++++.

Ví dụ 1: Thao tác di truyền phân tử dung hợp HSA-GDF15 đã được làm ổn định

Sự biểu hiện cấu trúc M1 đã cho thấy các thách thức tổng hợp trong dòng tế bào ổn định CHOK1SV GSKO (Fig.4). Việc cắt đáng kể phân tử dung hợp dạng dime HSA-GDF15 đã được quan sát thấy trong môi trường nuôi cấy tế bào. Các phân tử bị cắt được phân lập nhờ sắc ký trao đổi ion và/hoặc sắc ký tương tác kỵ nước và/hoặc lọc gel để thu được một nguồn phân tử được làm giàu để phân tích đặc điểm tiếp. Sau khi phân tích LC/MS trên Agilent 6500-series Q-TOF, các vị trí cắt rõ ràng là ở đầu cuối C của phân tử dung hợp HSA, trình tự liên kết, và ở đầu cuối N của GDF15. Các phân tử

chính từ cấu trúc M1 được xác định như sau (trình tự liên kết = được gạch chân, GDF15 = in đậm):

Phân tử 1 (SEQ ID NO:103):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI~~AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT~~
VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP~~NLPRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP~~
ELLFFAKRYKAA~~FT~~TECCQAADKAACLLPKLDEL~~RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF~~
AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECA~~DDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS~~
LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY~~EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL~~
VEEPQNLIKQNC~~ELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV~~
LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD~~ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL~~
VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVA

Phân tử 2 (SEQ ID NO:104):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI~~AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT~~
VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP~~NLPRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP~~
ELLFFAKRYKAA~~FT~~TECCQAADKAACLLPKLDEL~~RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF~~
AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECA~~DDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS~~
LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY~~EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL~~
VEEPQNLIKQNC~~ELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV~~
LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD~~ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL~~
VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLV~~AASQAALG~~

Phân tử 3 (SEQ ID NO:105):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI~~AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT~~
VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP~~NLPRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP~~
ELLFFAKRYKAA~~FT~~TECCQAADKAACLLPKLDEL~~RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF~~
AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECA~~DDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS~~
LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY~~EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL~~
VEEPQNLIKQNC~~ELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV~~
LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD~~ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL~~
VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLV~~AASQAALGLG~~

Lưu ý rằng phân tử 3 bao gồm trình tự axit amin của albumin huyết thanh trưởng thành của người và một (thứ nhất) axit amin của trình tự liên kết. Phân tử 1 và 2 thiếu tám axit amin cuối và một axit amin cuối ở đầu cuối C của trình tự axit amin của albumin huyết thanh trưởng thành của người.

Phân tử 4 (SEQ ID NO:106):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI~~AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT~~
VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP~~NLPRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP~~
ELLFFAKRYKAA~~FT~~TECCQAADKAACLLPKLDEL~~RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF~~
AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECA~~DDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS~~

LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLIKQNCSELFELGGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV
LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL
VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGSGGGGSAR

Phân tử 5 (SEQ ID NO:107):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQCPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT
VATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKLYEYIARRHPYFYAP
ELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCSLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEF
AEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS
LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLIKQNCSELFELGGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV
LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL
VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGSGGGGSARN

Để giảm thiểu và điều chỉnh vấn đề cắt được quan sát ở gần vùng trình tự liên kết của phân tử dung hợp, cấu trúc M2 được thiết kế tương đương với cấu trúc M1, tuy nhiên có đoạn cắt gồm ba gốc đầu tiên ở đầu tận cùng N trong GDF15 (Δ ARN hoặc Δ N3) (Fig.3). Cấu trúc M2 được làm ổn định thu được nếu được biểu hiện trong dòng tế bào ổn định CHOK1SV GSKO, đã cho thấy các vấn đề cắt tối thiểu như được quan sát ở M1 khi so sánh môi trường có điều kiện cho mỗi cấu trúc được biểu hiện. Fig.4 thể hiện sự cắt đáng kể được quan sát ở M1 và độ ổn định của cấu trúc M2.

Dựa trên sự tăng cường độ ổn định được quan sát ở cấu trúc M2, thao tác di truyền tiếp được thực hiện đối với chiều dài trình tự liên kết tối ưu và khả năng cắt. Chiều dài trình tự liên kết tối ưu của $[(G_4S)]_5$ được đạt được và có liên quan đến các đoạn mất ở đầu tận cùng N của GDF15 gồm 3 gốc (M3 – Δ ARN hoặc Δ N3) hoặc 6 gốc (M4 – Δ ARNGDH hoặc Δ N6) (xem Fig.5).

Ví dụ 2: Tác dụng của các phân tử dung hợp HSA – GDF15 được tăng cường độ ổn định đến thể trọng và sự hấp thu thức ăn ở mẫu chuột DIO

Tác dụng của phân tử dung hợp được dùng dưới da bao gồm HSA tái tổ hợp được dung hợp với GDF15 của người tái tổ hợp đến thể trọng và sự hấp thu thức ăn được đánh giá sau 7 ngày sử dụng. Nói tóm lại, các protein dung hợp M1 (Fig.3), M3 và M4 (Fig.5) được dùng, ở liều 4nmol/kg, 12nmol/kg và 40nmol/kg, dưới dạng tiêm tĩnh mạch nhanh dưới da (10ml/kg) cho chuột DIO có cân nặng khoảng 38g đến 40g. Sau khi dùng đối chứng chất dẫn hoặc protein dung hợp, thể trọng và sự hấp thu thức

ăn được kiểm tra ở thời điểm 24 giờ và 7 ngày sau khi dùng liều để kiểm tra hiệu quả. Các kết quả thu được ở chuột DIO dùng liều 40nmol/kg được thể hiện trong các Fig.6 và 7.

Như được thể hiện trong Fig.6, việc dùng protein dung hợp ở liều 40nmol/kg (4nmol/kg và 12nmol/kg không được thể hiện) đã cải thiện đáng kể việc giảm hấp thu thức ăn. Ở mỗi nhóm chuột, $n = 8$ và các giá trị p (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, ns=không đáng kể) được xác định bằng kiểm định T student hai nhóm độc lập so sánh sự hấp thu thức ăn ở các nồng độ khác nhau với nhóm đối chứng dùng chất dẫn ở mỗi thời điểm cụ thể.

Tham khảo Fig.6, 24 giờ (1 ngày) sau khi dùng protein dung hợp so với đối chứng chất dẫn đã dẫn đến làm giảm sự hấp thu thức ăn như sau (chất dẫn = 2,8g $\pm$ 0,13g): nhóm liều 4nmol/kg (M1 = 1,9g $\pm$ 0,25g, **; M3 = 1,8g $\pm$ 0,18g, ***; M4 = 1,8g $\pm$ 0,10g, ***), nhóm liều 12nmol/kg (M1 = 1,5g $\pm$ 0,19g, ***; M3 = 1,9g $\pm$ 0,16g, ***; M4 = 1,7g $\pm$ 0,12g, ***), và nhóm liều 40nmol/kg (M1 = 1,3g $\pm$ 0,11g, ***; M3 = 1,8g $\pm$ 0,06g, ***; M4 = 1,5g $\pm$ 0,15g, ***). 7 ngày sau khi dùng các phân tử dung hợp so với đối chứng chất dẫn đã dẫn đến làm giảm sự hấp thu thức ăn như sau (chất dẫn = 2,7g $\pm$ 0,09g): nhóm liều 4nmol/kg (M1 = 2,0 $\pm$ 0,18g, **; M3 = 2,5g $\pm$ 0,08g, ns; M4 = 2,5g $\pm$ 0,09g, ns), nhóm liều 12nmol/kg (M1 = 2,0g $\pm$ 0,20g, **; M3 = 2,2g $\pm$ 0,17g, *; M4 = 2,4g $\pm$ 0,28g, ns) và nhóm liều 40nmol/kg (M1 = 1,7g $\pm$ 0,14g, ***; M3 = 2,4g $\pm$ 0,25g, ns; M4 = 2,2g $\pm$ 0,24g, ns).

Như được thể hiện trong Fig.7, việc dùng các phân tử dung hợp ở liều 40nmol/kg (4nmol/kg và 12nmol/kg không được thể hiện) đã dẫn đến làm giảm đáng kể thể trọng. Ở mỗi nhóm chuột, $n = 8$ và các giá trị p (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, ns=không đáng kể) được xác định bởi kiểm định T student hai nhóm độc lập so sánh sự hấp thu thức ăn ở các nồng độ khác nhau với nhóm đối chứng dùng chất dẫn ở mỗi thời điểm cụ thể.

