

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

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

(11)



1-0035364

(51)⁸ **C07K 14/62; C12N 15/62; A61K 38/28 (13) B**

(21) 1-2017-04191

(22) 28/04/2016

(86) PCT/US2016/029807 28/04/2016

(87) WO2016/178905 10/11/2016

(30) 62/158,079 07/05/2015 US

(45) 25/04/2023 421

(43) 26/02/2018 359A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

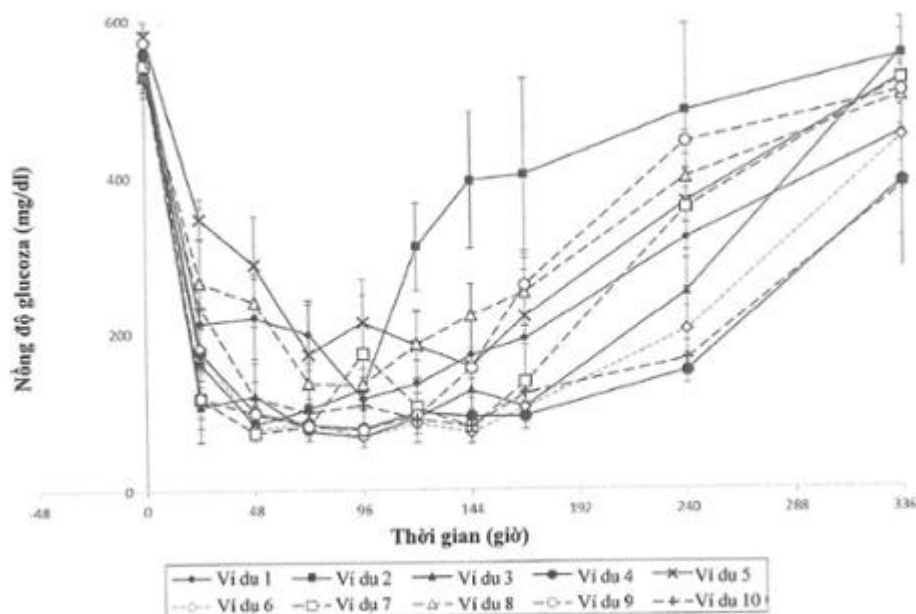
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) BALDWIN, David Bruce (US); BEALS, John Michael (US); DAY, Jonathan Wesley (US); DICKINSON, Craig Duane (US); KORYTKO, Andrew Ihor (US); LAZAR, Gregory Alan (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PROTEIN DUNG HỢP VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN DUNG HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các protein dung hợp chứa chất chủ vận thụ thể insulin được dung hợp với vùng Fc của IgG người thông qua việc sử dụng cầu liên kết peptit. Các protein dung hợp theo sáng chế hữu dụng trong việc điều trị bệnh tiểu đường. Các protein dung hợp theo sáng chế có profin hoạt động theo thời gian kéo dài và hữu dụng để tạo ra sự kiểm soát mức glucoza cơ sở trong khoảng thời gian kéo dài. Sáng chế cũng đề cập đến homodime của các protein dung hợp theo sáng chế, được phẩm chứa chúng và polynucleotit mã hóa các protein dung hợp này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các protein dung hợp để sử dụng trong việc điều trị bệnh tiểu đường. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các protein dung hợp chứa chất chủ vận thụ thể insulin được dung hợp với vùng Fc của IgG người với cầu liên kết peptit, và việc sử dụng các protein như vậy trong việc điều trị bệnh tiểu đường. Các protein dung hợp theo sáng chế có profin hoạt động theo thời gian kéo dài và hữu dụng để tạo ra sự kiểm soát kéo dài mức glucoza cơ bản và kìm hãm sự giải phóng glucoza từ gan.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh đái tháo đường là rối loạn mạn tính đặc trưng bởi sự tăng đường huyết do thiếu hụt insulin tiết ra, hoạt tính insulin, hoặc cả hai. Bệnh đái tháo đường typ 1 đặc trưng bởi khả năng tiết insulin rất thấp hoặc không có khả năng tiết insulin, và bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường typ 1 cần có insulin để sống được. Bệnh đái tháo đường typ 2 đặc trưng bởi mức glucoza trong máu tăng do khả năng tiết insulin suy giảm, kháng insulin, giải phóng glucoza từ gan quá mức, và/hoặc do tất cả các nguyên nhân nêu trên. Trong số ít nhất một phần ba số bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường typ 2, bệnh tiến triển đến mức tuyệt đối cần điều trị bằng insulin.

Để đạt được mức đường huyết bình thường, cần có liệu pháp thay thế insulin song song, càng gần càng tốt, với cơ chế tiết insulin nội sinh ở các cá thể bình thường. Nhu cầu sinh lý hằng ngày về insulin là thay đổi và có thể tách thành hai pha: (a) pha thời gian dùng bữa đòi hỏi liều cao (liều bolus) insulin để ổn định lại mức glucoza huyết tăng cao do bữa ăn, và (b) pha giữa các bữa ăn đòi hỏi lượng duy trì (mức cơ sở) insulin để điều hòa sự giải phóng glucoza từ gan để giữ được mức glucoza huyết lúc đói tối ưu.

Do bệnh nhân tiểu đường typ 1 chỉ tạo ra một lượng nhỏ insulin hoặc không tạo ra insulin, liệu pháp insulin hữu hiệu cho bệnh nhân tiểu đường typ 1 thường bao gồm việc sử dụng hai loại insulin ngoại sinh: insulin hoạt động nhanh, trong thời gian dùng bữa được cấp dưới dạng liều bolus, và insulin cơ bản hoạt động kéo dài dùng một hoặc hai lần một ngày để kiểm soát mức glucoza huyết giữa các bữa ăn. Việc điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh tiểu đường typ 2 thường bắt đầu bằng giảm cân theo quy định, luyện tập, và chế độ ăn cho bệnh nhân tiểu đường, nhưng khi những biện pháp này không kiểm

soát được mức đường huyết tăng, thì thuốc dùng đường uống và liệu pháp dựa trên incretin, như sử dụng các chất chủ vận thụ thể peptit-1 giống glucagon (GLP-1) và/hoặc các chất ức chế dipeptidyl peptidaza 4 (DPP-4) là làm tăng mức incretin, có thể là cần thiết. Khi các thuốc này vẫn không đủ, việc điều trị bằng insulin sẽ được xem xét. Bệnh nhân tiểu đường typ 2, những người bệnh của họ đã tiến triển đến mức cần dùng liệu pháp insulin thường bắt đầu bằng việc tiêm một lần một ngày insulin cơ bản hoạt động kéo dài, mặc dù có thể có thêm những lần tiêm insulin hoạt động nhanh khi dùng bữa, nếu cần, trong một số trường hợp.

Một số loại insulin cơ bản hiện đã sẵn có. Insulin glargine, được bán dưới tên thương mại LANTUS®, bao gồm cấu trúc insulin cải biến trong đó asparagin ở vị trí 21 trong chuỗi A của insulin được thay bằng glyxin, và hai arginin được thêm vào đầu tận cùng C của chuỗi B. Insulin detemir, được bán dưới tên thương mại LEVEMIR®, bao gồm cấu trúc insulin cải biến trong đó threonin ở vị trí 30 của chuỗi B bị xóa bỏ và lysin ở vị trí 29 của chuỗi B được tạo dẫn xuất thông qua liên kết cộng hóa trị của cacbon 14, axit béo myristoyl thành nhóm ϵ -amin của lysin ở vị trí B29. Insulin degludec, có bán ở châu Âu và Nhật dưới tên thương mại TRESIBA®, bao gồm cấu trúc insulin cải biến trong đó threonin ở vị trí 30 của chuỗi B được xóa bỏ, và nhóm ϵ -amino của lysin ở vị trí 29 của chuỗi B được tạo dẫn xuất cộng hóa trị với axit hexadecandioic thông qua cầu liên kết axit γ -L-glutamic. Tất cả các insulin này được chỉ định để dùng một lần một ngày.

Các chế độ điều trị bao gồm tiêm hằng ngày các liệu pháp insulin đã có có thể phức tạp và đau đớn và có thể gây ra các tác dụng phụ không mong muốn, như hạ đường huyết và tăng trọng. Do đó, nhiều bệnh nhân tiểu đường không sẵn lòng hoặc không thể tuân thủ, hoặc không có khả năng tuân thủ, liệu pháp insulin cần để duy trì sự kiểm soát chặt chẽ mức glucoza huyết. Việc kiểm soát đường huyết kém làm tăng nguy cơ phát triển các biến chứng liên quan đến bệnh tiểu đường nghiêm trọng ở bệnh nhân, bao gồm bệnh tim mạch, đột quỵ, thương tổn thần kinh, cắt cụt chi dưới, mất thị lực, và bệnh thận. Nghiên cứu đã được tiến hành để nhận dạng các sản phẩm insulin với thời gian hoạt động dài hơn; do đó, cần ít lần tiêm hơn so với các sản phẩm insulin hiện có để cải thiện mức độ chấp nhận và tuân thủ.

CN103509118 mô tả các protein với chuỗi B insulin người và chuỗi A insulin người được kết nối bằng trình tự nối peptit C gồm 4 đến 50 axit amin, và với chuỗi A insulin gắn trực tiếp, không qua cầu liên kết bổ sung, với mảnh Fc của globulin miễn dịch, và tuyên bố rằng thử nghiệm trên chuột cho thấy các protein như vậy có thời gian bán hủy in vivo kéo dài đến khoảng 3 ngày. KR101324828 mô tả các chất tương tự proinsulin được liên kết với các vùng Fc của globulin miễn dịch thông qua việc sử dụng các cầu liên kết không peptit, và tuyên bố rằng các protein như vậy tạo ra thời gian bán hủy trong huyết thanh tăng so với các liệu pháp đã có. Công bố này cho rằng các cầu nối không peptit đem lại cải thiện có với các cầu nối peptit, khẳng định rằng các protein dung hợp sử dụng cầu nối peptit không thể làm tăng thời gian bán hủy của dược chất trong máu do các cầu nối peptit dễ dàng bị bẻ gãy bởi các enzym trong cơ thể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Bất kể các nội dung bộc lộ trên đây, và/hoặc trong các công bố bất kỳ khác, các tác giả sáng chế đã vượt qua nhiều trở ngại để khám phá ra các protein dung hợp chứa chất chủ vận thụ thể insulin, các cầu nối peptit, và các vùng Fc của IgG người đáp ứng được nhu cầu hiện tại về sản phẩm làm giảm mức glucoza với thời gian hoạt động tăng, đủ để sử dụng liều ít thường xuyên hơn so với các sản phẩm insulin hiện có, bao gồm sử dụng liều không thường xuyên ở mức một tuần một lần. Ví dụ, để đạt được profile hoạt động theo thời gian kéo dài như mong muốn, cần xử lý kỹ thuật các protein dung hợp với hiệu lực giảm để tránh sự thanh thải qua trung gian thụ thể nhanh, con đường thanh thải chính của insulin, nhưng vẫn đủ hiệu lực để làm giảm đủ mức glucoza. Hơn nữa, để giảm thiểu sự thanh thải ở thận, con đường thanh thải insulin chính, và để điều hòa sự phơi nhiễm ngoại vi thông qua sự khuếch tán thủy lực qua kẽ giữa các tế bào hạn chế về kích thước, cần tạo ra các protein dung hợp vốn đủ lớn và không có chất chủ vận thụ thể insulin được phân cắt bằng cách phân giải protein từ vùng Fc của IgG người sau khi sử dụng, vì sự phân cắt như vậy có thể làm cho sự thanh thải chất chủ vận thụ thể insulin ở thận nhanh hơn mong muốn ngay cả nếu vùng Fc của IgG người duy trì được trong hệ tuần hoàn. Ngoài ra, các vùng Fc của IgG đã tiến hóa để tự kết hợp để tạo ra dạng dimer ổn định, và khi dimer như vậy được tạo ra từ hai protein dung hợp, mỗi protein chứa một gốc insulin được dung hợp với vùng Fc của IgG, hai gốc insulin được đưa đến gần nhau, dẫn đến sự tự kết hợp, hoặc dimer hóa các gốc insulin, thông qua các vùng tự kết hợp trong chuỗi B insulin. Các dimer insulin như vậy là không hoạt động, vì thế cần

tạo ra các protein dung hợp với số lượng gốc chủ vận thụ thể insulin tự kết hợp giảm. Nhiều thách thức khác đã được vượt qua để tạo ra protein dung hợp thích hợp để sản xuất ở quy mô thương mại và bào chế thành thuốc điều trị. Sáng chế đề xuất các protein dung hợp mà có thời gian hoạt động kéo dài so với các thuốc điều trị insulin hiện có, cho phép tiêm ít thường xuyên hơn so với các sản phẩm insulin hiện có, bao gồm ít thường xuyên tới mức một lần một tuần, nhờ đó giảm độ phức tạp và đau đớn có liên quan đến các chế độ điều trị hiện có mà cần tiêm thường xuyên hơn. Các protein dung hợp theo sáng chế có protein được động học bằng phẳng và mức độ phơi nhiễm ngoại vi hạn chế, dẫn đến khả năng thay đổi từ ngày này sang ngày khác thấp, và tỷ lệ hạ đường huyết tối thiểu, bao gồm cả khi được cấp theo tổ hợp với thuốc chữa bệnh tiểu đường medication, như liệu pháp dựa trên incretin. Các protein dung hợp theo sáng chế cũng có thể tạo ra thời gian hoạt động kéo dài mà không gây tăng trọng.