Tham khảo Fig.7, ở thời điểm trước khi dùng liều (ngày=0) các phân tử dung hợp so với đối chứng chất dẫn, thể trọng dưới đây đã được ghi lại (chất dẫn = 39,0g $\pm$ 0,92g): nhóm liều 4nmol/kg (M1 = 39,2g $\pm$ 0,66g; M3 = 39,4g $\pm$ 0,91g; M4 = 39,3g $\pm$ 0,77g), nhóm liều 12nmol/kg (M1 = 39,4g $\pm$ 0,78g; M3 = 39,3g $\pm$ 1,09g; M4 = 39,3g $\pm$ 0,81g), và nhóm liều 40nmol/kg (M1 = 39,2g $\pm$ 0,64g; M3 = 39,2g $\pm$ 0,68g; M4 = 38,9g $\pm$ 0,60g). 24 giờ (ngày=1) sau khi dùng các phân tử dung hợp so

với đối chứng chất dẫn, thể trọng dưới đây được ghi lại (% mức giảm = mức chênh lệch delta so với trọng lượng nhóm trước khi dùng liều). Chất dẫn = +0,3g +/- 0,11g, +0,6%), nhóm liều 4nmol/kg (M1 = -0,6g +/- 0,21g, -1,5%, ***; M3 = -0,6g +/- 0,17g, -1,6%, ***; M4 = -0,9g +/- 0,13g, -2,4%, ***), nhóm liều 12nmol/kg (M1 = -0,9g +/- 0,11g, -2,3%, ***; M3 = -0,7g +/- 0,18g, -1,6%, ***; M4 = -0,6g +/- 0,16g, -1,7%, ***), và nhóm liều 40nmol/kg (M1 = -1,0g +/- 0,14g, -2,5%, ***; M3 = -0,6g +/- 0,09g, -1,5%, ***; M4 = -0,8g +/- 0,22g, -2,1%, ***). 7 ngày sau khi dùng các phân tử protein dung hợp so với đối chứng chất dẫn, thể trọng dưới đây được ghi lại (% mức giảm = mức chênh lệch delta so với trọng lượng nhóm trước khi dùng liều). Chất dẫn = +1,2g +/- 0,25g, +3,1%), nhóm liều 4nmol/kg (M1 = -1,3g +/- 0,30g, -3,3%, ***; M3 = -1,1g +/- 0,32g, -2,8%, ***; M4 = -2,0g +/- 0,29g, -5,0%, ***), nhóm liều 12nmol/kg (M1 = -1,8g +/- 0,34g, -4,7%, ***; M3 = -1,4g +/- 0,43g, -3,6%, ***; M4 = -1,5g +/- 0,32g, -3,7%, ***), và nhóm liều 40nmol/kg (M1 = -2,6g +/- 0,28g, -6,7%, ***; M3 = -2,1g +/- 0,28g, -5,4%, ***; M4 = -2,6g +/- 0,31g, -6,7%, ***).

Số liệu trên Fig.6 và Fig.7 chứng tỏ rằng các phân tử dung hợp HSA với sự tối ưu hóa trình tự liên kết và các đoạn cắt ở đầu tận cùng N của GDF15 là có hoạt tính, và các phân tử dung hợp này là một cách tiếp cận khả thi để tăng cường các đặc tính có lợi nhất định của các phân tử GDF15.

Ví dụ 3: Các protein đột biến GDF15 của người với các đặc tính vật lý được cải thiện

Bộ dữ liệu trong ví dụ 3 đề cập đến các giới hạn về độ hòa tan có liên quan đến tính kỵ nước và tính ưa nước ở bề mặt vốn có ở GDF15 trưởng thành của người. Ngoài ra, tác dụng đến độ hòa tan của (các) vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N đưa vào dọc trình tự của GDF15 trưởng thành của người được đánh giá. Để thuận tiện cho việc đánh giá các đặc điểm biểu hiện; các đặc tính glycosyl hóa và độ hòa tan của các protein đột biến GDF15 của người tái tổ hợp, trưởng thành, đều được cấu trúc dưới dạng các protein đột biến trưởng thành được dung hợp với trình tự peptit tín hiệu IgK và được thể hiện ở Fig.8A. 17 protein đột biến GDF15 (được ký hiệu là M5 đến M21; tương ứng SEQ ID NO: 81 đến 97) được tạo ra. Đối với M16, phiên bản được loại bỏ đầu tận cùng N: protein đột biến Δ N3-M16 được tạo ra và độ hòa tan của nó được xác định. Protein đột biến M5 gồm hai vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N được đưa vào nhờ thay thế D ở vị trí 5 trong GDF15 wt (SEQ ID NO: 1) bằng T và nhờ thay

thể R ở vị trí 21 trong GDF15 wt (SEQ ID NO: 1) bằng N. Ở các protein đột biến M6-M21, một vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết với N được đưa vào (xem Fig.8A). Cần lưu ý rằng mặc dù các protein đột biến bao gồm trình tự tín hiệu IgK ở đầu cuối N nhằm mục đích chỉ vị trí thay thế, nhưng các gốc được đánh số như vị trí gốc tương ứng ở SEQ ID NO: 1. Do đó, ví dụ, mặc dù T có mặt ở vị trí 27 trong protein đột biến M5, nhưng nó được chỉ là vị trí 5, vì vị trí của gốc D tương ứng trong SEQ ID NO: 1 là 5.

Các đánh giá độ hòa tan được tiến hành trên các protein đột biến (trong axit Formic 0,01%) thông qua một hỗn hợp gồm 10X PBS + Tris 0,5M pH 7,0, một dung dịch đệm nghiêm ngặt mà các cải thiện về độ hòa tan của protein đột biến có thể được đánh giá so với GDF-15 trưởng thành của người.

Đánh giá độ hòa tan được xác định dựa trên phổ hấp thụ ở bước sóng 280nm nhờ quy luật Beer được tính toán bằng hệ số tắt (GDF15 trưởng thành của người = 14.400/monome) và khối lượng phân tử (GDF15 trưởng thành của người = 12.278Da/monome).

Trước khi được đánh giá độ hòa tan, mỗi protein đột biến N-Glycan đã thao tác di truyền nêu trong Fig.8A và protein đột biến Δ N3-M16 được đánh giá cả về khả năng tiết như một đồng dime GDF15 gấp nếp trong môi trường nuôi cấy mô của động vật có vú và về sự chiếm giữ vị trí N-glycan. Như nêu trong Fig.9, mười bốn trong số mười tám protein đột biến được glycosyl hóa được tiết ra dưới dạng đồng dime GDF15 gấp nếp, trong khi đó M8, M10, M14 và M15 không tạo ra dime và được biểu hiện dưới dạng kết tụ. Toàn bộ mười bốn protein đột biến glycosyl hóa được biểu hiện mà được tiết ra ở dạng đồng dime được đánh giá sau đó bởi LC/MS và sự chuyển dịch trên gel SDS-PAGE để xác định sự chiếm giữ các nhóm N-Glycan trên vị trí liên ứng sau khi tinh chế từ môi trường có điều kiện. Ở tất cả mười bốn trường hợp, các protein đột biến được biểu hiện đều có mức độ chiếm giữ cao và một tập con được phân tích về sự cải thiện các đặc tính vật lý như độ hòa tan.

Các protein đột biến GDF15 N-Glycan được thao tác di truyền mà đều được tiết ra ở dạng đồng dime và có mức chiếm giữ glycan cao trong vị trí liên ứng được kiểm tra về sự cải thiện độ hòa tan so với GDF15 trưởng thành của người. Điểm thay đổi mà tại đó độ đục bắt đầu xuất hiện được chấp nhận là độ hòa tan tối đa cho mỗi protein đột biến. Các protein đột biến được phân loại vào một trong số năm nhóm tùy thuộc vào mức hòa tan của chúng: $< 0,2\text{mg/ml} = +$; $\geq 0,2\text{mg/ml} = ++$; $\geq 0,5\text{mg/ml} = +++$; $\geq$

1,0mg/ml = ++++; $\geq 5,0$ mg/ml = +++++, mỗi protein đột biến GDF15 N-glycan mà được đánh giá thể hiện độ hòa tan tốt hơn so với GDF15 trưởng thành của người: M5: +++++, M7: +++, M11: +++, M12: +++, M13: +++++, M16: +++++, Δ N3-M16: +++++, M17: +++++, M20: +++++, M21: +++.

Ví dụ 4: Tác dụng của các protein đột biến M16, Δ N3-M16 và M17 lên sự hấp thu thức ăn ở mẫu chuột DIO

Tác dụng của các glycoprotein đột biến dùng dưới da lên sự hấp thu thức ăn được đánh giá. Glycoprotein đột biến M16 (SEQ ID NO: 92) và M17 (SEQ ID NO: 93) được mô tả trong ví dụ 3 trên đây. Glycoprotein đột biến được ký hiệu là Δ N3-M16 cũng được đánh giá. Trình tự của glycoprotein đột biến Δ N3-M16 được đề xuất như dưới đây:

mdmrvpaqlglglwlgarcGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSP
REVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI
QNTTTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 100)

Cần lưu ý rằng các polypeptit được sử dụng cho chuột không bao gồm trình tự tín hiệu IgK (mdmrvpaqlglglwlgarc, SEQ ID NO: 101) như trình tự tín hiệu IgK được cắt ra từ polypeptit được tiết ra bởi peptidaza tín hiệu được biểu hiện bởi các tế bào (các tế bào 293).

Tham khảo Fig.10, việc dùng dưới da một liều đơn 1,0mg/kg (40 nmol/Kg) chất dẫn PBS, GDF15 trưởng thành của người hoặc protein đột biến N-glycan được tiến hành cho chuột DIO đực 17 tuần tuổi (n = 9). Sự hấp thu thức ăn (gam/chuột) sau 24 giờ dùng dưới da được kiểm tra. Các giá trị P được xác định bằng kiểm định T student hai nhóm độc lập so với nhóm đối chứng dùng chất dẫn (PBS).