Sáng chế đề xuất protein dung hợp chứa:

a) chất chủ vận thụ thể insulin có công thức chung Z_1 - Z_2 - Z_3 , trong đó

i) Z_1 là thành phần tương tự chuỗi B insulin, chứa trình tự axit amin:

$X_1X_2X_3QHLCGSHLVEALX_4LVCGERGFX_5YX_6X_7X_8X_9$

trong đó X_1 là F, Q hoặc A; X_2 là V hoặc G; X_3 là N, K, D, G, Q, A hoặc E; X_4 là E, Y, Q, hoặc H; X_5 là H hoặc F; X_6 là G, T, S, H, V hoặc không có mặt; X_7 là G, E, P, K, D, S, H hoặc không có mặt; X_8 là G, E, K, P, Q, D, H hoặc không có mặt; X_9 là G, T, S, E, K, A hoặc không có mặt, với điều kiện là thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm ít nhất một cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , hoặc X_9 (SEQ ID NO:1);

ii) Z_2 là cầu liên kết peptit thứ nhất gồm 5 đến 10 axit amin, trong đó ít nhất 5 trong số các axit amin này là gốc G; và

iii) Z_3 là thành phần tương tự chuỗi A insulin, chứa trình tự axit amin:

$GIVEQCCTSX_1CSLX_2QLENYCX_3X_4$

X_1 là T hoặc I; X_2 là D, Y, Q hoặc E; X_3 là G, N, S hoặc A; và X_4 là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên, hoặc không có mặt, với điều kiện là nếu X_3 là N, thì X_4 phải là axit amin không phải G hoặc N (SEQ ID NO:2);

b) cầu liên kết peptit thứ hai; và

c) vùng Fc của IgG người;

trong đó gốc đầu tận cùng C của chất chủ vận thụ thể insulin được dung hợp trực tiếp với gốc đầu tận cùng N của cầu liên kết peptit thứ hai, và gốc đầu tận cùng C của cầu liên kết peptit thứ hai được dung hợp trực tiếp với gốc đầu tận cùng N của vùng Fc của IgG.

Sáng chế cũng đề xuất protein dung hợp chứa:

d) chất chủ vận thụ thể insulin có công thức chung Z_1 - Z_2 - Z_3 , trong đó

i) Z_1 là thành phần tương tự chuỗi B insulin, có trình tự axit amin:

$X_1X_2X_3QHLGSHLVEALX_4LVCGERGFX_5YX_6X_7X_8X_9$

trong đó X_1 là F, Q hoặc A; X_2 là V hoặc G; X_3 là N, K, D, G, Q, A hoặc E; X_4 là E, Y, Q, hoặc H; X_5 là H hoặc F; X_6 là G, T, S, H, V hoặc không có mặt; X_7 là G, E, P, K, D, S, H hoặc không có mặt; X_8 là G, E, K, P, Q, D, H hoặc không có mặt; X_9 là G, T, S, E, K, A hoặc không có mặt, với điều kiện là thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm ít nhất một cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , hoặc X_9 (SEQ ID NO:1);

ii) Z_2 là cầu liên kết peptit thứ nhất gồm 5 đến 10 axit amin, trong đó ít nhất 5 trong số các axit amin này là gốc G; và

iii) Z_3 là thành phần tương tự chuỗi A insulin có trình tự axit amin:

$GIVEQCCTSX_1CSLX_2QLENYCX_3X_4$

X_1 là T hoặc I; X_2 là D, Y, Q hoặc E; X_3 là G, N, S hoặc A; và X_4 là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên, hoặc không có mặt, với điều kiện là nếu X_3 là N, thì X_4 phải là axit amin không phải G hoặc N (SEQ ID NO:2);

a) cầu liên kết peptit thứ hai; và

b) vùng Fc của IgG người;

trong đó gốc đầu tận cùng C của chất chủ vận thụ thể insulin được dung hợp trực tiếp với gốc đầu tận cùng N của cầu liên kết peptit thứ hai, và gốc đầu tận cùng C của cầu liên kết peptit thứ hai được dung hợp trực tiếp với gốc đầu tận cùng N của vùng Fc của IgG.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa protein dung hợp theo sáng chế và ít nhất một tá được được dụng.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu hoặc hội chứng chuyển hóa, bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu điều trị protein dung hợp theo sáng chế. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng liên quan đến bệnh tiểu đường được chọn từ nhóm gồm bệnh tim, đột quỵ, bệnh thận, bệnh võng mạc, và bệnh thận, bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu điều trị protein dung hợp theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất protein dung hợp theo sáng chế để sử dụng trong điều trị.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng protein dung hợp theo sáng chế để sản xuất thuốc.

Sáng chế cũng đề xuất các polynucleotit mã hóa protein dung hợp theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình sản xuất protein dung hợp theo sáng chế, quy trình này bao gồm các bước:

1. nuôi cấy tế bào chủ động vật có vú chứa polynucleotit mã hóa protein dung hợp theo sáng chế trong các điều kiện sao cho protein dung hợp này được biểu hiện; và
2. thu hồi protein dung hợp từ tế bào chủ này;

Sáng chế cũng đề xuất protein dung hợp được tạo ra bằng quy trình được mô tả trên đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 đưa ra dữ liệu được lực học của các protein dung hợp làm ví dụ theo sáng chế trong mô hình bệnh tiểu đường được điều trị bằng streptozotocin (STZ) ở chuột nhất.

Fig. 2 đưa ra sơ đồ cấu hình các protein được mô tả trong bản mô tả. Cần lưu ý rằng các hình dạng cụ thể (ví dụ, hình ô van, hình bán nguyệt, v.v.) được sử dụng trong các biểu đồ trong Fig. 2 không được dự định để mô tả hoặc đặc trưng cho, và không nên

dùng để giải thích, ý nghĩa hoặc cấu trúc của các thành phần riêng rẽ của các protein dung hợp theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm ít nhất một cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₄ hoặc X₅ của SEQ ID NO:1, và ít nhất một cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₆, X₇, X₈, hoặc X₉ của SEQ ID NO:1.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm ít nhất hai cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₆, X₇, X₈, hoặc X₉ của SEQ ID NO:1.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm các cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₆, X₇, X₈, và X₉ của SEQ ID NO:1.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 trong đó X₆-X₉ mỗi nhóm là G.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm các cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₄ và X₅ của SEQ ID NO:1.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin có trình tự SEQ ID NO:1, trong đó: X₁ là F; X₂ là V; X₃ là N hoặc D; X₄ là E; X₅ là H.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở từng vị trí trong số các vị trí X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, và X₉ của SEQ ID NO:1.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin chứa trình tự SEQ ID NO:1, trong đó: X₁ là F; X₂ là V; X₃ là N hoặc D; X₄ là E; X₅ là H; và X₆-X₉ mỗi nhóm là G.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm ít nhất một cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở X₁ hoặc X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm các cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở cả X₁ và X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi A insulin có trình tự SEQ ID NO:2, trong đó: X₁ là I hoặc T; X₂ là D; X₃ là G; và X₄ không có mặt.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi A insulin có trình tự SEQ ID NO:2, trong đó X₃ là N và trong đó X₄ là axit amin không phải G, N, S, V L hoặc P.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm ít nhất một cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₄ hoặc X₅ của SEQ ID NO:1, và ít nhất một cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₆, X₇, X₈, hoặc X₉ của SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm ít nhất một cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở X₁ hoặc X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm ít nhất hai cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₆, X₇, X₈, hoặc X₉ của SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm ít nhất một cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở X₁ hoặc X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm các cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₆, X₇, X₈, và X₉ của SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm ít nhất một cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở X₁ hoặc X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 trong đó X₆-X₉ mỗi nhóm là G; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm ít nhất một cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở X₁ hoặc X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm các cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₄ và X₅ của

SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm ít nhất một cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở X₁ hoặc X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin chứa trình tự SEQ ID NO:1, trong đó: X₁ là F; X₂ là V; X₃ là N hoặc D; X₄ là E; X₅ là H; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm ít nhất một cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở X₁ hoặc X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở từng vị trí trong số các vị trí X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, và X₉ của SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm ít nhất một cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở X₁ hoặc X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin có trình tự SEQ ID NO:1, trong đó: X₁ là F; X₂ là V; X₃ là N hoặc D; X₄ là E; X₅ là H; và X₆-X₉ mỗi nhóm là G; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm ít nhất một cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở X₁ hoặc X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm ít nhất một cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₄ hoặc X₅ của SEQ ID NO:1, và ít nhất một cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₆, X₇, X₈, hoặc X₉ của SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm các cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở cả X₁ và X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm ít nhất hai cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₆, X₇, X₈, hoặc X₉ của SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm các cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở cả X₁ và X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm các cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₆, X₇, X₈, và X₉ của SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm các cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở cả X₁ và X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 trong đó X₆-X₉ mỗi nhóm là G; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm các cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở cả X₁ và X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm các cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₄ và X₅ của SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm các cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở cả X₁ và X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin chứa trình tự SEQ ID NO:1, trong đó: X₁ là F; X₂ là V; X₃ là N hoặc D; X₄ là E; X₅ là H; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm các cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở cả X₁ và X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở từng vị trí trong số các vị trí X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, và X₉ của SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm các cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở cả X₁ và X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin có trình tự SEQ ID NO:1, trong đó: X₁ là F; X₂ là V; X₃ là N hoặc D; X₄ là E; X₅ là H; và X₆-X₉ mỗi nhóm là G; và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm các cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở cả X₁ và X₂ của SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm ít nhất một cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₄ hoặc X₅ của SEQ ID NO:1, và ít nhất một cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₆, X₇, X₈, hoặc X₉ của SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin có trình tự SEQ ID NO:2, trong đó: X₁ là I hoặc T; X₂ là D; X₃ là G; và X₄ không có mặt.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm ít nhất hai cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₆, X₇, X₈, hoặc X₉ của SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin có trình tự SEQ ID NO:2, trong đó: X₁ là I hoặc T; X₂ là D; X₃ là G; và X₄ không có mặt.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm các cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₆, X₇, X₈, và X₉ của SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin có trình tự SEQ ID NO:2, trong đó: X₁ là I hoặc T; X₂ là D; X₃ là G; và X₄ không có mặt.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 trong đó X₆-X₉ mỗi nhóm là G, trong đó: X₁ là I hoặc T; X₂ là D; X₃ là G; và X₄ không có mặt.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm các cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₄ và X₅ của SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin có trình tự SEQ ID NO:2, trong đó: X₁ là I hoặc T; X₂ là D; X₃ là G; và X₄ không có mặt.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin chứa trình tự SEQ ID NO:1, trong đó: X₁ là F; X₂ là V; X₃ là N hoặc D; X₄ là E; X₅ là H; và thành phần tương tự chuỗi A insulin có trình tự SEQ ID NO:2, trong đó: X₁ là I hoặc T; X₂ là D; X₃ là G; và X₄ không có mặt.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở từng vị trí trong số các vị trí X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, và X₉ của SEQ ID NO:1; và thành phần tương tự chuỗi A insulin có trình tự SEQ ID NO:2, trong đó: X₁ là I hoặc T; X₂ là D; X₃ là G; và X₄ không có mặt.

Theo các phương án nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin có trình tự SEQ ID NO:1, trong đó: X₁ là F; X₂ là V; X₃ là N hoặc D; X₄ là E; X₅ là H; và X₆-X₉ mỗi nhóm là G; và thành phần tương tự chuỗi A insulin có trình tự SEQ ID NO:2, trong đó: X₁ là I hoặc T; X₂ là D; X₃ là G; và X₄ không có mặt.

Theo các phương án nhất định, cầu liên kết peptit thứ nhất (Z₂) chứa trình tự axit amin: X₁GX₂G GGG, trong đó X₁ là G hoặc không có mặt; và X₂ là G, S hoặc không có mặt (SEQ ID NO:3).

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể insulin, tức là, Z₁-Z₂-Z₃ trong protein dung hợp được mô tả trên đây, chứa trình tự axit amin:

$X_1X_2X_3QHLGSHLVEALX_4LVCGERGFXYX_6X_7X_8X_9X_{10}GX_{11}GGGGGIVEQCCT$
 $SX_{12}CSLX_{13}QLENYCX_{14}X_{15}$

trong đó X_1 là F, Q hoặc A; X_2 là V hoặc G; X_3 là N, K, D, G, Q, A hoặc E; X_4 là E, Y, Q, hoặc H; X_5 là H hoặc F; X_6 là G, T, S, H, V hoặc không có mặt; X_7 là G, E, P, K, D, S, H hoặc không có mặt; X_8 là G, E, K, P, Q, D, H hoặc không có mặt; X_9 là G, T, S, E, K, A hoặc không có mặt; X_{10} là G hoặc không có mặt; X_{11} là G, S hoặc không có mặt; X_{12} là T hoặc I; X_{13} là D, Y, Q hoặc E; X_{14} là G, N, S hoặc A; và X_{15} là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên, hoặc không có mặt, với điều kiện là ít nhất một trong số X_4, X_5, X_6, X_7, X_8 , hoặc X_9 lần lượt phải là axit amin khác với axit amin đã được thấy, ở vị trí B₁₆, B₂₅, B₂₇, B₂₈, B₂₉ hoặc B₃₀ của chuỗi B của phân tử insulin người, và hơn nữa với điều kiện là nếu X_{14} là N, thì X_{15} phải là axit amin không phải G hoặc N (SEQ ID NO:4).

Theo các phương án được ưu tiên nhất định, chất chủ vận thụ thể insulin, tức là Z₁-Z₂-Z₃ trong protein dung hợp được mô tả trên đây có trình tự axit amin sau:

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQ
 LENYCG (SEQ ID NO:5).