Như được thể hiện trong Fig.10, việc sử dụng glycoprotein đột biến dẫn đến làm giảm sự hấp thu thức ăn. Ở mỗi nhóm chuột, các giá trị p (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$) được xác định bằng kiểm định T student hai nhóm độc lập so sánh nhóm hấp thu thức ăn với nhóm đối chứng dùng chất dẫn. GDF15 kiểu dại cũng làm giảm sự hấp thu thức ăn.

Ví dụ 5: Tác dụng của các protein đột biến M16, Δ N3-M16 và M17 đến thể trọng ở mẫu chuột DIO

Tác dụng của các glycoprotein đột biến dùng dưới da đến thể trọng được đánh giá. Cho chuột đực DIO 17 tuần tuổi ($n = 9$) sử dụng dưới da một liều đơn 1,0mg/kg (40nmol/kg) chất dẫn PBS, GDF15 trưởng thành của người hoặc protein đột biến N-glycan (M16, M17, và Δ N3-M16). Kiểm tra thể trọng sau 24 giờ dùng dưới da. Các giá trị p được xác định bằng kiểm định T student hai nhóm độc lập so với nhóm đối chứng dùng chất dẫn (PBS).

Việc sử dụng glycoprotein đột biến dẫn đến làm giảm thể trọng (Fig.11). Ở mỗi nhóm chuột, các giá trị p (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$) được xác định bằng kiểm định T student hai nhóm độc lập so sánh nhóm hấp thu thức ăn với nhóm đối chứng dùng chất dẫn. GDF15 kiểu dại cũng làm giảm thể trọng.

Danh mục trình tự đi kèm được thể hiện dưới dạng tệp tin text

Danh mục trình tự đi kèm được thể hiện dưới dạng tệp tin text, “NGMB-139WO_SeqList.txt” được tạo ra vào ngày 22/07/2015 và có kích thước 133 KB. Nội dung của file text này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Viện dẫn chéo đến các đơn có liên quan

Đơn này yêu cầu bảo hộ quyền ưu tiên của chuỗi đơn tạm thời Mỹ số 62/031,063, nộp ngày 30/07/2014 và chuỗi đơn tạm thời Mỹ số 62/195,908 nộp ngày 23/7/2015, các đơn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các phương án cụ thể theo sáng chế được mô tả ở đây, kể cả phương án tốt nhất đã biết đối với các tác giả sáng chế để thực hiện sáng chế. Bằng cách đọc người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể hiểu được phần mô tả, các phương án thay đổi của các phương án được bộc lộ trên đây, và hi vọng rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể sử dụng các phương án thay đổi này khi cần. Do đó, sáng chế được dự định là được thực hiện chứ không phải là được mô tả cụ thể ở đây, và sáng chế bao gồm các phương án thay đổi và các phương án tương đương của đối tượng được nêu trong yêu cầu bảo hộ đi kèm dưới sự cho phép bởi luật áp dụng. Hơn thế nữa, sáng chế cũng bao gồm cả phương án tổ hợp các khía cạnh nêu trên ở tất

cả các dạng thay đổi có thể có của chúng trừ khi được quy định theo cách khác hoặc được phủ nhận rõ ràng theo cách khác trong phần mô tả.

Tất cả các công bố, các đơn patent, các số truy cập và các số viện dẫn khác nêu trong bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn như là mỗi công bố, hoặc đơn patent được nêu riêng và cụ thể được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit chứa trình tự axit amin liên kế mà là tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1,
trong đó polypeptit này chứa ít nhất một trong số các cặp thay thế axit amin tương ứng trong SEQ ID NO: 1 dưới đây:
(a) K91N và D93T/S hoặc
(b) D93N và G95T/S
trong đó polypeptit này là phù hợp để dùng trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh về chuyển hóa, bệnh kèm theo rối loạn chuyển hóa, rối loạn cân nặng hoặc rối loạn chuyển hóa glucoza.
2. Polypeptit theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin liên kế là tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1.
3. Polypeptit theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin liên kế là tương đồng ít nhất 97% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1.
4. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trình tự polypeptit này chứa các thay thế K91N và D93T/S của axit amin tương ứng ở SEQ ID NO: 1.
5. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trình tự polypeptit thiếu ba axit amin đầu tiên có mặt ở đầu tận cùng N của SEQ ID NO: 1.
6. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này thiếu sáu axit amin đầu tiên có mặt ở đầu tận cùng N của SEQ ID NO: 1.
7. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này thiếu mười bốn axit amin đầu tiên có mặt ở đầu tận cùng N của SEQ ID NO: 1.
8. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 5, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 30.
9. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 30.

10. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 13, 14 và 31.
11. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polypeptit này được dung hợp với polypeptit khác loại.
12. Polypeptit theo điểm 11, trong đó polypeptit khác loại là albumin huyết thanh, protein liên kết với maltoza, hoặc polypeptit Fc của globulin miễn dịch, và trong đó polypeptit khác loại được dung hợp với đầu tận cùng N của polypeptit hoặc đầu tận cùng C của polypeptit.
13. Đime chứa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên.
14. Đime theo điểm 13, trong đó đime này là (a) homodime và/hoặc (b) được N-glycosyl hóa.
15. Đime theo điểm 13, trong đó đime này là đime cải biến đã được N-glycosyl hóa bằng GDF15N, trong đó đime cải biến đã được N-glycosyl hóa bằng GDF15N là homodime có hai polypeptit mà mỗi polypeptit có cùng các trình tự axit amin, trong đó polypeptit này chứa ít nhất là một vị trí N-glycosyl hóa mà được N-glycosyl hóa.
16. Đime theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 15, trong đó đime này đều chứa hai polypeptit mỗi polypeptit chứa trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 30.
17. Đime được N-glycosyl hóa chứa hai polypeptit đã được kết hợp cộng hóa trị với nhau, trong đó mỗi polypeptit trong số hai polypeptit này đều chứa trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 30.
18. Đime được N-glycosyl hóa chứa hai polypeptit đã được kết hợp cộng hóa trị với nhau, trong đó mỗi polypeptit trong số hai polypeptit này đều chỉ chứa trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 30.
19. Phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12 hoặc đime theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 18.

20. Vật truyền chứa phân tử axit nucleic theo điểm 19, trong đó phân tử axit nucleic này liên kết khi hoạt động với yếu tố kiểm soát biểu hiện mà gây ra sự biểu hiện của phân tử axit nucleic này *in vitro* hoặc *in vivo*.
21. Vật truyền theo điểm 20, trong đó vật truyền này chứa vật truyền virus.
22. Tế bào chủ mà biểu hiện polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12 hoặc đime theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 18.
23. Dược phẩm chứa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12 hoặc đime theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 18, và chất pha loãng, chất mang hoặc tá dược được dụng.
24. Vật chứa vô trùng chứa dược phẩm theo điểm 23.
25. Phương pháp tạo ra polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12 hoặc đime theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 18, phương pháp này bao gồm các bước:
nuôi cấy tế bào chủ biểu hiện polypeptit hoặc đime này; và
tinh chế polypeptit hoặc đime đã được biểu hiện.

Fig. 1

Các thể đột biến glycosyl hóa (được đánh số 1-17; SEQ ID NO: 2-18) được sắp thẳng hàng với GDF15 kiểu dại (SEQ ID NO: 1)

	1	10	20	30	40	50
WT	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60					
1	ARNGTHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60					
2	ARNGDHCPLGPGRCCNLTTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60					
3	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRANLTDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60					
4	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASNETLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60					
5	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPNQTRAANMHAQ 60					
6	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSNFTAANMHAQ 60					
7	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQNRTANMHAQ 60					
8	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFNATNMHAQ 60					
9	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60					
10	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60					
11	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60					
12	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60					
13	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60					
14	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60					
15	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60					
16	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60					
17	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60					
	61	70	80	90	100	110
WT	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:1)					
1	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:2)					
2	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:3)					
3	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:4)					
4	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:5)					
5	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:6)					
6	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:7)					
7	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:8)					
8	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:9)					
9	IKTNLTRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:10)					
10	IKTSNHTLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:11)					
11	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPANYTPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:12)					
12	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:13)					
13	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTNNTTVSLQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:14)					
14	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDNGTSLQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:15)					
15	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGNSTQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:16)					
16	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGNLTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:17)					
17	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLNKTCHCI (SEQ ID NO:18)					

Fig. 2

Các thể đột biến $\Delta N3$ glycosyl hóa (được đánh số 18-34; SEQ ID NO: 19-35) được sắp thẳng hàng với GDF15 kiểu đại (SEQ ID NO: 1)

	1	10	20	30	40	50	
WT	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
18	GTHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
19	GDHCPLGPGRCCNLTTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
20	GDHCPLGPGRCCRLHTVRANLTDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
21	GDHCPLGPGRCCRLHTVNASNETLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
22	GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPNQTRAANMHAQ 60						
23	GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSNFTAANMHAQ 60						
24	GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQNRTANMHAQ 60						
25	GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFNATNMHAQ 60						
26	GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
27	GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
28	GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
29	GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
30	GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
31	GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
32	GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
33	GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
34	GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
	61	70	80	90	100	110	
WT	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:1)						
18	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:19)						
19	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:20)						
20	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:21)						
21	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:22)						
22	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:23)						
23	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:24)						
24	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:25)						
25	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:26)						
26	IKTNLTRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:27)						
27	IKTSNHTLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:28)						
28	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPANYTPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:29)						
29	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:30)						
30	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKNTTTVSLQTYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:31)						
31	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDNGTSLQTYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:32)						
32	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGNSTQTYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:33)						
33	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGNLTQTYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:34)						
34	IKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLNKTCHCI (SEQ ID NO:35)						