Theo các phương án nhất định, cầu liên kết peptit thứ hai là peptit có từ 10 đến 25 axit amin, trong đó ít nhất 50% số axit amin này là các gốc G. Theo các phương án nhất định, cầu liên kết peptit thứ hai là peptit chứa trình tự axit amin $[GGGGX]_n$, trong đó X là Q, E hoặc S; và trong đó n là 2-5. Theo các phương án nhất định, cầu liên kết peptit thứ hai chứa trình tự axit amin:

$GGGGX_1GGGGX_2GGGGX_3GGGGX_4X_5X_6$

trong đó X_1 là Q hoặc E; X_2 là Q hoặc E; X_3 là Q hoặc E; X_4 là G, E, Q hoặc không có mặt; X_5 là G hoặc không có mặt; và X_6 là G hoặc không có mặt (SEQ ID NO:6).

Theo các phương án được ưu tiên nhất định, cầu liên kết peptit thứ hai có trình tự axit amin:

GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (SEQ ID NO:7).

Theo các phương án nhất định, vùng Fc của IgG người chứa các mảnh từ một chuỗi nặng của kháng thể IgG. Biểu đồ của protein dung hợp chứa vùng IgG như vậy được đưa ra trong biểu đồ (A) ở Fig. 2. Theo các phương án khác, vùng Fc của IgG người

chứa các mảnh từ hai chuỗi nặng của kháng thể IgG. Biểu đồ của protein dung hợp chứa vùng IgG như vậy được đưa ra trong biểu đồ (B) ở Fig. 2.

Theo các phương án nhất định, vùng Fc của IgG người là vùng Fc từ kháng thể IgG1, IgG2 hoặc IgG4.

Theo các phương án nhất định, vùng Fc của IgG người là vùng Fc từ kháng thể IgG1 chứa trình tự axit amin sau:

CPPCPAPELLGGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYX₅STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGX₆

trong đó X₁ là F, Q hoặc E; X₂ là F, Q hoặc E; X₃ là V hoặc T; X₄ là V hoặc T; X₅ là N, D hoặc Q; và

X₆ là K hoặc không có mặt. (SEQ ID NO:8)

Theo các phương án nhất định, vùng Fc của IgG chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8 và còn chứa thêm một số hoặc tất cả các axit amin mà có thể được phát hiện trong trình tự Fc của IgG1 kiểu đại về phía đầu tận cùng N của gốc C ở vị trí 1 trong SEQ ID NO:8.

Tốt hơn, nếu vùng Fc của IgG người là từ kháng thể IgG2 hoặc IgG4.

Theo các phương án nhất định, vùng Fc của IgG người là vùng Fc từ kháng thể IgG4 chứa trình tự axit amin sau:

PCPPCPAPEAAGGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFX₅STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSX₆LTVDKSRWQEGNVFSQVMHE
ALHNHYTQKSLSLGLGX₇

trong đó X₁ là F, Q hoặc E; X₂ F, Q hoặc E; X₃ là V hoặc T; X₄ là V hoặc T; X₅ là N, D hoặc Q; X₆ là R, hoặc K; X₇ là K hoặc không có mặt. (SEQ ID NO:9)

Theo các phương án nhất định, vùng Fc của IgG chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9 và còn chứa thêm một số hoặc tất cả các axit amin mà có thể được phát hiện trong trình tự Fc của IgG4 kiểu đại về phía đầu tận cùng N của gốc C ở vị trí 1 trong SEQ ID NO:9. Theo các phương án nhất định, vùng Fc của IgG người chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, trong đó X₁ là F; X₂ là F; X₃ là V; X₄ là V; X₅ là N; X₆ là R; và X₇ không có mặt.

Theo các phương án nhất định, vùng Fc của IgG người là vùng Fc từ kháng thể IgG2 có trình tự axit amin sau:

ECPPCPAPPVAGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSHEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFX₅STFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPAIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGX₆

trong đó X₁ là F, Q hoặc E; X₂ là F, Q hoặc E; X₃ là V hoặc T; X₄ là V hoặc T; X₅ là N, D hoặc Q; và X₆ là K hoặc không có mặt. (SEQ ID NO:10)

Theo các phương án nhất định, vùng Fc của IgG chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10 và còn chứa thêm một số hoặc tất cả các axit amin mà có thể được phát hiện trong trình tự Fc của IgG2 kiểu đại về phía đầu tận cùng N của gốc E ở vị trí 1 trong SEQ ID NO:10. Theo các phương án nhất định, vùng Fc của IgG người chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, trong đó X₁ là F; X₂ là F; X₃ là V; X₄ là V; X₅ là N; và X₆ không có mặt.

Theo các phương án nhất định, protein dung hợp chứa trình tự axit amin:

X₁X₂X₃QHLCGSHLVEALX₄LVCGERGFX₅YX₆X₇X₈X₉X₁₀GX₁₁GGGGGIVEQCCT
SX₁₂CSLX₁₃QLENYCX₁₄X₁₅GGGGX₁₆GGGGX₁₇GGGGX₁₈GGGGX₁₉X₂₀X₂₁X₂₂CP
PCPAPX₂₃X₂₄AGX₂₅PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSX₂₆EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTX₂₇RVVSVLTVX₂₈HQDWLNGKEYKCKVSNK
NKGLPX₂₉X₃₀IEKTISKX₃₁KGQPREPQVYTLPPSX₃₂EEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPX₃₃LDSDGSFFLYSX₃₄LTVDKSRWQX₃₅GNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSX₃₆G

trong đó X_1 là F, Q hoặc A; X_2 là V hoặc G; X_3 là N, K, D, G, Q, A hoặc E; X_4 là E, Y, Q, hoặc H; X_5 là H hoặc F; X_6 là G, T, S, H, V hoặc không có mặt; X_7 là G, E, P, K, D, S, H hoặc không có mặt; X_8 là G, E, K, P, Q, D, H hoặc không có mặt; X_9 là G, T, S, E, K, A hoặc không có mặt, với điều kiện là ít nhất một trong số X_4, X_5, X_6, X_7, X_8 , hoặc X_9 là axit amin không phải là axit amin có mặt lần lượt ở vị trí B₁₆, B₂₅, B₂₇, B₂₈, B₂₉ hoặc B₃₀ của chuỗi B insulin người; X_{10} là G hoặc không có mặt; X_{11} là G, S hoặc không có mặt; X_{12} là T hoặc I; X_{13} là D, Y, Q hoặc E; X_{14} là G, N, S hoặc A; X_{15} là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên, hoặc không có mặt, với điều kiện là nếu X_{14} là N, thì X_{15} phải là axit amin không phải G hoặc N; X_{16} là Q hoặc E; X_{17} là Q hoặc E; X_{18} là Q hoặc E; X_{19} là G, E, Q hoặc không có mặt; X_{20} là G hoặc không có mặt; X_{21} là G hoặc không có mặt; X_{22} là E hoặc P; X_{23} là E hoặc P; X_{24} là A hoặc V; X_{25} là G hoặc không có mặt; X_{26} là Q hoặc H; X_{27} là Y hoặc F; X_{28} là L hoặc V; X_{29} là S hoặc A; X_{30} là S hoặc P; X_{31} là A hoặc T; X_{32} là Q hoặc R; X_{33} là V hoặc M; X_{34} là R hoặc K; X_{35} là E hoặc Q; và X_{36} là L hoặc P (SEQ ID NO:11).

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất protein dung hợp được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, và SEQ ID NO:24.

Theo một phương án được ưu tiên, protein dung hợp có trình tự axit amin:

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFGHYGGGGGGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG					
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS					
130	140	150	160	170	180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKG					
190	200	210	220	230	240
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP					
250	260	270	280	290	
ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG					

(SEQ ID NO:12).

Theo các phương án nhất định, các protein dung hợp theo sáng chế có mặt ở dạng dime. Biểu đồ của dime như vậy được đưa ra trong biểu đồ (C) ở Fig. 2. Theo các phương án nhất định, dime là homodime, trong đó các trình tự axit amin của hai protein dung

hợp mà tạo ra dime là giống nhau. Theo các phương án nhất định, dime là heterodime, trong đó các trình tự axit amin của hai protein dung hợp mà tạo ra dime là khác nhau.

Theo các phương án nhất định, được phẩm theo sáng chế chứa protein dung hợp theo sáng chế, chất đệm, chất hoạt động bề mặt, và chất đẳng trương. Theo các phương án nhất định, chất đệm là axit xitric và/hoặc xitrat, chất hoạt động bề mặt là polysorbat 80, và chất đẳng trương là manitol. Theo các phương án nhất định, độ pH của được phẩm nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 8,0. Theo các phương án nhất định, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 6,0 đến khoảng 7,4. Theo các phương án nhất định, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 6,0 đến 6,75.

Theo các phương án nhất định, được phẩm này còn chứa thêm thành phần hoạt tính bổ sung. Theo các phương án nhất định, thành phần hoạt tính bổ sung là chất trị liệu dựa trên incretin. Theo các phương án được ưu tiên nhất định, chất trị liệu dựa trên incretin là chất chủ vận GLP-1R. Tốt hơn, nếu chất chủ vận GLP-1R là dulaglutide.

Theo các phương án nhất định, phương pháp theo sáng chế bao gồm bước cho sử dụng lượng hữu hiệu điều trị protein dung hợp mỗi ngày một lần. Theo các phương án được ưu tiên, lượng hữu hiệu điều trị của protein dung hợp được sử dụng một lần một tuần. Theo các phương án nhất định, lượng hữu hiệu điều trị của protein dung hợp được sử dụng một lần một tháng. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường trong khi làm giảm được nguy cơ hạ đường huyết và/hoặc tăng trọng, bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng lượng hữu hiệu điều trị protein dung hợp theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu, và/hoặc hội chứng chuyển hóa, bao gồm bước cho sử dụng lượng hữu hiệu điều trị protein dung hợp theo sáng chế kết hợp với thành phần hoạt tính bổ sung. Protein dung hợp và thành phần hoạt tính bổ sung theo các phương án như vậy có thể được sử dụng đồng thời, theo thứ tự hoặc trong một dạng bào chế kết hợp đơn nhất. Theo các phương án nhất định, thành phần hoạt tính bổ sung là chất trị liệu dựa trên incretin. Theo các phương án được ưu tiên nhất định, chất trị liệu dựa trên incretin là chất chủ vận GLP-1R. Tốt hơn, nếu chất chủ vận GLP-1R là dulaglutide. Theo các phương án nhất định, tổ hợp này được sử dụng một lần một ngày.

Theo các phương án được ưu tiên, tổ hợp này được sử dụng một lần một tuần. Theo các phương án nhất định, tổ hợp này được sử dụng một lần một tháng.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất a protein dung hợp theo sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu hoặc hội chứng chuyển hóa. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất a protein dung hợp theo sáng chế để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng có liên quan đến bệnh tiểu đường được chọn từ nhóm gồm bệnh tim, đột quỵ, bệnh thận, bệnh võng mạc, và bệnh thận. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất a protein dung hợp theo sáng chế để sử dụng trong điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường trong khi làm giảm được nguy cơ hạ đường huyết và/hoặc tăng trọng, bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng protein dung hợp theo sáng chế. Theo các phương án nhất định, protein dung hợp theo sáng chế được đề xuất để sử dụng kết hợp đồng thời, riêng rẽ hoặc theo thứ tự với thành phần hoạt tính khác. Theo các phương án nhất định, thành phần hoạt tính bổ sung là chất trị liệu dựa trên incretin. Theo các phương án được ưu tiên nhất định, chất trị liệu dựa trên incretin là chất chủ vận GLP-1R.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất việc sử dụng protein dung hợp theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu hoặc hội chứng chuyển hóa. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất việc sử dụng protein dung hợp theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng liên quan đến bệnh tiểu đường được chọn từ nhóm gồm bệnh tim, đột quỵ, bệnh thận, bệnh võng mạc, và bệnh thận. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất việc sử dụng protein dung hợp theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị bệnh đái tháo đường trong khi làm giảm được nguy cơ hạ đường huyết và/hoặc tăng trọng, bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng protein dung hợp theo sáng chế. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất việc sử dụng protein dung hợp theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu hoặc hội chứng chuyển hóa, trong đó thuốc này được sử dụng kết hợp đồng thời, riêng rẽ hoặc theo thứ tự với thành phần hoạt tính khác.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “chất chủ vận thụ thể insulin” chỉ protein mà liên kết và hoạt hóa thụ thể insulin, dẫn đến làm giảm mức glucoza huyết và/hoặc kìm hãm sự giải phóng glucoza ở gan, các đặc trưng mà có thể được kiểm tra

và xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết, như các kỹ thuật được thể hiện trong các nghiên cứu được mô tả dưới đây.

Phần chất chủ vận thụ thể insulin của các protein dung hợp theo sáng chế bao gồm thành phần tương tự chuỗi B insulin và thành phần tương tự chuỗi A insulin. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “chuỗi A insulin” và “chuỗi B insulin” chỉ các chuỗi A và B của phân tử insulin người (CAS No. 11061-68-0) mà các trình tự tự nhiên kiểu dài của chúng là đã biết rõ. Chuỗi A insulin người gồm có 21 axit amin, trong lĩnh vực này gọi là A₁-A₂₁, có trình tự sau:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO:13).

Chuỗi B insulin người gồm có 30 axit amin, trong lĩnh vực này gọi là B₁-B₃₀, có trình tự sau:

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYYTPKT (SEQ ID NO:14).

Trong phân tử insulin người, các chuỗi A và B được kết nối bằng hai liên kết disulfua, CysA7-CysB7 và CysA20-CysB19. Chuỗi A có một liên kết disulfua nội chuỗi ở CysA6-CysA11.

Để đạt được protein hoạt động theo thời gian kéo dài như mong muốn, chất chủ vận thụ thể insulin của protein dung hợp theo sáng chế phải duy trì trong hệ tuần hoàn, và có khả năng tương tác với thụ thể insulin trong một khoảng thời gian kéo dài. Để các protein dung hợp theo sáng chế duy trì được trong hệ tuần hoàn trong khoảng thời gian mong muốn, sự bài xuất các protein dung hợp phải được giảm thiểu. Hai đường chính để bào xuất insulin là thanh thải ở thận và thanh thải qua trung gian thụ thể insulin. *See Iglesias P, et al. Diabetes Obes. Metab.* 2008;10:811-823. Để giảm thiểu sự thanh thải ở thận, cần có phân tử với kích thước thủy lực ít nhất khoảng như kích thước của albumin huyết thanh người, và kích thước thủy lực như vậy được tạo ra trong các protein dung hợp theo sáng chế nhờ vùng Fc của IgG người. Như đối với thanh thải qua trung gian thụ thể, protein dung hợp không thể quá hiệu lực ở thụ thể insulin mà dẫn đến sự thanh thải qua trung gian thụ thể nhanh hơn mong muốn, tuy nhiên protein dung hợp phải đủ hiệu lực để tạo ra khả năng kiểm soát glucoza đủ với liều có thể thực hiện được trong thương mại. Do đó, hiệu lực của protein dung hợp phải được cân bằng một cách thận trọng, và cấu trúc của protein dung hợp theo sáng chế cho phép nó đạt được sự cân bằng như vậy.

Các phân tử insulin có xu hướng tự kết hợp thành các dime và hexame. Một số vai trò đã được đề xuất cho xu hướng tự kết hợp, bảo tồn về mặt tiến hóa của insulin, bao gồm: (1) ổn định về hóa học và nhiệt độ của phân tử trong quá trình bảo quản trong không bào nội bào; (2) bảo vệ insulin monome khỏi xơ hóa in vivo; (3) thay thế để ổn định với sự hỗ trợ của chaperone và gấp cuộn trong quá trình biểu hiện nội bào; và/hoặc (4) chủ yếu để di chuyển khi bài tiết. Tuy nhiên, dạng hoạt động của insulin là monome.

Xu hướng tự kết hợp của các phân tử insulin, và sự bất hoạt của các phân tử tự kết hợp như vậy là có liên quan đến sáng chế, vì vùng Fc của IgG người cũng có xu hướng tự kết hợp để tạo ra dime, thường là kết hợp cộng hóa trị thông qua các liên kết disulfua trong vùng bản lề, và các dime như vậy được tạo ra từ các vùng Fc của IgG người trong các protein dung hợp theo sáng chế. Kết quả của sự dime hóa các vùng Fc của IgG người là hai “nhánh” của chất chủ vận thụ thể insulin rất gần với nhau, và do đó tồn tại với nồng độ tương đối cao. Trong trường hợp insulin người, sự rất gần như vậy có thể dẫn đến xu hướng tự kết hợp, hoặc dime hóa, của các gốc insulin, ảnh hưởng đến hoạt tính của phân tử. Biểu đồ dime protein dung hợp Fc với các nhánh gốc insulin đã tự kết hợp, hay dime hóa, được đưa ra trên biểu đồ (D) ở Fig. 2. Xu hướng tự kết hợp của các phân tử insulin cũng có thể dẫn đến sự tự kết hợp, hoặc dime hóa của các gốc insulin từ nhiều hơn một dime protein dung hợp Fc; biểu đồ về dime của hai dime protein dung hợp Fc với các gốc insulin tự kết hợp, hay dime hóa được đưa ra trong biểu đồ (E) ở Fig. 2. Hơn nữa, các gốc insulin của nhiều hơn hai dime protein dung hợp Fc cũng có thể tự kết hợp theo cách như vậy để tạo ra, ví dụ, trime gồm ba dime, hoặc thậm chí các thể kết tụ bậc cao hơn gồm nhiều hơn ba dime.

Tuy nhiên, phần chất chủ vận thụ thể insulin của protein dung hợp theo sáng chế ít có xu hướng tự kết tụ hoặc dime hóa, và do đó các dime protein dung hợp gồm các protein dung hợp theo sáng chế có xu hướng ưu tiên cấu trúc được mô tả trong biểu đồ (C) của Fig. 2, trái với các cấu trúc được mô tả trong biểu đồ (D) và (E) của Fig. 2. Do đó, trong khi sáng chế đề xuất dime gồm hai protein dung hợp, “nhánh” chất chủ vận thụ thể insulin của mỗi protein dung hợp trong dime này chủ yếu vẫn giữ được trạng thái monome, như được mô tả, ví dụ trong biểu đồ (C) của Fig. 1, và do đó có khả năng tương tác với thụ thể insulin nhiều hơn.

Trong các protein dung hợp theo sáng chế, thành phần tương tự chuỗi B insulin trong chất chủ vận thụ thể insulin bao gồm một hoặc nhiều cải biến ở trình tự axit amin

của chuỗi B insulin người. Cụ thể, để giảm xu hướng tự kết hợp hay dime hóa của các phần chất chủ vận thụ thể insulin, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm một hoặc nhiều cải biến từ chuỗi B của phân tử insulin người ở các vị trí B₁₆, B₂₅ hoặc B₂₇₋₃₀, mà có trong SEQ ID NO:1 lần lượt dưới dạng vị trí X₄, X₅ và X₆₋₉. Ví dụ: X₄ (tương ứng với B₁₆ trong chuỗi B của phân tử insulin người) có thể được cải biến thành E, Q hoặc H; X₅ (tương ứng với B₂₅ trong chuỗi B của phân tử insulin người) có thể được cải biến thành H; X₆ (tương ứng với B₂₇ trong chuỗi B của phân tử insulin người) có thể bị xóa bỏ hoặc cải biến thành G, S, H hoặc V; X₇ (tương ứng với B₂₈ trong chuỗi B của phân tử insulin người) có thể bị xóa bỏ hoặc cải biến thành G, E, K, D, S hoặc H; X₈ (tương ứng với B₂₉ trong chuỗi B của phân tử insulin người) có thể bị xóa bỏ hoặc cải biến thành G, E, P, Q, D hoặc H; và X₉ (tương ứng với B₃₀ trong chuỗi B của phân tử insulin người) có thể bị xóa bỏ hoặc cải biến thành G, S, E hoặc K. Ngoài việc giảm xu hướng tự kết tụ của các phần chất chủ vận thụ thể insulin portions, các cải biến ở vị trí B₁₆ và B₂₅ trên thành phần tương tự chuỗi B insulin – lần lượt là X₄ và X₅ của SEQ ID NO:1 – cũng có thể được tạo ra để điều chỉnh hiệu lực, cải thiện khả năng biểu hiện, cải thiện độ ổn định hóa học và/hoặc vật lý, cải thiện khả năng bào chế của các protein dung hợp với các tá dược thường được sử dụng và/hoặc để loại trừ sự loại amit hóa. Thành phần tương tự chuỗi B insulin cũng có thể bao gồm các cải biến khác vì những lý do này. Tham chiếu đến các biến trong SEQ ID NO:1, các cải biến như vậy bao gồm: các cải biến X₁ (tương ứng với B₁ trong chuỗi B của phân tử insulin người) thành Q hoặc A; các cải biến X₂ (tương ứng với B₂ trong chuỗi B của phân tử insulin người) thành G; và/hoặc cải biến X₃ (tương ứng với B₃ trong chuỗi B của phân tử insulin người) thành K, D hoặc G.

Theo các phương án được ưu tiên nhất định, thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm nhiều hơn một cải biến trình tự axit amin chuỗi B insulin người ở các vị trí X₄, X₅ và X₆₋₉ của SEQ ID NO:1. Theo một phương án được ưu tiên, X₄ là E và X₅ là H. Theo các phương án nhất định, trình tự axit amin của X₆₋₉ của SEQ ID NO:1 được chọn từ nhóm gồm: GGES, GGGS, GGDS, GGEG, GGGG, SSES, SSGS, GGEE, GGGE, GGEK, GGGK, TPGS, TGGG, HGES, GHES, GGHS, GGEH, HGGS, GHGS, GGGH, GGDD, VGES, TEET, TKPT, GGGG, TGGG, TPGG, EPKT, TDKT, TPGS, EGGS, EGES, EEES, EPES, EPEP và GGDD. Theo các phương án được ưu tiên, trình

tự của bốn axit amin này là GGGS, GGGG hoặc TEET. Theo các phương án đặc biệt được ưu tiên, X₄ là E, X₅ là H và X₆₋₉ là GGGG.

Cần lưu ý rằng, trong khi X₆-X₉ của SEQ ID NO:1 được mô tả trên đây là chứa đầu tận cùng C của thành phần tương tự chuỗi B insulin (Z₁), ác axit amin này không đóng vai trò then chốt đối với hoạt tính của các protein dung hợp ở thụ thể insulin, và do đó theo cách khác có thể được xem là phần kéo dài của cầu liên kết peptit thứ nhất (Z₂). Ví dụ, trong ngữ cảnh của SEQ ID NO:4, X₆-X₉ có thể được xem là phần của thành phần tương tự chuỗi B insulin hoặc cầu liên kết peptit thứ nhất trong chất chủ vận thụ thể insulin đó.

Trong các protein dung hợp theo sáng chế, thành phần tương tự chuỗi A insulin trong phần chất chủ vận thụ thể insulin có thể bao gồm một hoặc nhiều cải biến ở trình tự axit amin của chuỗi A insulin người được dự định để cải thiện độ ổn định hóa học và vật lý, điều chỉnh hiệu lực, và/hoặc tăng cường khả năng biểu hiện. Tham chiếu đến các biến trong SEQ ID NO:2, các cải biến này bao gồm: cải biến X₁ (tương ứng với A₁₀ trong chuỗi A của phân tử insulin người) thành T; cải biến X₂ (tương ứng với A₁₄ trong chuỗi A của phân tử insulin người) thành D, Q hoặc E; và/hoặc cải biến X₃ (tương ứng với A₂₁ trong chuỗi A của phân tử insulin người) thành G, S hoặc A. Theo một phương án được ưu tiên, X₁ là T, X₂ là D, và X₃ là G.

Hơn nữa, để tránh sự loại amit hóa cũng như sự phân cắt hóa học và/hoặc phân giải protein, nếu axit amin ở vị trí 21 trong thành phần tương tự chuỗi A insulin trong chất chủ vận thụ thể insulin, tức là, X₃ trong SEQ ID NO:2, là N – axit amin mà có mặt ở vị trí tương ứng trong phân tử insulin người – axit amin này phải không được nối tiếp ở phía đầu tận cùng C bởi axit amin nhất định, như G hoặc N, hoặc theo các phương án nhất định, P, S, V hoặc L. Xem, ví dụ, Vlasak J, Ionescu R., MAbs. 2011 May-Jun; 3(3):253-63. Fragmentation of Monoclonal Antibodies. Cần lưu ý rằng trong khi yêu cầu này được đưa ra đối với protein dung hợp thứ nhất được mô tả trên đây trong ngữ cảnh các lựa chọn về vị trí X₄ và X₅ trong SEQ ID NO:2, liên quan đến thành phần tương tự chuỗi A insulin, không nhất thiết phải xem gốc không phải glyxin nối tiếp bằng gốc asparagin ở vị trí 21 trong thành phần tương tự chuỗi A insulin là một phần của chất chủ vận thụ thể insulin, trái với cầu liên kết peptit thứ hai. Ví dụ, theo ngữ cảnh của SEQ ID NO:11, gốc tương ứng với vị trí 21 trong phần tương tự chuỗi A được biểu thị bằng X₁₄,

và axit amin X₁₅ sau đây có thể được xem là một phần của chất chủ vận thụ thể insulin hoặc của cầu liên kết peptit thứ hai.

Như đã mô tả trên đây, trong các protein dung hợp theo sáng chế, gốc ở đầu tận cùng C của thành phần tương tự chuỗi B insulin được dung hợp trực tiếp với gốc đầu tận cùng N của cầu liên kết peptit thứ nhất và gốc đầu tận cùng C của cầu liên kết peptit thứ nhất được dung hợp trực tiếp với gốc đầu tận cùng N của thành phần tương tự chuỗi B insulin. Cầu liên kết peptit thứ nhất phải tạo ra đủ độ linh hoạt cho các chất tương tự của chuỗi A và chuỗi B insulin để thu được cấu trúc cần thiết để liên kết với thụ thể insulin, nhưng phải không quá dài khiến nó tương tác không đủ với liên kết đó. Độ dài và thành phần của cầu liên kết peptit thứ nhất có thể được điều chỉnh để điều chỉnh hiệu lực và/hoặc khả năng biểu hiện của các protein dung hợp. Theo một số phương án, cầu liên kết peptit thứ nhất dài 5 đến 10 axit amin, ít nhất 5 axit amin trong số đó là các gốc G. Theo các phương án nhất định, trình tự axit amin của cầu liên kết peptit thứ nhất được chọn từ nhóm gồm: GGGGGG, GGGGG, EGGGGG, GEGGGG, GGEGGG, GGGEGG, GGGGEG, GGGGGE, KGGGGG, GKGGGG, GGKGGG, GGGKGG, GGGGKG, GGGGGK, HGGGGG, GHGGGG, GGHGGG, GGGHGG, GGGGHG, GGGGGH, GGGGGA, GGGGGR, SGGGGG, GSGGGG, GGSGGG, GGSGGGK, GGSGGGG và GGSGGG. Theo các phương án được ưu tiên nhất định, trình tự của cầu liên kết peptit thứ nhất chứa SEQ ID NO:3. Tốt hơn, nếu trình tự của cầu liên kết peptit thứ nhất là GGSGGGG (SEQ ID NO:15). Phần chất chủ vận thụ thể insulin của các protein dung hợp theo sáng chế cũng bao gồm các liên kết disulfua được phát hiện trong phân tử insulin người như đã mô tả trên đây, tức là hai liên kết disulfua kết nối với các thành phần tương tự chuỗi A và chuỗi B insulin ở CysA7-CysB7 và CysA20-CysB19, và liên kết disulfua liên chuỗi trong thành phần tương tự chuỗi A insulin ở CysA6-CysA11.