Fig. 3

Protein dung hợp M1: trình tự tín hiệu IgK (chữ in thường) được dung hợp với trình tự axit amin của HSA được dung hợp với trình tự liên kết [(Gly₄-Ser)]₃ (được gạch chân) với đầu cuối N của GDF15 trưởng thành của người (in đậm) (SEQ ID NO: 77)

mdmrtpaqllgllllwlrgrarcDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVA
 DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEE
 TFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGER
 AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECC HGDLL ECADDRADLAKYI CENQDSI SSKLKECCEKPLLEK
 SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTLEKCCAA
 ADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKH
 PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD ETVYPKEFNAETFTFHADICTLS
 EKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGG
SGGGGS **ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD**
TVPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

Protein dung hợp M2: trình tự tín hiệu IgK (chữ in thường) được dung hợp với trình tự axit amin của HSA được dung hợp với trình tự liên kết [(Gly₄-Ser)]₃ (được gạch chân) với đầu cuối N của GDF15 trưởng thành của người (in đậm) bị mất 3 axit amin (Δ ARN) (SEQ ID NO: 78)

mdmrtpaqllgllllwlrgrarcDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVA
 DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEE
 TFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGER
 AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECC HGDLL ECADDRADLAKYI CENQDSI SSKLKECCEKPLLEK
 SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTLEKCCAA
 ADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKH
 PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD ETVYPKEFNAETFTFHADICTLS
 EKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGG
SGGGGS **GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD**
APCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

Fig. 4

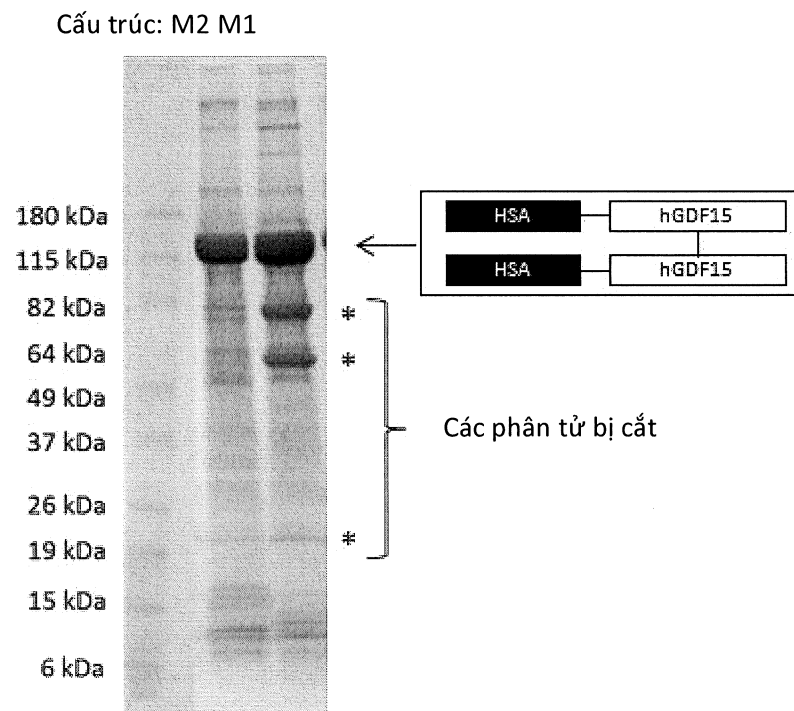


Fig. 5

Protein dung hợp M3: trình tự tín hiệu IgK (in thường) được dung hợp với trình tự axit amin của HAS được dung hợp với trình tự liên kết [(Gly₄-Ser)]₅ (được gạch chân) với đầu cuối N của trình tự axit amin của GDF15 trưởng thành của người (in đậm) bị mất 3 axit amin (được ký hiệu là ΔARN hoặc ΔN3) (SEQ ID NO: 79)

```
mdmrtpaqlglgllllwlrgrcDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQCFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFHQKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEE
TFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCAASLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEK
SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAA
ADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQLEGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKH
PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS
EKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGG
SGGGSGGGSGGGSGGGSGDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTS
LHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI
```

Protein dung hợp - M4: trình tự tín hiệu IgK (in thường) được dung hợp với trình tự axit amin của HAS được dung hợp với trình tự liên kết [(Gly₄-Ser)]₅ (được gạch chân) với đầu cuối N của trình tự axit amin của GDF15 trưởng thành của người (in đậm) bị mất 6 axit amin (được ký hiệu là ΔARNGDH hoặc ΔN6) (SEQ ID NO: 80)

```
mdmrtpaqlglgllllwlrgrcDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQCFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFHQKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEE
TFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCAASLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEK
SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAA
ADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQLEGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKH
PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS
EKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGG
SGGGSGGGSGGGSGGGSCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHR
LKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI
```


Fig. 6

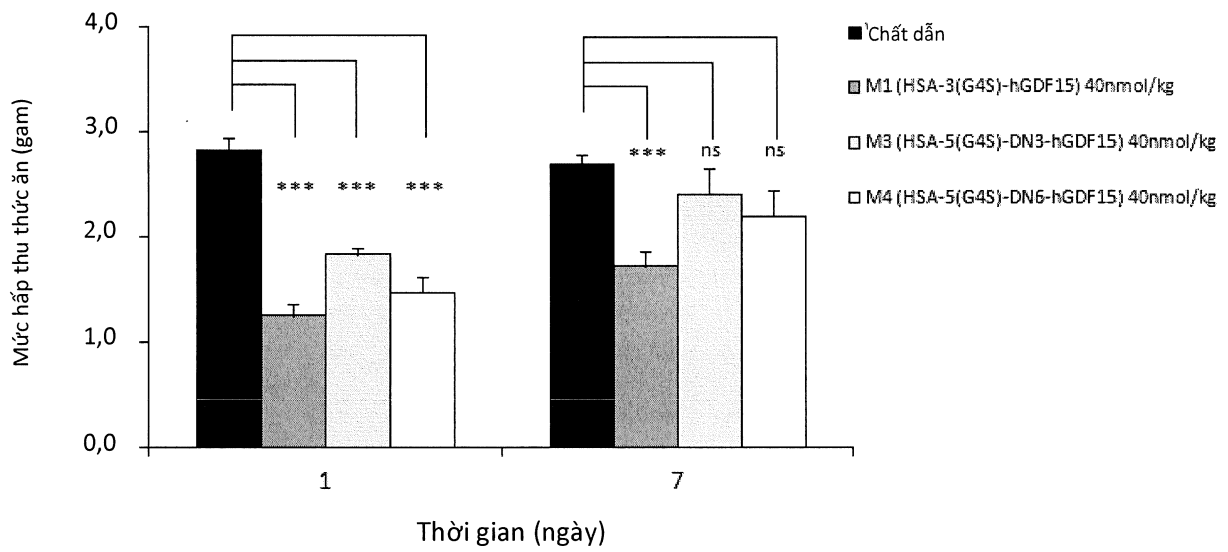


Fig. 7

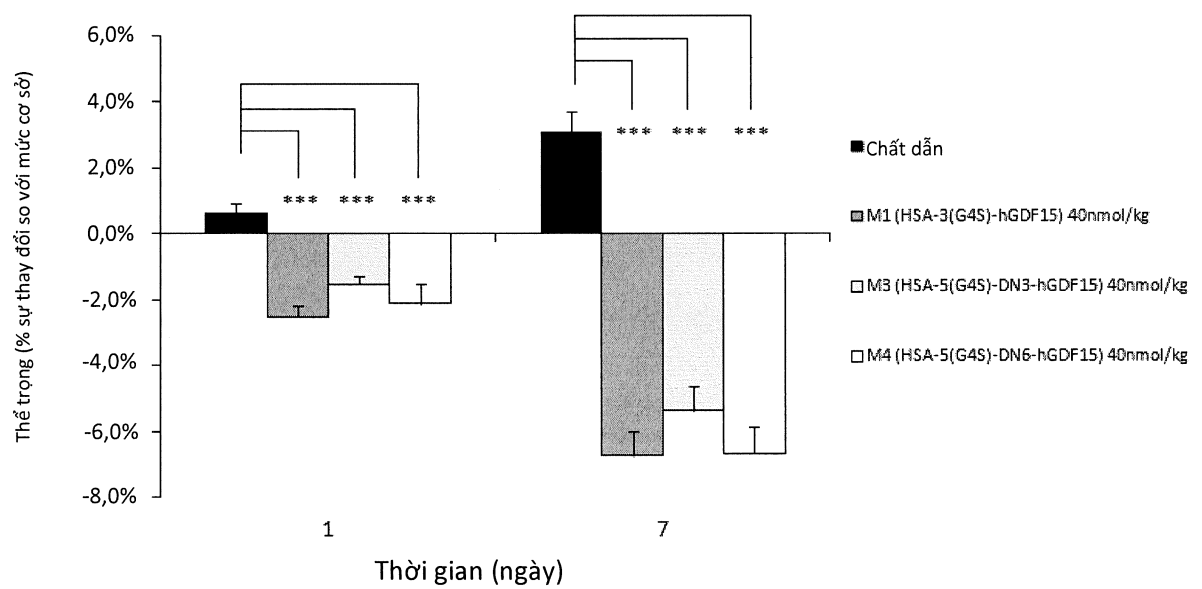


Fig. 8A

Các protein đột biến glycosyl hóa hGDF15 bao gồm trình tự tín hiệu IgK (chữ in thường) được dung hợp với đầu cuối N của trình tự axit amin của GDF15 trưởng thành của người (in đậm)