Như đã mô tả trên đây, gốc đầu tận cùng C của phần chất chủ vận thụ thể insulin của các protein dung hợp theo sáng chế được dung hợp với gốc đầu tận cùng N của cầu liên kết peptit thứ hai, và gốc đầu tận cùng C của cầu liên kết peptit thứ hai được dung hợp trực tiếp với gốc đầu tận cùng N của phần Fc. Tốt hơn nếu cầu liên kết peptit thứ hai giàu glyxin, để tạo ra đủ độ linh hoạt về cấu dạng. Tốt hơn nếu cầu liên kết peptit thứ hai dài dưới 30 axit amin. Theo các phương án được ưu tiên nhất định, cầu liên kết peptit thứ hai dài từ 10 đến 25 axit amin, với ít nhất 50% số axit amin là gốc glyxin. Cầu

liên kết peptit thứ hai được ưu tiên bao gồm trình tự $(GGGGX_{15})_n$ trong đó X_{15} là Q, E hoặc S và $n = 2-5$. Cầu liên kết peptit thứ hai được ưu tiên hơn có trình tự axit amin nếu trong SEQ ID NO:6. Cầu liên kết peptit thứ hai được ưu tiên nhất có trình tự axit amin GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (SEQ ID NO:7).

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “vùng Fc của IgG người” có nghĩa như thường dùng cho thuật ngữ này trong lĩnh vực miễn dịch học. Cụ thể, thuật ngữ này chỉ mảnh kháng thể IgG người mà thu được bằng cách loại bỏ hai vùng liên kết kháng nguyên (mảnh Fab) từ kháng thể. Cụ thể, vùng Fc bao gồm các miền hằng định CH2 và CH3 của kháng thể, và cũng có thể bao gồm một số hoặc tất cả các vùng bản lề.

Như đã mô tả trên đây, theo các phương án nhất định của protein dung hợp theo sáng chế, vùng Fc của IgG người chứa các mảnh của vùng hằng định từ một chuỗi nặng của kháng thể IgG, sơ đồ mô tả vùng này được đưa ra trong biểu đồ (A) của Fig. 2, và theo các phương án khác, vùng Fc của IgG người chứa các mảnh của các vùng hằng định từ hai chuỗi nặng của kháng thể IgG, sơ đồ mô tả vùng này được đưa ra trong biểu đồ (B) của Fig. 2. Theo phương án này, các vùng hằng định của hai chuỗi nặng được kết hợp với nhau thông qua các tương tác không cộng hóa trị và các liên kết disulfua.

Có bốn lớp phụ kháng thể IgG (G1, G2, G3, và G4) mỗi lớp phụ này có cấu trúc khác nhau và chức năng sinh học đã biết là chức năng tác động. Các chức năng tác động này thường qua trung gian tương tác với thụ thể Fc ($Fc\gamma R$) hoặc bằng cách liên kết yếu tổ bề mặt C1q. Liên kết với $Fc\gamma R$ có thể dẫn đến sự phân giải tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, trong khi đó liên kết với các yếu tố bề mặt có thể dẫn đến sự phân giải tế bào qua trung gian bề mặt. Các cấu trúc và đặc tính của các vùng Fc của các lớp phụ IgG là đã biết trong lĩnh vực này. Các protein dung hợp theo sáng chế có thể chứa các vùng Fc từ lớp phụ bất kỳ trong số các lớp phụ IgG, mặc dù G2 và G4 có hoạt tính liên kết thụ thể và chức năng tác động thấp hơn so với các kháng thể G1 và G3, và do đó được ưu tiên.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ vùng Fc của IgG người cũng bao gồm các phiên bản của các mảnh kháng thể như vậy mà đã được cải biến, kéo dài và/hoặc cắt cụt, ví dụ, để thay đổi các đặc tính hoặc đặc trưng như chức năng liên kết bề mặt và/hoặc thụ thể Fc, chức năng tác động, sự hình thành liên kết disulfua, sự glycosyl hóa, tính độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-

mediated cytotoxicity - ADCC), khả năng sản xuất, và/hoặc độ ổn định. Ví dụ, các vùng Fc của IgG người của các protein dung hợp theo sáng chế có thể được cải biến để giảm hoặc loại bỏ vị trí glycosyl hóa liên kết N, mà sẽ giảm ái lực liên kết C1q và độc tính, và mà có thể hỗ trợ tính sinh miễn dịch, ảnh hưởng đến độ ổn định cấu dạng và tốc độ thanh thải in vivo, và/hoặc cải biến các chức năng tác động. Các vùng Fc của IgG người của các protein dung hợp theo sáng chế cũng có thể có một số hoặc tất cả các vùng bản lề của bị loại bỏ để đơn giản hóa sự dime hóa Fc qua trung gian disulfua. Các ví dụ khác về những thay đổi bao gồm sự phosphoryl hóa, sulfat hóa, axyl hóa, glycosyl hóa, metyl hóa, axetyl hóa, amit hóa, và/hoặc các cải biến để có thể tạo ra các phân tử heterodime. Các kỹ thuật để thay đổi cấu trúc và đặc tính của các vùng Fc IgG người của các lớp phụ IgG là đã biết trong lĩnh vực này.

Bất kể cấu trúc cuối cùng của protein dung hợp thế nào, vùng Fc của IgG người phải thỏa mãn để kéo dài được thời gian bán hủy trong huyết tương in vivo của chất chủ vận thụ thể insulin. Khi tạo ra các protein dung hợp Fc khác loài trong đó vùng Fc được tận dụng khả năng của nó trong việc kéo dài thời gian bán hủy, quan trọng là giảm thiểu được chức năng tác động bất kỳ. Hơn nữa, chất chủ vận thụ thể insulin được dung hợp duy trì được khả năng liên kết với và hoạt hóa thụ thể insulin để làm giảm mức glucoza huyết và/hoặc kìm hãm sự giải phóng glucoza ở gan, các đặc trưng mà có thể được kiểm tra và xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết, như các kỹ thuật được thể hiện trong các nghiên cứu được mô tả sau đây. Thời gian bán hủy dài của các protein dung hợp theo sáng chế có thể được chứng tỏ bằng các sử dụng, ví dụ, các phương pháp được mô tả sau đây.

Một vùng Fc của IgG người được ưu tiên là vùng Fc IgG4 được cải biến để giảm chức năng tác động, thúc đẩy sự hình thành homodime, và có phần bản lề bị loại bỏ, như trong SEQ ID NO:9 trong đó X₁ là F; X₂ là F; X₃ là V; X₄ là V; X₅ là N; X₆ là R; và X₇ không có mặt.

Một vùng Fc của IgG người được ưu tiên khác là vùng Fc IgG2 có phần bản lề bị loại bỏ, như trong SEQ ID NO:10 trong đó X₁ là F; X₂ là F; X₃ là V; X₄ là V; X₅ là N; và X₆ không có mặt.

Cần lưu ý rằng, mặc dù các trình tự axit amin của các vùng Fc của IgG người được ưu tiên được đưa ra trên đây có các phần của vùng bản lề bị loại bỏ để đơn giản

hóa sự dime hóa qua trung gian disulfua, các vùng bản lề đó có thể có mặt theo các phương án nhất định. Ví dụ, vùng Fc IgG2 kiểu đại bao gồm trình tự sáu axit amin ERKCCV ở đầu tận cùng N của nó, và mặc dù các axit amin này không được đưa ra trong trình tự vùng Fc IgG2 nêu trong SEQ ID NO:10, dự định rằng vùng Fc của IgG người chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10 có thể chứa thêm một số hoặc tất cả các axit amin trong trình tự axit amin ERKCCV ở đầu tận cùng N của nó. Tương tự, vùng Fc của IgG người chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9 có thể chứa thêm một số hoặc tất cả các axit amin trong số sáu axit amin được phát hiện ở đầu tận cùng N của vùng Fc IgG4, tức là ESKYGP. Tương tự, vùng Fc của IgG người chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8 có thể chứa thêm một số hoặc tất cả các axit amin trong số mười axit amin được phát hiện ở đầu tận cùng N của vùng Fc IgG1, tức là: EPKSCDKTHT. Hơn nữa, sự mô tả chính xác giữa axit amin cấu thành đầu tận cùng C của cầu liên kết peptit thứ hai và axit amin cấu thành đầu tận cùng N của vùng Fc của IgG người không phải là then chốt đối với cấu trúc hoặc chức năng của protein dung hợp theo sáng chế. Ví dụ, theo ngữ cảnh của SEQ ID NO:11, các gốc tương ứng với vị trí X₁₉-X₂₂ có thể được mô tả là đầu tận cùng C của cầu liên kết peptit thứ hai hoặc phần kéo dài đầu tận cùng N của vùng Fc của IgG người.

Như đã mô tả trên đây, sáng chế cũng đề cập đến các polynucleotit mã hóa protein dung hợp bất kỳ theo sáng chế. Các polynucleotit mã hóa các protein dung hợp được mô tả trên đây có thể ở dạng ARN hoặc ADN, mà bao gồm cADN và ADN tổng hợp, và có thể là mạch kép hoặc mạch đơn. Các trình tự mã hóa mà mã hóa của protein theo sáng chế có thể thay đổi do sự dư thừa hoặc thoái biến mã di truyền.

Các polynucleotit mã hóa các protein dung hợp theo sáng chế có thể bao gồm: chỉ trình tự mã hóa các protein này, trình tự mã hóa các protein và trình tự mã hóa bổ sung, như trình tự dẫn hoặc trình tự tiết hoặc trình tự tiền protein (pro-protein); trình tự mã hóa các protein và trình tự không mã hóa, như các intron hoặc trình tự không mã hóa đầu 5' và/hoặc 3' của trình tự mã hóa các protein. Do đó, thuật ngữ “polynucleotit mã hóa protein” bao gồm polynucleotit mà có thể bao gồm không chỉ trình tự mã hóa các protein này mà cả polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa bổ sung và/hoặc trình tự không mã hóa.

Các polynucleotit theo sáng chế sẽ được biểu hiện rong tế bào chủ sau khi các trình tự đã được liên kết hoạt động với trình tự điều khiển việc biểu hiện. Các vector biểu hiện

thường sao chép được trong sinh vật chủ dưới dạng episom hoặc dưới dạng phần không thể thiếu trong ADN nhiễm sắc thể chủ. Thông thường, các vectơ biểu hiện sẽ chứa các dấu chuẩn chọn lọc để cho phép phát hiện các tế bào được biến nạp bằng trình tự ADN mong muốn.

Các protein dung hợp theo sáng chế có dễ dàng được sản xuất trong tế bào động vật có vú như tế bào CHO, NSO, HEK293, BHK, hoặc COS; trong tế bào vi khuẩn như *E. coli*, *Bacillus subtilis*, hoặc *Pseudomonas fluorescens*; trong tế bào côn trùng, hoặc trong tế bào nấm hoặc nấm men, được nuôi cấy bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Tuy nhiên, các tế bào côn trùng, và nấm men hoặc nấm khác, tạo ra các N-glycan không phải của người, do đó các protein với sự glycosyl hóa liên kết N được tạo ra trong các tế bào như vậy có thể gây ra các phản ứng sinh miễn dịch nếu cho bệnh nhân sử dụng. Việc sản xuất trong các tế bào như vậy do đó đòi hỏi việc loại bỏ các vị trí glycosyl hóa liên kết N và/hoặc việc thao tác di truyền các tế bào này để tạo ra N-glycan người bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Hamilton SR, et al., *Production of complex human glycoproteins in yeast*, 301 SCIENCE (5637): 1244–6 (August 2003). Việc sản xuất trong tế bào động vật có vú được ưu tiên, và tế bào chủ động vật có vú được ưu tiên là dòng tế bào CHOK1SV chứa hệ biểu hiện glutamin synthetaza (GS) (xem US. Pat. No. 5,122,464).

Các vectơ chứa các trình tự polynucleotit cần quan tâm (ví dụ, các protein dung hợp và các trình tự kiểm soát việc biểu hiện) có thể được chuyển vào tế bào chủ bằng các phương pháp đã biết rõ, mà có thể thay đổi tùy theo loại tế bào chủ. Ví dụ, phương pháp biến nạp bằng canxi clorua thường được sử dụng cho tế bào nhân nguyên thủy, trong khi đó phương pháp xử lý bằng canxi phosphat hoặc phương pháp điện chuyển có thể được sử dụng cho các tế bào chủ khác.

Nhiều phương pháp tinh chế protein khác nhau có thể được sử dụng và các phương pháp như vậy đã biết và đã được mô tả trong lĩnh vực này, chẳng hạn trong tài liệu *Deutscher, Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) và *Scopes, Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Edition, Springer, N.Y. (1994).

Như đã mô tả trên đây, protein dung hợp theo sáng chế theo các phương án nhất định được tạo ra dưới dạng dime. Trong dime như vậy, các vùng Fc của IgG người của các protein dung hợp được kết hợp với nhau thông qua các tương tác không cộng hóa

trị và các liên kết disulfua. Sơ đồ mô tả dime như vậy được đưa ra trong biểu đồ (C) của Fig. 2. Khi các trình tự axit amin của hai protein dung hợp mà tạo ra dime này – chẳng hạn, protein dung hợp A và protein dung hợp B trong dime được mô tả trong biểu đồ (C) của Fig. 2 – là giống nhau, dime ở đây được gọi là “homodime.” Như đã lưu ý trên đây, việc biểu hiện các protein dung hợp theo sáng chế trong tế bào động vật có vú được ưu tiên, và việc biểu hiện trong các tế bào như vậy expression tạo ra các homodime. Các protein dung hợp trong những homodime như vậy được kết hợp qua các tương tác không cộng hóa trị và các liên kết disulfua liên phân tử trong phần Fc. Ví dụ, protein được tạo ra bằng gen mã hóa protein dung hợp nêu trong SEQ ID NO:12 có thể là homodime được liên kết cộng hóa trị thông qua các liên kết disulfua liên chuỗi, tức là C80 với C80 và C83 với C83.

Khi các trình tự axit amin của hai protein dung hợp mà tạo ra dime này – chẳng hạn, protein dung hợp A và protein dung hợp B trong biểu đồ (C) của Fig. 2 – là khác nhau, dime ở đây được gọi là “heterodime.” Heterodime như vậy có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. *Xem, ví dụ*, Lewis SM, et al. NAT. BIOTECHNOL. 32(2):191-8 (2014); Carter, J. IMMUNOL. METHODS, 248(1-2):7-15 (2001); Ridgway, J. B. et al. PROTEIN ENG. 9(7):617-2 (1996).

Ở đây, tham chiếu đến các dược phẩm chứa protein dung hợp bao gồm các dược phẩm chứa homodime của protein dung hợp đó, và/hoặc chứa heterodime, trong đó một thành phần của heterodime là protein dung hợp đó. Tương tự, ở đây tham chiếu đến các phương pháp bao gồm việc cho sử dụng protein dung hợp, bao gồm các phương pháp bao gồm việc sử dụng homodime của protein dung hợp đó và/hoặc sử dụng heterodime, trong đó một thành phần của heterodime là protein dung hợp đó. Tương tự, ở đây tham chiếu đến protein dung hợp để sử dụng trong điều trị và/hoặc protein dung hợp để sử dụng trong sản xuất thuốc bao gồm homodime của protein dung hợp đó, và/hoặc heterodime trong đó một thành phần của heterodime là protein dung hợp đó, để sử dụng trong điều trị và/hoặc để sử dụng trong sản xuất thuốc,

Thuật ngữ “phép điều trị” hoặc “việc điều trị”, như được sử dụng ở đây, chỉ việc quản lý và chăm sóc bệnh nhân mắc bệnh tiểu đường hoặc tăng đường huyết, hoặc tình trạng bệnh lý khác mà việc sử dụng insulin được chỉ định cho mục đích chống lại hoặc làm thuyên giảm các triệu chứng và biến chứng của các tính trạng đó. Việc điều trị bao gồm việc sử dụng các protein dung hợp theo sáng chế để ngăn ngừa hoặc làm chậm sự

khởi phát của các triệu chứng hoặc biến chứng, làm thuyên giảm các triệu chứng hoặc biến chứng, hoặc loại trừ bệnh, tình trạng, hoặc rối loạn. Bệnh nhân được điều trị là động vật có vú, và tốt hơn là người.

Thuật ngữ “ngăn ngừa” hoặc “việc ngăn ngừa,” như được sử dụng ở đây chỉ việc làm giảm nguy cơ hoặc tỷ lệ mắc, hoặc loại trừ hoặc làm chậm sự tiến triển của một hoặc nhiều tình trạng, triệu chứng, biến chứng hoặc rối loạn.

Các protein dung hợp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị cho các đối tượng mắc nhiều bệnh và tình trạng khác nhau. Bao gồm các đối tượng mắc chứng tăng đường huyết, bệnh tiểu đường phụ thuộc insulin cũng như các đối tượng mắc bệnh tiểu đường không phụ thuộc insulin, bao gồm việc trị cho đối tượng mới cũng như đối tượng đang được điều trị bằng thuốc dùng đường uống, như sulfonylurea, metformin, thiazolidinedione như pioglitazone, chất ức chế α -glucosidaza như acarboza, và/hoặc các chế phẩm tiêm không chứa insulin, bao gồm các liệu pháp dựa trên incretin, như các chất ức chế DPP-4 và chất chủ vận GLP-1R. Các protein dung hợp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều hòa mức glucoza huyết ở các bệnh nhân như vậy, và có thể điều trị các tình trạng hoặc biến chứng do việc kiểm soát glucoza huyết không đầy đủ như bệnh vông mạc, bệnh thần kinh hoặc bệnh thận.

Theo các phương án nhất định, protein dung hợp theo sáng chế được sử dụng hằng ngày, hai ngày một lần, hai lần một tuần, ba lần một tuần, một lần một tuần, hai lần một tháng hoặc một lần một tháng. Theo các phương án được ưu tiên, khoảng thời gian hoạt động được kéo dài đủ để cho phép sử dụng liều một lần một tuần. Tuy nhiên, ngay cả đối với các phân tử hoạt động kéo dài như vậy, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ nhận thấy rằng cũng có thể tạo ra sự kiểm soát glucoza hữu hiệu bằng cách tích lũy liều thuốc dần dần với profin được động học kéo dài bằng cách sử dụng chế độ điều trị thường xuyên hơn, như một lần một ngày. *Xem*, ví dụ, Heise T and Meneghini LF, 20 ENDOCR. PRACT. p75-83 (2014).

Theo các phương án nhất định, protein dung hợp theo sáng chế được sử dụng kết hợp với thành phần hoạt tính bổ sung, như insulin hoặc chất tương tự insulin, liệu pháp dựa trên incretin, hoặc thuốc chữa bệnh tiểu đường dùng đường miệng, như sulfonylurea, metformin, thiazolidinedione như pioglitazone hoặc chất ức chế α -glucosidaza như acarboza.

Thuật ngữ “liệu pháp dựa trên incretin” bao gồm việc điều trị bất kỳ bao gồm việc sử dụng, hoặc thúc đẩy, khả thi hóa, tăng cường và/hoặc mô phỏng hiệu quả của nhóm hormon chuyển hóa đã biết là các incretin, nhóm này bao gồm GLP-1 và peptit ức chế dạ dày (gastric inhibitory peptide - GIP). Các liệu pháp dựa trên incretin hiện có bao gồm các chất ức chế DPP-4 và các chất chủ vận GLP-1R.

“Chất ức chế DPP-4” là chất mà phong bế enzym DPP-4, enzym này chịu trách nhiệm cho sự thoái biến của các incretin. Các chất ức chế DPP-4 hiện có bao gồm sitagliptin (Januvia®), và linagliptin (Tadjenta®).

“Chất chủ vận GLP-1R” được xác định là chất chứa trình tự axit amin của GLP-1 tự nhiên của người (SEQ ID NO:25), chất tương tự GLP-1, dẫn xuất của GLP-1 hoặc protein dung hợp GLP-1, mà giữ được hoạt tính ở thụ thể GLP-1. Hoạt tính GLP-1R có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm sử dụng các thử nghiệm *in vivo* và *in vitro* mà xác định hoạt tính liên kết thụ thể GLP-1 hoặc khả năng hoạt hóa thụ thể, ví dụ, thử nghiệm sử dụng các tế bào tiểu đảo tụy hoặc tế bào u đảo tụy, như được lần lượt mô tả trong EP 619,322 và bằng sáng chế Mỹ số 5,120,712. Chất tương tự GLP-1 là phân tử chứa cải biến bao gồm một hoặc nhiều phép thế, loại bỏ, đảo ngược hoặc bổ sung axit amin so với trình tự axit amin của GLP-1 tự nhiên của người (SEQ ID NO:25). Dẫn xuất của GLP-1 là phân tử có trình tự axit amin của GLP-1 tự nhiên của người (SEQ ID NO:25) hoặc của chất tương tự GLP-1, nhưng còn có thêm ít nhất một cải biến về mặt hóa học ở một hoặc nhiều nhóm bên axit amin của nó, các nguyên tử α -cacbon, nhóm tận cùng amino, hoặc nhóm tận cùng axit carboxylic. Protein dung hợp GLP-1 là protein khác loài chứa phần GLP-1, chất tương tự GLP-1 hoặc dẫn xuất GLP-1 và polypeptit thứ hai. Các chất chủ vận GLP-1R hiện có bao gồm exenatide (Byetta® và Bydureon®), liraglutide (Victoza®), albiglutide (Tanzeum®) và dulaglutide (Trulicity®), cấu trúc của các hợp chất này là đã biết trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, US 5,424,286 (exenatide); US 6,268,343 (liraglutide); US 2014044717 (albiglutide); và US 7,452,966 (dulaglutide).

Trong các phương án trong đó protein dung hợp theo sáng chế được cung cấp kết hợp với thành phần hoạt tính bổ sung, protein dung hợp và thành phần hoạt tính bổ sung này có thể được sử dụng đồng thời, lần lượt hoặc trong chế phẩm kết hợp đơn nhất.

Các protein dung hợp theo sáng chế hữu hiệu để điều trị các bệnh và tình trạng như vậy bằng cách cho bệnh nhân có nhu cầu sử dụng một lượng hữu hiệu điều trị protein dung hợp theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, cụm từ “lượng hữu hiệu điều trị” chỉ lượng protein dung hợp theo sáng chế đủ để điều hòa glucoza huyết ở bệnh nhân mà không gây ra các tác dụng phụ không mong muốn. Lượng hữu hiệu điều trị của protein dung hợp được sử dụng cho đối tượng sẽ tùy thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh và vào các đặc điểm của đối tượng, như thể trạng chung, độ tuổi, giới tính, thể trọng, và độ dung nạp thuốc. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ xác định được liều lượng thích hợp tùy theo các yếu tố này và các yếu tố khác. Theo các phương án nhất định, lượng hữu hiệu điều trị của protein dung hợp theo sáng chế khi được sử dụng một lần một tuần nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 nmol/kg đến khoảng 100 nmol/kg. Tốt hơn, nếu lượng hữu hiệu điều trị của protein dung hợp theo sáng chế khi được sử dụng một lần một tuần nằm trong khoảng từ khoảng 1 nmol/kg đến khoảng 50 nmol/kg. Tốt hơn, nếu lượng hữu hiệu điều trị của protein dung hợp theo sáng chế khi được sử dụng một lần một tuần nằm trong khoảng từ khoảng 16 nmol/kg đến khoảng 25 nmol/kg. Theo các phương án nhất định, lượng hữu hiệu điều trị của protein dung hợp theo sáng chế khi được sử dụng một lần một tuần nằm trong khoảng từ khoảng 1 mg đến khoảng 200 mg. Tốt hơn, nếu lượng hữu hiệu điều trị của protein dung hợp theo sáng chế khi được sử dụng một lần một tuần nằm trong khoảng từ khoảng 25 mg đến khoảng 175 mg. Tốt hơn nữa nếu lượng hữu hiệu điều trị của protein dung hợp theo sáng chế khi được sử dụng một lần một tuần nằm trong khoảng từ khoảng 100 mg đến khoảng 160 mg.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng khi protein dung hợp theo sáng chế được sử dụng kết hợp với thành phần hoạt tính khác, như chất chủ vận GLP-1R, liều có thể được điều chỉnh sao cho hoạt tính của hai phép điều trị được kết hợp là đủ để điều hòa glucoza huyết ở bệnh nhân. Do đó, lượng protein dung hợp cần được sử dụng để điều hòa mức glucoza huyết trong các tổ hợp như vậy có thể nhỏ hơn so với lượng cần thiết nếu protein dung hợp được dùng theo liệu pháp đơn. Ví dụ, khi protein dung hợp theo sáng chế được cung cấp kết hợp với chất chủ vận GLP-1R, lượng protein dung hợp cần cung cấp trong liều một lần một tuần có thể giảm đến 50%, so với lượng cùng loại protein dung hợp này để sử dụng trong liệu pháp đơn, như các liều được mô tả trong đoạn trên đây.

Tốt hơn, nếu việc sử dụng lượng hữu hiệu điều trị của protein dung hợp theo sáng chế theo một số phương án sẽ tạo ra việc kiểm soát glucoza hữu hiệu trong khi làm giảm được nguy cơ hạ đường huyết và/hoặc tăng trọng so với các phương pháp điều trị hiện có. Tỷ lệ mắc chứng hạ đường huyết do liệu pháp điều trị bệnh tiểu đường mà chủ vận thụ thể insulin gây ra có thể được giảm thiểu bằng cách tránh đạt đỉnh nồng độ chất nhân điều trị nhanh sau khi sử dụng. Các protein dung hợp theo sáng chế có protein hoạt động theo thời gian kéo dài mà không đạt đỉnh nồng độ nhanh sau khi sử dụng.

Hơn nữa, theo các phương án trong đó các protein dung hợp theo sáng chế được cung cấp kết hợp với thành phần hoạt tính khác, cụ thể là, chất chủ vận GLP-1R, hoạt tính lợi gan của các protein dung hợp theo sáng chế cũng có thể làm giảm nguy cơ hạ đường huyết trong khi vẫn kiểm soát được mức glucoza huyết. Do protein dung hợp theo sáng chế có thể dễ dàng xâm nhập vào gan qua nội mô xoang mao mạch có lỗ mở, phân tử này có thể kiểm soát mức giải phóng glucoza ở gan, với chỉ rất ít hoạt tính ở vùng ngoại vi nếu có, trong khi chất chủ vận GLP-1R thúc đẩy sự tiết insulin nội sinh phụ thuộc glucoza từ tuyến tụy mà có thể dễ dàng tràn vào vùng ngoại vi để kiểm soát sự hấp thu glucoza trong cơ và chất béo.

Các protein dung hợp theo sáng chế được sử dụng ngoài đường tiêu hóa, bằng cách dùng qua mũi hoặc xông qua phổi. Việc sử dụng ngoài đường tiêu hóa được ưu tiên, và có thể bao gồm, ví dụ, dùng toàn thân, như bằng cách tiêm trong cơ, trong tĩnh mạch, dưới da, hoặc trong màng bụng.