M5 - (SEQ ID NO: 81)

mdmrvpqllgllllwlr~~garc~~**ARNGTHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M6 - (SEQ ID NO: 82)

mdmrvpqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCNLTTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M7 - (SEQ ID NO: 83)

mdmrvpqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRANLTDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M8 - (SEQ ID NO: 84)

mdmrvpqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASNETLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M9 - (SEQ ID NO: 85)

mdmrvpqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PNQTRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M10 - (SEQ ID NO: 86)

mdmrvpqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSNFTAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M11 - (SEQ ID NO: 87)

mdmrvpqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQNRTANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M12 - (SEQ ID NO: 88)

mdmrvpqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFNATNMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M13 - (SEQ ID NO: 89)

mdmrvpqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTNLTRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M14 - (SEQ ID NO: 90)

mdmrvpqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSNHTLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

Fig. 8A (tiếp)

M15 - (SEQ ID NO: 91)

mdmrvpaqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTV**RASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVP**ANYTPMVLIQKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI**

M16 - (SEQ ID NO: 92)

mdmrvpaqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTV**RASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVP**ASYNPMVLIQNTTTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M17 - (SEQ ID NO: 93)

mdmrvpaqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTV**RASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVP**ASYNPMVLIQKTN**TTVSLQTYDDLLAKDCHCI**

M18 - (SEQ ID NO: 94)

mdmrvpaqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTV**RASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVP**ASYNPMVLIQKTDNGTSLQTYDDLLAKDCHCI

M19 - (SEQ ID NO: 95)

mdmrvpaqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTV**RASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVP**ASYNPMVLIQKTD**TGNSTQTYDDLLAKDCHCI**

M20 - (SEQ ID NO: 96)

mdmrvpaqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTV**RASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVP**ASYNPMVLIQKTD**TGVNLTTYDDLLAKDCHCI**

M21 - (SEQ ID NO: 97)

mdmrvpaqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTV**RASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVP**ASYNPMVLIQKTD**TGVSLQTYDDLLNKTCHCI**

Fig. 8B

Các trình tự axit nucleic mã hóa các protein đột biến glycosyl hóa hGDF15 bao gồm trình tự tín hiệu IgK được dung hợp với đầu cuối N của trình tự axit amin của GDF15 trưởng thành của người (như được thể hiện trong Fig.8A).

Các trình tự axit nucleic mã hóa M5

```
atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGACTCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCAA
CGCGTTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCGGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 108)
```

Các trình tự axit nucleic mã hóa M6

```
atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCAATCTGACCACGGTCCG
CGCGTTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCGGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 109)
```

Các trình tự axit nucleic mã hóa M7

```
atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGAACCTGACGGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCGGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 110)
```

Fig. 8B (tiếp)**Các trình tự axit nucleic mã hóa M8**

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCGAATGAAACCCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
 CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 111)

Các trình tự axit nucleic mã hóa M9

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAACCAGACCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
 CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 112)

Các trình tự axit nucleic mã hóa M10

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCAACTTCACGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
 CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 113)

Các trình tự axit nucleic mã hóa M11

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGAACCGGACGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
 CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 114)

Fig. 8B (tiếp)**Các trình tự axit nucleic mã hóa M12**

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCAACGCGACGAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
 CATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 115)

Các trình tự axit nucleic mã hóa M13

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 ACCTGACGCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
 CATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 116)

Các trình tự axit nucleic mã hóa M14

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 GCAACCACACCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
 CATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATA (SEQ ID NO: 117)

Các trình tự axit nucleic mã hóa M15

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAACTACACTCC
 CATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 118)

Fig. 8B (tiếp)**Các trình tự axit nucleic mã hóa M16**

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCGGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
 CATGGTGCTCATTCAAAACACCACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 119)

Các trình tự axit nucleic mã hóa M17

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCGGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
 CATGGTGCTCATTCAAAAGACCAACACCACGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 120)

Các trình tự axit nucleic mã hóa M18

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCGGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
 CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACAACGGGACGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 121)

Các trình tự axit nucleic mã hóa M19

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCGGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
 CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGAACCTCGACCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 122)

Fig. 8B (tiếp)**Các trình tự axit nucleic mã hóa M20**

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
 CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGAACCTCACGACCTATGATGACTTGTTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 123)

Các trình tự axit nucleic mã hóa M21

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTC
 GCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGC
 GCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGC
 CCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGA
 CACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAAACAAAACCTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
 NO: 124)

Fig. 8C

Trình tự axit amin Δ N3-M16 (trình tự tín hiệu IgK (chữ in thường) được dung hợp với đầu cuối N của GDF15 trưởng thành của người (In đậm)

mdmrvpaqllglllllwlrgarc**GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ**
FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID
 NO: 100)

Trình tự axit nucleic mã hóa Δ N3-M16

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCTCGCT
 GGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATC
 GCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACC
 GCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCT
 CATTCAAACACCACCACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGC
 CACTGCATATGA (SEQ ID NO: 125)

Fig. 8D

Trình tự axit amin của GDF15 trưởng thành kiểu đại của người được dung hợp với trình tự tín hiệu IgK ở đầu cuối N (IgK-WT-GDF15)

mdmrvpaqllglllllwlrgarc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLLQTYDDLAKDCHCI (SEQ
 ID NO: 126)

Axit nucleic mã hóa IgK-WT-GDF15

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
 CATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 127)

Fig. 9

Đánh giá sự tạo thành dime protein đột biến của GDF15 của người, sự chiếm giữ vị trí N-Glycan và độ hòa tan

<u>Mã nhận dạng protein đột biến</u>	<u>Dime</u>	<u>N-Glyc</u>	<u>Điểm thay đổi độ hòa tan</u>
hGDF15	CÓ	-	++
M5	CÓ	CÓ	++++
M6	CÓ	CÓ	Không được tiến hành
M7	CÓ	CÓ	+++
M8	KHÔNG	KHÔNG	Không được tiến hành
M9	CÓ	CÓ	Không được tiến hành
M10	KHÔNG	KHÔNG	Không được tiến hành
M11	CÓ	CÓ	+++
M12	CÓ	CÓ	+++
M13	CÓ	CÓ	++++
M14	KHÔNG	KHÔNG	Không được tiến hành
M15	KHÔNG	KHÔNG	Không được tiến hành
M16	CÓ	CÓ	+++++
Δ N3-M16	CÓ	CÓ	+++++
M17	CÓ	CÓ	+++++
M18	CÓ	CÓ	Không được tiến hành
M19	CÓ	CÓ	Không được tiến hành
M20	CÓ	CÓ	++++
M21	CÓ	CÓ	+++

Fig. 10

Mẫu chuột DIO

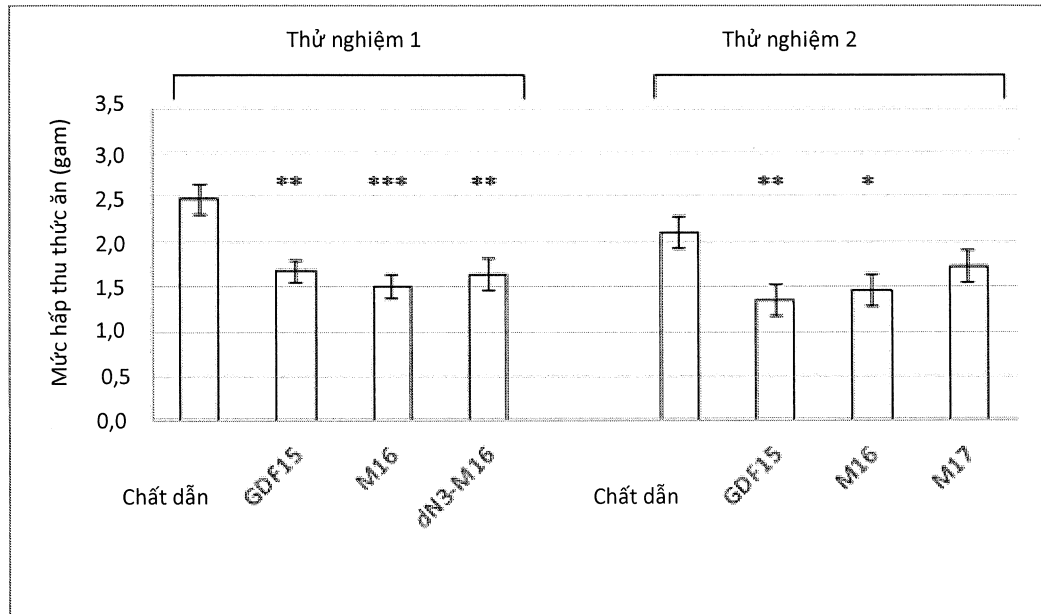
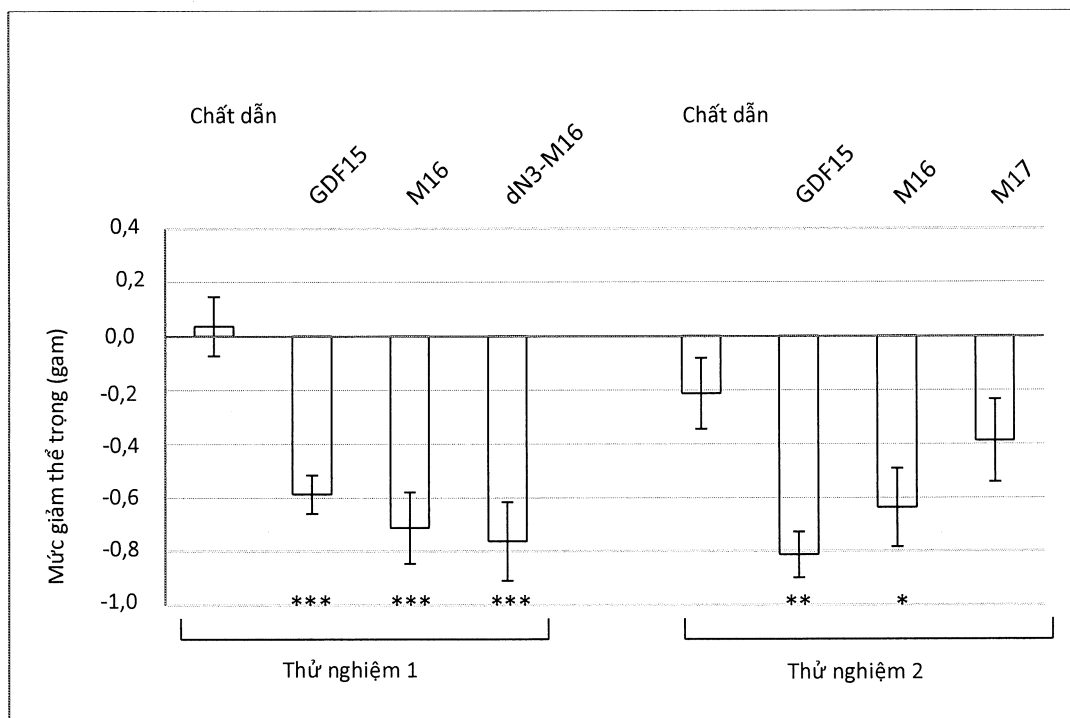


Fig. 11



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> NGM Biopharmaceuticals, Inc.
 Lindhout, Darrin A
 Haldankar, Raj
 Tian, Hui

<120> POLYPEPTIT, ĐIME, DƯỢC PHẨM DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ RỐI LOẠN CHUYỂN HÓA
 VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA POLYPEPTIT VÀ ĐIME NÀY

<130> NGMB-139WO

<150> US 62/031,063

<151> 30-07-2014

<160> 127

<170> Patent phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 1

Ala	Arg	Asn	Gly	Asp	His	Cys	Pro	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys	Cys	Arg
1				5					10					15	

Leu	His	Thr	Val	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Trp	Ala	Asp	Trp
			20					25					30		

Val	Leu	Ser	Pro	Arg	Glu	Val	Gln	Val	Thr	Met	Cys	Ile	Gly	Ala	Cys
		35					40					45			

Pro	Ser	Gln	Phe	Arg	Ala	Ala	Asn	Met	His	Ala	Gln	Ile	Lys	Thr	Ser
	50					55					60				

Leu	His	Arg	Leu	Lys	Pro	Asp	Thr	Val	Pro	Ala	Pro	Cys	Cys	Val	Pro
65					70					75					80

Ala	Ser	Tyr	Asn	Pro	Met	Val	Leu	Ile	Gln	Lys	Thr	Asp	Thr	Gly	Val
				85					90					95	

Ser	Leu	Gln	Thr	Tyr	Asp	Asp	Leu	Leu	Ala	Lys	Asp	Cys	His	Cys	Ile
							100		105				110		

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

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 2

Ala Arg Asn Gly Thr His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
 1 5 10 15

Leu His Thr Val Asn Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
 20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
 35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
 50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
 65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105 110

<210> 3
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 3

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Asn
 1 5 10 15

Leu Thr Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
 20 25 30

2

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 4

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Asn Leu Thr Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

3

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105 110

<210> 5

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 5

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
 1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Asn Glu Thr Leu Gly Trp Ala Asp Trp
 20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
 35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
 50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
 65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105 110

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 6

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Asn Gln Thr Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 7

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Asn Phe Thr Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 8

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Asn Arg Thr Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 9

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
 1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
 20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
 35 40 45

Pro Ser Gln Phe Asn Ala Thr Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
 50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
 65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105 110

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 10

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
 1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
 20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
 35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Asn
50 55 60

Leu Thr Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 11

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Asn His Thr Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 12

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
 1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
 20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
 35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
 50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
 65 70 75 80

Ala Asn Tyr Thr Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105 110

<210> 13
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 13

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
 1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Asn Thr Thr Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 14

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asn Thr Thr Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 15

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Asn Gly Thr
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 16

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 16

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
 1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
 20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
 35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
 50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
 65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Asn
 85 90 95

Ser Thr Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105 110

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 17

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
 1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
 20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
 35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
 50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Asn Leu Thr Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 18

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Asn Lys Thr Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 19

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 19

Gly	Thr	His	Cys	Pro	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys	Cys	Arg	Leu	His	Thr
1				5					10					15	

Val	Asn	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Trp	Ala	Asp	Trp	Val	Leu	Ser
			20					25					30		

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

Phe	Arg	Ala	Ala	Asn	Met	His	Ala	Gln	Ile	Lys	Thr	Ser	Leu	His	Arg
	50					55					60				

Leu	Lys	Pro	Asp	Thr	Val	Pro	Ala	Pro	Cys	Cys	Val	Pro	Ala	Ser	Tyr
65					70					75					80

Asn	Pro	Met	Val	Leu	Ile	Gln	Lys	Thr	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Leu	Gln
			85						90					95	

Thr	Tyr	Asp	Asp	Leu	Leu	Ala	Lys	Asp	Cys	His	Cys	Ile
			100					105				

<210> 20

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 20

Gly	Asp	His	Cys	Pro	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys	Cys	Asn	Leu	Thr	Thr
1				5					10					15	

Val	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Trp	Ala	Asp	Trp	Val	Leu	Ser
			20					25					30		

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

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 21

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 21

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Asn Leu Thr Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

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

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 22

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 22

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Asn Glu Thr Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

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

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 23

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 23

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

16

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Asn Gln
35 40 45

Thr Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 24

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 24

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Asn
35 40 45

Phe Thr Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
 85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105

<210> 25

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 25

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
 1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
 20 25 30

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

Asn Arg Thr Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
 50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
 85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105

<210> 26

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 26

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

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

Phe Asn Ala Thr Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 27

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 27

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

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

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Asn Leu Thr Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 28

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 28

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

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

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Asn His Thr
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 29
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 29

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
 1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
 20 25 30

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

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
 50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Asn Tyr
 65 70 75 80

Thr Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
 85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105

<210> 30
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 30

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
 1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
 20 25 30

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

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Asn Thr Thr Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 31

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 31

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

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

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asn Thr Thr Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 32

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 32

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

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

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Asn Gly Thr Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 33

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 33

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

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

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Asn Ser Thr Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 34

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 34

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

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

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Asn Leu Thr
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 35

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 35

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

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

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Asn Lys Thr Cys His Cys Ile
100 105

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 36

Arg Gly Arg Arg
 1

<210> 37
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 37

Arg Lys Arg Lys Lys Arg
 1 5

<210> 38
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 38

Arg Lys Lys Arg
 1

<210> 39
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 39

Arg Arg Arg Lys Lys Arg
 1 5

<210> 40
 <211> 4

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp
 <400> 40

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 41
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp
 <400> 41

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 42
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp
 <400> 42

Gly Gly Ser Gly
 1

<210> 43
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp
 <400> 43

Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5

<210> 44
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 44

Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5

<210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 45

Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5

<210> 46
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 46

Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5

<210> 47
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 47

Gly Ser Ser Ser Gly
 1 5

<210> 48
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 48

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ile Glu Gly Arg
 1 5 10

<210> 49
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 50
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 50

Glu Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 51
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (2)..(3)
 <223> axit amin ở vị trí này có thể là axit amin bất kỳ

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (4)..(4)
 <223> axit amin ở vị trí này có thể là axit amin kỵ nước

<400> 51

Pro Xaa Xaa Xaa

1

<210> 52
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (2)..(3)
 <223> axit amin ở vị trí này có thể là axit amin bất kỳ

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (4)..(4)
 <223> axit amin ở vị trí này có thể axit amin kỵ nước bất kỳ

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (5)..(5)
 <223> axit amin ở vị trí này có thể là Ser hoặc Thr

<400> 52

Pro Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (2)..(2)
 <223> axit amin ở vị trí này có thể là Leu hoặc Gln

<400> 53

Pro Xaa Gly Met Thr Ser
 1 5

<210> 54
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (2)..(2)
 <223> axit amin ở vị trí này có thể là Leu hoặc Gln