Các protein dung hợp có thể được sử dụng cho đối tượng trong dược phẩm, chứa protein dung hợp theo sáng chế và ít nhất một tá dược được dùng. Các dược phẩm như vậy thường, dù không nhất thiết, dùng ngoài đường tiêu hóa và có thể được bào chế bằng kỹ thuật bất kỳ bằng cách sử dụng các tá dược thông thường dùng cho các sản phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Remington: the Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). Như đã mô tả trên đây, protein dung hợp theo sáng chế là homodime khi được biểu hiện trong các tế bào động vật có vú. Do đó, như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “chế phẩm chứa protein dung hợp” bao gồm chế phẩm chứa homodime của protein dung hợp. Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế bao gồm chế phẩm với protein dung hợp theo sáng chế có mặt với nồng độ ít nhất 1 mg/mL, ít nhất 2 mg/mL, ít nhất 5 mg/mL, ít nhất 10 mg/mL, ít nhất

20 mg/mL, ít nhất 25 mg/mL, ít nhất 30 mg/mL, ít nhất 35 mg/mL, ít nhất 50 mg/mL, ít nhất 55 mg/mL, ít nhất 60 mg/mL, ít nhất 65 mg/mL, ít nhất 75 mg/mL, ít nhất 100 mg/mL hoặc cao hơn. Theo các phương án được ưu tiên, protein dung hợp có mặt với nồng độ 10-100 mg/mL. Theo các phương án được ưu tiên hơn, protein dung hợp có mặt với nồng độ 15-75 mg/mL, và theo các phương án được ưu tiên nhất, protein dung hợp có mặt với nồng độ 20-65 mg/mL.

Thuật ngữ “tá dược” nghĩa là chất bất kỳ được bổ sung vào chế phẩm mà không phải là protein dung hợp hoặc (các) thành phần hoạt tính bất kỳ khác. Ví dụ về các tá dược mà có thể được sử dụng trong các chế phẩm theo sáng chế bao gồm các tác nhân đệm, chất hoạt động bề mặt, chất đẳng trương và chất bảo quản.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều tác nhân đệm để kiểm soát độ pH của chế phẩm. “Tác nhân đệm” là chất mà chống lại sự thay đổi độ pH bằng hoạt động của các thành phần liên hợp axit-bazơ của nó. Theo các phương án nhất định, chế phẩm theo sáng chế có độ pH từ khoảng 5,5 đến khoảng 8,0, tốt hơn là từ khoảng 6,0 đến khoảng 7,4, tốt hơn nữa là từ khoảng 6,0 đến 6,75. Các tác nhân đệm thích hợp để kiểm soát độ pH của các chế phẩm theo sáng chế trong khoảng mong muốn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất như phosphate, acetat, xitrat, hoặc axit của chúng, các đệm arginin, TRIS, và histidin, cũng như các tổ hợp của chúng. “TRIS” chỉ 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3,-propanediol, và muối được dùng bất kỳ của nó. Bazơ tự do và dạng hydroclorua của nó (tức là, TRIS-HCl) là hai dạng phổ biến nhất của TRIS. TRIS cũng được biết trong lĩnh vực này dưới dạng trimethylol aminometan, trometamin, và tris(hydroxymethyl) aminometan. Các tác nhân đệm được ưu tiên trong chế phẩm theo sáng chế là xitrat, hoặc axit xitric, và phosphate.

Theo các phương án nhất định, các chế phẩm theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều chất đẳng trương để giảm thiểu cảm giác đau khi tiêm do sự sưng tấy tế bào hoặc phá vỡ tế bào. “Chất đẳng trương” là hợp chất được dung nạp về mặt sinh lý và tạo ra sự đẳng trương thích hợp cho chế phẩm để ngăn ngừa dòng nước thực tế đi qua các màng tế bào để tiếp xúc với dược phẩm được sử dụng. Các chất đẳng trương đã biết bao gồm glyxerol, cá muối như natri clorua, và các monosacarit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, manitol, dextroza và lactoza. (Các) chất đẳng trương được ưu tiên là manitol và natri clorua.

Theo các phương án nhất định, các chế phẩm theo sáng chế bao gồm chất hoạt động bề mặt. “Chất hoạt động bề mặt” là chất làm giảm sức căng bề mặt của chất lỏng. Ví dụ về các chất hoạt động bề mặt được sử dụng trong dược phẩm và có thể được sử dụng trong các chế phẩm nhất định theo sáng chế bao gồm polysorbat 20, polysorbat 80, polyetylen glycol (ví dụ, PEG 400, PEG 3000, TRITON X-100), polyetylen glycol alkyl ete (ví dụ, BRIJ), polypropylen glycol, copolyme khối (ví dụ, poloxame, PLURONIC F68; poloxame 407, PLURONIC F127; TETRONICS), este sorbitan alkyl (ví dụ, SPAN), dầu thầu dầu polyetoxi hóa (ví dụ, KOLLIPHOR, CREMOPHOR), và trehaloza.

Các dược phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa chất bảo quản. Thuật ngữ “chất bảo quản” chỉ hợp chất được bổ sung vào dược phẩm để hoạt động làm chất chống vi sinh vật trong các chế phẩm dùng nhiều lần và/hoặc các chế phẩm chuẩn độ được. Trong số các chất bảo quản đã biết trong lĩnh vực này các chất bảo quản hữu hiệu và chấp nhận được trong các dạng bào chế dùng ngoài đường tiêu hóa là benzalkoni clorua, benzethoni, clorohexidin, phenol, m-cresol, rượu benzylic, metyl- hoặc propyl-paraben, clorobutanol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, phenyl thủy ngân nitrat, thimerosal, axit benzoic, và các hỗn hợp khác nhau của chúng. Chất bảo quản loại phenol bao gồm các hợp chất phenol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, metylparaben, và các hỗn hợp của chúng. Nếu cần sử dụng chất bảo quản, chất bảo quản được dùng trong các chế phẩm theo sáng chế tốt hơn là chất bảo quản loại phenol, tốt hơn là m-cresol hoặc phenol.

Các chất bảo quản loại phenol nhất định, như phenol và m-cresol, đã biết là liên kết với insulin và các hexame của insulin và do đó ổn định sự thay đổi về cấu dạng mà thường làm tăng độ ổn định vật lý hoặc hóa học, hoặc cả hai. Tuy nhiên, trong các chế phẩm chứa các protein khác, các chất bảo quản như vậy có thể góp phần tạo ra các thể kết tụ protein, hoặc tạo ra các polyme có phân tử lượng cao (high molecular weight polymer - HMWP). Xem, ví dụ, Maa YF và Hsu CC, *Int J Pharm* 140: 155–168 (1996); Fransson J, et al., *Pharm. Res.*, 14: 606–612 (1997); Lam XM, et al., *Pharm. Res.*, 14: 725–729 (1997); Remmele RL Jr, et al., *Pharm Res* 15: 200-208. (1998); Thirumangalathu R, et al., *J Pharm Sci* 95: 1480–1497 (2006). Các thể kết tụ protein như vậy là không mong muốn trong dược phẩm do xu hướng gây đáp ứng miễn dịch của chúng.

Theo các phương án được ưu tiên nhất định, trình tự axit amin của protein dung hợp theo sáng chế được tối ưu hóa để tăng cường độ ổn định vật lý của protein dung hợp trong các chế phẩm mà còn chứa chất bảo quản loại phenol. Ví dụ, các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện rằng sự có mặt của đột biến axit amin ở vị trí số 10 trong thành phần tương tự chuỗi A insulin (biến X₁ trong thành phần tương tự chuỗi A insulin nêu trong SEQ ID NO:2) làm giảm sự tích tụ các thể kết tụ protein dung hợp với sự có mặt của các chất bảo quản loại phenol, như được thể hiện trong các nghiên cứu về độ ổn định sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa tiếp bằng các ví dụ sau đây, các ví dụ này không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Biểu hiện và tinh chế các protein dung hợp

Các protein dung hợp theo sáng chế được tạo ra trong hệ biểu hiện tế bào động vật có vú bằng cách sử dụng dòng tế bào CHO đã bất hoạt glutamin synthetaza (GS) (GSKO). Việc bất hoạt gen GS cho phép chọn lọc chính xác nghiêm ngặt bằng cách loại bỏ hoạt tính nền của GS nội sinh mà có thể cho phép các tế bào sinh sản thấp hoặc không sinh sản sống sót được trong các điều kiện chọn lọc. Các gen mã hóa dùng cho các protein dung hợp are được tách dòng phụ vào plasmid biểu hiện chứa glutamin synthetaza (GS). Trình tự cADN mã hóa các protein dung hợp được dung hợp vào khung với trình tự mã hóa peptit tín hiệu mà tăng cường khả năng tiết protein dung hợp vào môi trường nuôi cấy tế bào. Việc biểu hiện được điều khiển bằng đoạn khởi đầu cytomegalovirus (CMV). Các tế bào CHO GSKO được chuyển nhiễm ổn định bằng phương pháp điện chuyển và lượng thích hợp plasmid biểu hiện tái tổ hợp.

Các tế bào đã chuyển nhiễm trải qua quá trình chọn lọc lượng lớn trong môi trường không chứa glutamin. Sản phẩm chuyển nhiễm góp chung được đưa vào đĩa với mật độ thấp để các tế bào biểu hiện ổn định sinh trưởng nhanh chóng gần như thành dòng vô tính. Các giếng trội được sàng lọc về mức biểu hiện protein dung hợp và nhân lên trong môi trường cuối cấy dạng huyền phù không chứa huyết thanh cần dùng để sản xuất.

Các protein dung hợp được tiết vào môi trường có thể được tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực protein A tiếp theo bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước theo các kỹ thuật sắc ký chuẩn. Một cách vắn tắt, các protein dung hợp từ môi trường

nuôi cấy đã lọc được bắt giữ bởi Mab Select Protein A (GE) mà đã được cân bằng bằng nước muối đệm bằng phosphat độ pH = 7,4. Sau bước rửa bằng nước muối đệm bằng phosphat độ pH = 7,4, các protein dung hợp đã liên kết được giải hấp bằng axit xitric 10 mM, độ pH = 3,0. Các phân đoạn chứa protein dung hợp được gộp chung và trung hòa bằng cách bổ sung 1/10 thể tích Tris 1M, độ pH = 8,0. Các thể kết tụ và multimer hòa tan có thể được loại bỏ một cách hiệu quả bằng các kỹ thuật thông thường, bao gồm sắc ký loại trừ theo kích thước, sắc ký tương tác kỵ nước hoặc sắc ký trao đổi ion. Các phân đoạn chứa monome protein dung hợp (homodimer được liên kết cộng hóa trị), như xác định bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước, được gộp chung, lọc vô trùng, và bảo quản.

Trình tự axit amin của các protein dung hợp làm ví dụ theo sáng chế được thể hiện dưới đây:

Ví dụ 1

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG					
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS					
130	140	150	160	170	180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG					
190	200	210	220	230	240
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP					
250	260	270	280	290	
ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG					

(SEQ ID NO:12)

Ví dụ 2

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEETGGGGGGGIVEQCCTSIICSPLYQLENYCGGGG					
70	80	90	100	110	120
GSGGGGSGGGGSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV					
130	140	150	160	170	180
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK					
190	200	210	220	230	240
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ					
250	260	270	280	290	
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSLG					

(SEQ ID NO:16)

Ví dụ 3

```

      10      20      30      40      50      60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGG
      70      80      90      100      110      120
GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
      130      140      150      160      170      180
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
      190      200      210      220      230      240
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
      250      260      270      280      290      300
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS

```

LG

(SEQ ID NO:17)

Ví dụ 4

```

      10      20      30      40      50      60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGGG
      70      80      90      100      110      120
GEGGGGEGGGGEGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
      130      140      150      160      170      180
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
      190      200      210      220      230      240
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
      250      260      270      280      290
NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

(SEQ ID NO:18)

Ví dụ 5

```

      10      20      30      40      50      60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG
      70      80      90      100      110      120
GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
      130      140      150      160      170      180
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
      190      200      210      220      230      240
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
      250      260      270      280      290      300
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS

```

LG

(SEQ ID NO:19)

Ví dụ 6

```

      10      20      30      40      50      60
FVGQHLGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGG
      70      80      90      100      110      120
GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
      130      140      150      160      170      180
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
      190      200      210      220      230      240
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
      250      260      270      280      290      300
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS

```

LG

(SEQ ID NO:20)

Ví dụ 7

```

      10      20      30      40      50      60
AGGQHLGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGGG
      70      80      90      100      110      120
GQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
      130      140      150      160      170      180
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
      190      200      210      220      230      240
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
      250      260      270      280      290
NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

(SEQ ID NO:21)

Ví dụ 8

```

      10      20      30      40      50      60
FVNQHLGSHLVEALELVCGERGFHYTPKTGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG
      70      80      90      100      110      120
GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
      70      80      90      100      110      120
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG
      70      80      90      100      110      120
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
      70      80      90      100      110      120
ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

(SEQ ID NO:22)

Ví dụ 9

```

      10      20      30      40      50      60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFFYTEETGGGGGGGIVEQCCTSI CSLYQLENYCGGGG
      70      80      90      100     110     120
GSGGGGSGGGGSGGGGSECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
      130     140     150     160     170     180
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGL
      190     200     210     220     230     240
PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
      250     260     270     280     290
NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO:23)

```

Ví dụ 10