<400> 54

Pro Xaa Gly Met Thr
 1 5

<210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 55

Cys Gly Leu Val Pro Ala Gly Ser Gly Pro
 1 5 10

<210> 56
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 56

Ser Leu Leu Lys Ser Arg Met Val Pro Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 57
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 57

Ser Leu Leu Ile Ala Arg Arg Met Pro Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 58
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 58

Ser Lys Leu Val Gln Ala Ser Ala Ser Gly Val Asn
1 5 10

<210> 59
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 59

Ser Ser Tyr Leu Lys Ala Ser Asp Ala Pro Asp Asn
1 5 10

<210> 60
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 60

Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met Asn
1 5 10

<210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 61

Ser Leu Arg Pro Leu Ala Leu Trp Arg Ser Phe Asn
1 5 10

<210> 62

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 62

Ser Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 63

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 63

Asp Val Asp Glu Arg Asp Val Arg Gly Phe Ala Ser Phe Leu
1 5 10

<210> 64

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 64

Ser Leu Pro Leu Gly Leu Trp Ala Pro Asn Phe Asn
 1 5 10

<210> 65

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 65

Ser Leu Leu Ile Phe Arg Ser Trp Ala Asn Phe Asn
 1 5 10

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 66

Ser Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr
 1 5 10

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 67

Ser Leu Gly Pro Gln Gly Ile Trp Gly Gln Phe Asn
 1 5 10

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 68

Lys Lys Ser Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Ser Val
1 5 10

<210> 69

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 69

Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala Pro Gly Ile Leu Gly
1 5 10

<210> 70

<211> 31

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 70

His Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly Phe Tyr Glu Ser Asp Val Met
1 5 10 15

Gly Arg Gly His Ala Arg Leu Val His Val Glu Glu Pro His Thr
20 25 30

<210> 71

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 71

Gly Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Arg Gly Ile Val

1 5 10

<210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 72

Gly Gly Ser Gly Gln Arg Gly Arg Lys Ala Leu Glu
 1 5 10

<210> 73
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 73

Ser Leu Ser Ala Leu Leu Ser Ser Asp Ile Phe Asn
 1 5 10

<210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 74

Ser Leu Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly Phe Asn
 1 5 10

<210> 75
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 75

Ser Leu Leu Gly Ile Ala Val Pro Gly Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 76
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 76

Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro
1 5 10

<210> 77
<211> 734
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 77

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25 30

Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
35 40 45

Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
50 55 60

Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
65 70 75 80

Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
85 90 95

Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys

100	105	110
Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys		
115	120	125
Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val		
130	135	140
Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr		
145	150	155
		160
Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu		
	165	170
		175
Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln		
	180	185
		190
Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg		
195	200	205
Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser		
210	215	220
Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg		
225	230	235
		240
Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu		
	245	250
		255
Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu		
	260	265
		270
Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu		
275	280	285
Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro		
290	295	300
Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met		
305	310	315
		320

Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp
 325 330 335
 Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe
 340 345 350
 Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu
 355 360 365
 Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
 370 375 380
 Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys
 385 390 395 400
 Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu
 405 410 415
 Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg
 420 425 430
 Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val
 435 440 445
 Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu
 450 455 460
 Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn
 465 470 475 480
 Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr
 485 490 495
 Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
 500 505 510
 Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr
 515 520 525
 Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln

530 535 540
 Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
 545 550 555 560
 Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
 565 570 575
 Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
 580 585 590
 Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
 595 600 605
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg
 610 615 620
 Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His
 625 630 635 640
 Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu
 645 650 655
 Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser
 660 665 670
 Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His
 675 680 685
 Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser
 690 695 700
 Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu
 705 710 715 720
 Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 725 730
 <210> 78
 <211> 731
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 78

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25 30

Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
35 40 45

Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
50 55 60

Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
65 70 75 80

Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
85 90 95

Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
100 105 110

Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
115 120 125

Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val
130 135 140

Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr
145 150 155 160

Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
165 170 175

Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln
180 185 190

Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
 195 200 205

Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
 210 215 220

Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
 225 230 235 240

Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
 245 250 255

Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 260 265 270

Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu
 275 280 285

Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro
 290 295 300

Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met
 305 310 315 320

Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp
 325 330 335

Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe
 340 345 350

Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu
 355 360 365

Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
 370 375 380

Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys
 385 390 395 400

Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu

405 410 415
 Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg
 420 425 430
 Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val
 435 440 445
 Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu
 450 455 460
 Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn
 465 470 475 480
 Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr
 485 490 495
 Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
 500 505 510
 Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr
 515 520 525
 Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln
 530 535 540
 Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
 545 550 555 560
 Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
 565 570 575
 Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
 580 585 590
 Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
 595 600 605
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp
 610 615 620

His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg
625 630 635 640

Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg
645 650 655

Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg
660 665 670

Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys
675 680 685

Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro
690 695 700

Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr
705 710 715 720

Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
725 730

<210> 79

<211> 741

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 79

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25 30

Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
35 40 45

Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
50 55 60

Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
65 70 75 80

Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
85 90 95

Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
100 105 110

Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
115 120 125

Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val
130 135 140

Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr
145 150 155 160

Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
165 170 175

Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln
180 185 190

Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
195 200 205

Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
210 215 220

Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
225 230 235 240

Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
245 250 255

Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
260 265 270

Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu

275								280								285
Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	
290						295					300					
Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	
305					310					315					320	
Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	
				325					330					335		
Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	
			340					345					350			
Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	
		355					360					365				
Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	
	370					375					380					
Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	
385					390					395					400	
Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	
				405					410					415		
Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	
			420					425					430			
Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	
		435					440					445				
Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	
	450					455					460					
Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	
465					470					475					480	
Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	
				485					490					495		

Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
500 505 510

Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr
515 520 525

Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln
530 535 540

Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
545 550 555 560

Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
565 570 575

Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
580 585 590

Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
610 615 620

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro
625 630 635 640

Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu
645 650 655

Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met
660 665 670

Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala
675 680 685

Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala
690 695 700

Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys

705 710 715 720

Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys
725 730 735

Asp Cys His Cys Ile
740

```
<210> 80
<211> 738
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 80

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25 30

Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
35 40 45

Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
50 55 60

Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
65 70 75 80

Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
85 90 95

Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
100 105 110

Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
115 120 125

Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val

130 135 140
 Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr
 145 150 155 160
 Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
 165 170 175
 Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln
 180 185 190
 Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
 195 200 205
 Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
 210 215 220
 Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
 225 230 235 240
 Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
 245 250 255
 Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 260 265 270
 Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu
 275 280 285
 Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro
 290 295 300
 Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met
 305 310 315 320
 Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp
 325 330 335
 Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe
 340 345 350

Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu
355 360 365

Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
370 375 380

Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys
385 390 395 400

Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu
405 410 415

Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg
420 425 430

Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val
435 440 445

Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu
450 455 460

Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn
465 470 475 480

Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr
485 490 495

Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
500 505 510

Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr
515 520 525

Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln
530 535 540

Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
545 550 555 560

Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe

565										570				575				
Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu			
			580					585					590					
Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly			
		595					600					605						
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly			
	610					615						620						
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Cys	Pro	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys			
625					630					635					640			
Cys	Arg	Leu	His	Thr	Val	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Trp	Ala			
				645					650					655				
Asp	Trp	Val	Leu	Ser	Pro	Arg	Glu	Val	Gln	Val	Thr	Met	Cys	Ile	Gly			
			660					665					670					
Ala	Cys	Pro	Ser	Gln	Phe	Arg	Ala	Ala	Asn	Met	His	Ala	Gln	Ile	Lys			
		675					680					685						
Thr	Ser	Leu	His	Arg	Leu	Lys	Pro	Asp	Thr	Val	Pro	Ala	Pro	Cys	Cys			
	690					695						700						
Val	Pro	Ala	Ser	Tyr	Asn	Pro	Met	Val	Leu	Ile	Gln	Lys	Thr	Asp	Thr			
705					710					715					720			
Gly	Val	Ser	Leu	Gln	Thr	Tyr	Asp	Asp	Leu	Leu	Ala	Lys	Asp	Cys	His			
				725					730					735				

Cys Ile

<210> 81

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 81

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Thr His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Asn Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
 65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
 85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 82

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 82

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly

20

25

30

Pro Gly Arg Cys Cys Asn Leu Thr Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
 65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
 85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 83

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 83

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Asn Leu Thr Asp
 35 40 45

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

50

55

60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 84

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 84

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Asn Glu Thr
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

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

85

90

95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 85

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 85

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Asn Gln Thr Arg Ala Ala Asn Met His
 65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
 85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala

115 120 125
 Lys Asp Cys His Cys Ile
 130
 <210> 86
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp
 <400> 86
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30
 Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45
 Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60
 Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Asn Phe Thr Ala Ala Asn Met His
 65 70 75 80
 Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
 85 90 95
 Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110
 Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125
 Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 87

<211> 134
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 87

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Asn Arg Thr Ala Asn Met His
 65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
 85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 88
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 88

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Asn Ala Thr Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 89

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 89

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Asn Leu Thr Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 90

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 90

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Asn His Thr Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 91

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 91

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Asn Tyr Thr Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 92

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 92

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Asn Thr Thr Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 93

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 93

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asn Thr Thr Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 94

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 94

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Asn Gly Thr Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 95

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 95

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

[illegible]

```
<210> 96
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 96
```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp

35

40

45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
 65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
 85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Asn Leu Thr Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 97

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 97

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His

65

70

75

80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Asn
115 120 125

Lys Thr Cys His Cys Ile
130

<210> 98

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự polynucleotit tổng hợp

<400> 98

caccatggac atgaggggtcc ccgctcagct cctggggctc ctgctactct ggctccgagg
60

tgccagatgt

70

<210> 99

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự polynucleotit tổng hợp

<400> 99

cctcgagcgg ccgctagctc atatgcagtg gcagtctttg gctaacaa
48

<210> 100

<211> 131

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 100

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg
20 25 30

Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp
35 40 45

Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile
50 55 60

Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile
65 70 75 80

Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys
85 90 95

Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Asn Thr Thr
100 105 110

Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys
115 120 125

His Cys Ile
130

<210> 101

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 101

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys
20

<210> 102
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự polynucleotit tổng hợp

<400> 102
ctccgaggtg ccagatgtgc gcgcaacggg gaccactgtc cgctcggg
48

<210> 103
<211> 577
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> polypeptit tổng hợp

<400> 103

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg

325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala

<210> 104

<211> 584

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> polypeptit tổng hợp

<400> 104

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr

					340					345						350
Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	
		355					360					365				
Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	
	370					375					380					
Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	
385					390					395					400	
Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	
				405					410					415		
Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	
			420					425					430			
Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	
		435					440					445				
Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	
	450					455					460					
Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	
465					470					475					480	
Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	
				485					490					495		
Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	
			500					505					510			
Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	
		515					520					525				
Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	
	530					535					540					
Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	
545					550					555					560	

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
580

<210> 105

<211> 586

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> polypeptit tổng hợp

<400> 105

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
340 345 350

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

355

360

365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
580 585

<210> 106

<211> 602

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> polypeptit tổng hợp

<400> 106

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro

370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 580 585 590

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg
595 600

<210> 107

<211> 603

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> polypeptit tổng hợp

<400> 107

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro

370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 580 585 590

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg Asn
595 600

<210> 108

<211> 405

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 108

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc
60

agatgtgctg gcaacgggac tcactgtccg ctccggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac
120

acggtcaacg cgtcgctgga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag
180

gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggcggc aaacatgcac
240

gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccagaca cggtgccagc gccctgctgc
300

gtgcccgcga gctacaatcc catgggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc
360

cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
405

<210> 109

<211> 405

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 109

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc
60

agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctccggcccg ggcgttgctg caatctgacc
120

acggtccgcg cgtcgctgga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag
180

gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggcggc aaacatgcac
240

gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc
300

gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc
360

cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
405

<210> 110

<211> 405

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 110

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctgggt ccgaggtgcc
60

agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctccgggccg ggcgttgctg ccgtctgcac
120

acggtccgcg cgaacctgac ggacctgggc tgggccgatt gggtgctgtc gccacgggag
180

gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggcggc aaacatgcac
240

gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc
300

gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc
360

cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
405

<210> 111

<211> 405

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 111

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc
60

agatgtgcg gcaacgggga ccactgtccg ctcgggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac
120

acggtccgcg cgtcgaatga aaccctgggc tgggccgatt gggtgctgtc gccacgggag
180

gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggcggc aaacatgcac
240

gcgcatatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccagaca cggtgccagc gccctgctgc
300

gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgtc
360

cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
405

<210> 112

<211> 405

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 112

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc
60

agatgtgcg gcaacgggga ccactgtccg ctcgggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac
120

acggtccgcg cgtcgttgga agacctgggc tgggccgatt gggtgctgtc gccacgggag
180

gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgaaccaga cccgggcggc aaacatgcac
240

gcgcatatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccagaca cggtgccagc gccctgctgc
300

gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgtc
360

cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
405

<210> 113

<211> 405
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 113
 atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc
 60
 agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctggtggccg ggcgttgctg ccgtctgcac
 120
 acggtccgctg cgtcgtctgga agacctgggc tgggcccatt ggggtgctgtc gccacgggag
 180
 gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagcaact tcacggcggc aaacatgcac
 240
 ggcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagccccgaca cggtgccagc gccctgctgc
 300
 gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgtgc
 360
 cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
 405

<210> 114
 <211> 405
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 114
 atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc
 60
 agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctggtggccg ggcgttgctg ccgtctgcac
 120
 acggtccgctg cgtcgtctgga agacctgggc tgggcccatt ggggtgctgtc gccacgggag
 180
 gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccaga accggacggc aaacatgcac
 240
 ggcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagccccgaca cggtgccagc gccctgctgc
 300

gtgcccgcc gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga cgcacaccgg ggtgtcgctc
360

cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
405

<210> 115

<211> 405

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 115

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctgggt ccgaggtgcc
60

agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctccgggccg ggcgttgctg ccgtctgcac
120

acggtcctcg cgctcgctgga agacctgggc tgggccgatt ggtgtgctgc gccacgggag
180

gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tcaacgcgac gaacatgcac
240

gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccagca cggtgccagc gccctgctgc
300

gtgcccgcc gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga cgcacaccgg ggtgtcgctc
360

cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
405

<210> 116

<211> 405

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 116

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctgggt ccgaggtgcc
60

agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctccgggccg ggcgttgctg ccgtctgcac
120

acggtccgcg cgtcgctgga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag
180

gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccggggcggc aaacatgcac
240

gcgagatca agacgaacct gacgcgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc
300

gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgtc
360

cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
405

<210> 117

<211> 402

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 117

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctgggt ccgaggtgcc
60

agatgtgcgc gcaacgggga ccaactgtccg ctccgggccg ggcgttgctg ccgtctgcac
120

acggtccgcg cgtcgctgga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag
180

gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccggggcggc aaacatgcac
240

gcgagatca agacgagcaa ccacaccctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc
300

gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgtc
360

cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca ta
402

<210> 118

<211> 405

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 118

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctgggt ccgaggtgcc
60agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctctgggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac
120acgggtccgcg cgtcgtctga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag
180gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggcccgc aaacatgcac
240gctcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagccccgaca cgggtgccagc gccctgctgc
300gtgcccgcga actacactcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgtc
360cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
405

<210> 119

<211> 405

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 119

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctgggt ccgaggtgcc
60agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctctgggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac
120acgggtccgcg cgtcgtctga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag
180gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggcccgc aaacatgcac
240gctcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagccccgaca cgggtgccagc gccctgctgc
300gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaca ccaccaccgg ggtgtcgtc
360cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
405

<210> 120
 <211> 405
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 120
 atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc
 60
 agatgtgcgc gcaacgggga ccactgtccg ctcgggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac
 120
 acggtccgcg cgtcgctgga agacctgggc tgggccgatt gggtgctgtc gccacgggag
 180
 gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggcggc aaacatgcac
 240
 gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc
 300
 gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccaacaccac ggtgtcgctc
 360
 cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
 405

<210> 121
 <211> 405
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 121
 atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc
 60
 agatgtgcgc gcaacgggga ccactgtccg ctcgggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac
 120
 acggtccgcg cgtcgctgga agacctgggc tgggccgatt gggtgctgtc gccacgggag
 180
 gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggcggc aaacatgcac
 240

gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc
300

gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaacgg gacgtcgctc
360

cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
405

<210> 122

<211> 405

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 122

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc
60

agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctcgggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac
120

acgggtccgc cgctcgctgga agacctgggc tgggccgatt gggtgctgtc gccacgggag
180

gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggcggc aaacatgcac
240

gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc
300

gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg gaactcgacc
360

cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
405

<210> 123

<211> 405

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 123

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc
60

agatgtgcgc gcaacgggga ccactgtccg ctcggggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac
120

acgggtccgcg cgtcgctgga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgc gccacgggag
180

gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggcggc aaacatgcac
240

gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc
300

gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgaacctc
360

acgacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
405

<210> 124

<211> 405

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 124

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctgggt ccgaggtgcc
60

agatgtgcgc gcaacgggga ccactgtccg ctcggggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac
120

acgggtccgcg cgtcgctgga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgc gccacgggag
180

gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggcggc aaacatgcac
240

gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc
300

gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc
360

cagacctatg atgacttggt aaacaaaacc tgccactgca tatga
405

<210> 125

<211> 396

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 125

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc
60agatgtgggg accactgtcc gctcggggcc gggcgttgct gccgtctgca cacggtccgc
120gcgtcgctgg aagacctggg ctgggccgat tgggtgctgt cgccacggga ggtgcaagtg
180accatgtgca tcggcgcgctg cccgagccag ttccggggcg caaacatgca cgcgcagatc
240aagacgagcc tgcaccgcct gaagcccgac acggtgccag cgccctgctg cgtgccccgc
300agctacaatc ccatggtgct cattcaaaac accaccaccg ggggtgtcgt ccagacctat
360gatgacttgt tagccaaaga ctgccactgc atatga
396

<210> 126

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> polypeptit tổng hợp

<400> 126

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

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His

[illegible]

<210>	127
<211>	405
<212>	ADN
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

```
<400> 127
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctggct ccgaggtgcc
60
```

agatgtgctg gcaacgggga cactgtccg ctctggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac
120

acgggtccgcg cgtcgctgga agacctgggc tgggccgatt gggtgctgtc gccacgggag
180

gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggcggc aaacatgcac
240

gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc
300

gtgcccgcda gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc
360

cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga
405