```

      10      20      30      40      50      60
FVGQHLGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG
      70      80      90      100     110     120
GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
      130     140     150     160     170     180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKG
      190     200     210     220     230     240
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
      250     260     270     280     290
ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO:24)

```

Hoạt tính in vitro

Các mẻ thử nghiệm của protein dung hợp theo ví dụ 1-3, 5 và 9 được chuẩn bị trong nước muối đệm bằng phosphat (PBS, độ pH = 7,4) hoặc đệm xitrat 10 mM (độ pH = 6,5) và bảo quản ở 4 °C. Insulin người tổng hợp (Eli Lilly and Company) được chuẩn bị trong HCl 0,01 N và bảo quản dưới dạng các phần phân ước lạnh đông, hoặc được chuẩn bị trong hỗn hợp được điều chế chứa m-cresol, kẽm, natri clorua, và đệm TRIS (độ pH = 7,3) ở 100 đơn vị/mL và bảo quản ở 4 °C.

Ái lực của các protein dung hợp được xác định trong các thử nghiệm liên kết thụ thể được thực hiện trên màng P1 chuẩn bị từ các tế bào 293EBNA được chuyển nhiễm ổn định (tế bào thận phôi người 293HEK biểu hiện EBNA-1) biểu hiện quá mức thụ thể insulin người đồng dạng A (hIR-A) hoặc thụ thể insulin người đồng dạng B (hIR-B) chứa đuôi epitop C9 ở đầu tận cùng C. Ái lực liên kết được xác định từ thử nghiệm liên kết phóng xạ-phối tử cạnh tranh được thực hiện ở trạng thái ổn định bằng cách sử dụng (3-[¹²⁵I]-iodotyrosyl-A¹⁴)-insulin người tái tổ hợp. Giá trị của các mẫu thử nghiệm được

tính toán dưới dạng tỷ lệ phần trăm so với hoạt tính của insulin người không đái tháo đường. Các giá trị IC_{50} được xác định bằng phương pháp phân tích hồi quy phi tuyến tính logic 4 thông số (XLFit version 4.0, IDBS). Nếu cần, các thông số ở đỉnh hoặc đáy đường cong được lần lượt đặt là 100 hoặc 0.

Hằng số ái lực (K_i) được tính toán từ giá trị IC_{50} dựa vào phương trình $K_i = IC_{50} / (1 + D / K_d)$ trong đó D là nồng độ phóng xạ-phối tử được sử dụng trong thử nghiệm và K_d là hằng số ái lực liên kết cân bằng của phóng xạ-phối tử đối với thụ thể liên quan của nó được xác định bằng phương pháp phân tích liên kết bão hòa ($hIR-A = 0,205$ nM; $hIR-B = 0,251$ nM). Các giá trị K_i được báo cáo được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình nhân $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM), với số lần xác định lặp lại là “n” (Bảng 1).

Các protein dung hợp làm ví dụ có ái lực ở cả hIR-A và hIR-B. So với insulin người, các protein dung hợp làm ví dụ thể hiện ái lực liên kết giảm đối với hIR-A và hIR-B (Bảng 1).

Bảng 1

Mẫu	Ái lực liên kết thụ thể, K_i , nM (SEM, n)	
	hIR-A	hIR-B
Ví dụ 1	24,9 (4,3, n=10)	26,2 (4,3, n=10)
Ví dụ 2	1,61 (0,06, n=3)	4,60 (0,86, n=3)
Ví dụ 3	10,1 (1,5, n=4)	14,5 (2,3, n=4)
Ví dụ 5	35,6 (10,4, n=4)	24,6 (3,4, n=4)
Ví dụ 9	3,74 (1,20, n=2)	4,71 (1,78, n=2)
Insulin người	0,166 (0,008, n=10)	0,202 (0,007, n=10)

Các giá trị K_i là các giá trị trung bình nhân. SEM là sai số chuẩn của giá trị trung bình. n là số lần quan sát.

Các nghiên cứu in vivo

Nghiên cứu trong mô hình bệnh tiểu đường ở chuột cống được điều trị bằng streptozotocin (STZ)

Các tác dụng của protein dung hợp được nghiên cứu trong mô hình bệnh tiểu đường ở chuột cống được điều trị bằng STZ. Các chuột đực Sprague-Dawley, thể trọng 400-425 gam, được gây mê bằng isofluran và tiêm một lần bằng Zanosar® (STZ item #

89256, Teva Parenteral Medicines, 40 mg/kg trong tĩnh mạch). Các chuột này được sử dụng trong nghiên cứu 3 ngày sau khi tiêm Zanosar®; chỉ các động vật có mức glucoza huyết khi không đói nằm trong khoảng 400-550 mg/dL được sử dụng trong các nghiên cứu này.

Các chuột được phân bố thành các nhóm để tạo ra các khác biệt tương đương về mức glucoza huyết và thể trọng và sau đó chia ngẫu nhiên. Mức glucoza huyết được xác định bằng đường kế Accucheck Aviva (Roche). Các chuột cống được điều trị bằng STZ này được tiêm dưới da (SC) một lần bằng liều 30 nmol/kg.

Mẫu máu được thu thập để đo glucoza bằng cách lấy máu ở đuôi. Các động vật này được cho dùng thức ăn và nước tự do trong suốt quá trình thử nghiệm. Dữ liệu về glucoza huyết được đưa ra trên Fig. 1. Dữ liệu được thể hiện trên Fig. 1 là giá trị trung bình $\pm$ SEM ($n=6$ đối với protein dung hợp theo ví dụ 1 và 8; $n=3$ đối với protein dung hợp theo các ví dụ còn lại). Dữ liệu về glucoza huyết tại các thời điểm trong giai đoạn cho ăn ban đầu (từ 0 đến 24 giờ) được thu thập, nhưng không đưa ra trên Fig. 1 để dễ hình dung. Như được thể hiện trên Fig. 1, protein dung hợp theo các ví dụ 1-10 làm giảm mức glucoza trong khoảng thời gian kéo dài.

Các đặc tính dược động học của protein dung hợp theo ví dụ 1, 3-6 và 9-10 cũng được xác định sau khi dùng liều dưới da (SC) ở các chuột được điều trị bằng STZ như đã mô tả trên đây. Dữ liệu được tạo ra bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA thụ thể insulin đòi hỏi sự có mặt của insulin mà có khả năng liên kết với thụ thể insulin. Thử nghiệm ELISA thụ thể insulin sử dụng thụ thể insulin người (R&D Systems#1544-IR/CF aa28-944) làm thành phần bất giữ. Thụ thể insulin người được gắn vào đĩa Immunlon 4 HBX bằng kháng thể chuột kháng 6x HisTag (Novagen 70796). Đường cong chuẩn của protein dung hợp và các mẫu được pha loãng trong 100% huyết thanh chuột cống chứa K3 EDTA và phát hiện bằng peroxidaza cải ngựa của chuột nhắt kháng vùng Fc của IgG người (SouthernBiotech 9040-05). Nồng độ protein dung hợp theo các ví dụ 3-6 và 9-10 ở thời điểm 336 giờ đều nằm trong khoảng từ $22,1 \pm 9,8$ mg/mL đến 1498 ± 690 mg/mL. Bảng 3 thể hiện nồng độ protein dung hợp theo ví dụ 1 theo thời gian, và bảng 4 thể hiện các thông số dược động học sau phân tích dữ liệu về ví dụ 1 không ngăn. Dữ liệu cho thấy khoảng thời gian sinh khả dụng kéo dài của các protein dung hợp theo sáng chế.

Bảng 3

Thời gian (giờ)	Nồng độ (mg/mL)
1	335 ± 104
6	3559 ± 447
12	5991 ± 1578
24	10614 ± 1334
48	12629 ± 1811
96	8766 ± 2028
168	5017 ± 253
240	3682 ± 509
336	2014 ± 134

Dữ liệu thể hiện giá trị trung bình và độ lệch chuẩn với n=3.

Bảng 4

Thông số dược động học	Kết quả
AUC _{0-∞} (µg*giờ/mL)	1066 ± 363
C _{max} (µg/mL)	6,81 ± 1,62
T _{max} (giờ)	40 ± 14
CL hoặc CL/F (mL/giờ/kg)	2,15 ± 0,91
t _{1/2} (giờ)	82 ± 12
%F	147

Dữ liệu thể hiện giá trị trung bình và độ lệch chuẩn với n=3. Các chữ viết tắt AUC_{0-∞} – diện tích dưới đường cong từ 0 đến vô cùng, C_{max} – nồng độ tối đa, T_{max} – thời gian đạt nồng độ tối đa, CL – độ thanh thải, F – độ sinh khả dụng, t_{1/2} – thời gian bán hủy.

Nghiên cứu kẹp đẳng đường ở chuột cống bình thường

Nghiên cứu kẹp đẳng đường ở chuột cống được Sprague-Dawley được thực hiện để hiểu chung về hoạt tính in vivo của protein dung hợp theo ví dụ 1 đến khả năng sử dụng glucoza và để xác định hoạt tính của protein dung hợp theo ví dụ 1 trong gan so với các mô ngoại vi. Tiến hành truyền lượng lớn/liên tục 3-³H-glucoza vào các chuột cống đã đặt ống thông thường xuyên, đã bỏ đói qua đêm để xác định khả năng sản sinh glucoza nội sinh (EGP) trong các điều kiện cơ bản. Sau đó truyền lượng lớn/liên tục đối tượng thử nghiệm – 7nmol/kg [lượng lớn] và 1nmol/kg/giờ [tốc độ truyền liên tục] – hoặc

insulin lispro so sánh – [không dùng lượng lớn] và 0,75 mU/kg/phút [tốc độ truyền liên tục] và tiến hành truyền tĩnh mạch biến thiên 20% glucoza và điều chỉnh định kỳ để giữ nồng độ glucoza huyết ở 100-110 mg/dL. Tốc độ truyền lượng lớn được xác định để đạt được tốc độ truyền glucoza (GIR) tương đương và khả năng kìm hãm EGP tương đương trong các điều kiện kẹp đẳng đường ở từng nhóm. Somatostatin được dùng để ức chế sự tiết insulin nội sinh. Thu mẫu máu động mạch trong quá trình thử nghiệm để theo dõi tỷ lệ thể tích huyết cầu, insulin huyết tương, và các axit béo tự do, C-peptit, và EGP cơ sở và kẹp. Cuối thử nghiệm, 2-[1-¹⁴C]-deoxyglucoza được dùng để xác định mức độ hấp thu glucoza của mô ở nồng độ glucoza ổn định. Trong các điều kiện phù hợp này, hoạt tính ngoại vi của đối tượng thử nghiệm và thành phần so sánh được phân tích dưới dạng mức độ hấp thu glucoza trong cơ dếp và mức độ ức chế các axit béo tự do (FFA) trong huyết tương. Tất cả dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp phân tích phương sai một chiều bằng kiểm định Dunnett hậu định bằng cách sử dụng nhóm insulin lispro làm nhóm so sánh đối chứng.

Liều lớn và truyền protein dung hợp theo ví dụ 1 dẫn đến nồng độ trong huyết tương ổn định ở mức 274 ± 57 nM trong suốt thử nghiệm kẹp. Như được thể hiện trong bảng 5, cả hai nhóm động vật đều đạt được GIR tương đương trong pha kẹp của thử nghiệm. Mức glucoza huyết trung bình trong nhóm protein dung hợp theo ví dụ 1 cao hơn chút ít so với nhóm insulin lispro. Cả hai nhóm có tỷ lệ EGP cơ sở và kẹp tương tự nhau (bảng 5). Hơn nữa, tỷ lệ phần trăm thay đổi từ EGP cơ sở trong nhóm protein dung hợp theo ví dụ 1 là tương đương với nhóm đối chứng insulin lispro (bảng 5). Để đánh giá hoạt tính ngoại vi trong các điều kiện kẹp tương đương, khả năng ức chế FFA huyết tương và hấp thu glucoza trong cơ được xác định. Trong khi insulin lispro gây ra sự giảm mức FFA huyết tương trong suốt thử nghiệm kẹp, protein dung hợp theo ví dụ 1 không gây ra điều này. (Bảng 5). Ngoài ra, việc truyền protein dung hợp theo ví dụ 1 dẫn đến giảm 33% mức hấp thu glucoza trong cơ dếp so với insulin lispro. (Bảng 5). Nhìn chung, các dữ liệu này cho thấy protein dung hợp theo ví dụ 1 thể hiện hoạt tính ngoại vi giảm so với insulin lispro.

Bảng 5

		Insulin lispro	Protein dung hợp theo ví dụ 1
Glucosa huyết (mg/dL)		106,3 ± 2,2	111,8 ± 1,2 *
GIR (mg/kg/phút)		4,71 ± 0,46	4,72 ± 0,13
Tỷ lệ EGP (mg/kg/phút)	Mức cơ sở	5,062 ± 0,141	5,004 ± 0,093
	Kép	3,607 ± 0,241	3,509 ± 0,160
% Thay đổi từ EGP cơ sở		-29,3 ± 3,5	-30,1 ± 2,5
% Ức chế FFA huyết tương tự mức cơ sở		-14,5 ± 4,1	9,9 ± 2,4 *
Rg (μmol/100mg/phút)		11,34 ± 1,73	7,66 ± 1,38

Các giá trị được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± SEM của 13 động vật đối với insulin lispro và 17 động vật đối với ví dụ 1. Rg = chỉ số chuyển hóa glucosa. Thực hiện phân tích thống kê bằng phương pháp ANOVA một chiều, sau đó là kiểm định Dunnett hậu định. * = Khác biệt đáng kể so với insulin lispro ($p < 0,05$).

Hiệu lực *in vivo* ở khỉ Cynomolgus

Các thông số dược động học (PK) của protein dung hợp theo ví dụ 1 được đánh giá sau khi dùng liều đơn trong tĩnh mạch 1,5 nmol/kg và liều đơn dưới da 3 nmol/kg ở khỉ cynomolgus. Các mẫu huyết tương để phân tích PK được thu thập từ ba động vật mỗi nhóm/đường dùng, trong khoảng thời gian 3 tuần. Hai thử nghiệm được dùng để phân tích PK: ELISA thụ thể insulin và ELISA Fc IgG tổng số. Thử nghiệm ELISA thụ thể insulin sử dụng thụ thể insulin người (R&D Systems 1544-IR/CF) làm thành phần bắt giữ. Thụ thể insulin người được gắn vào đĩa Immulon 4 HBX bằng kháng thể chuột kháng HisTag (Novagen 70796). Đường cong chuẩn của protein dung hợp theo ví dụ 1 và các mẫu được pha loãng trong 100% huyết thanh khỉ cynomolgus (chất chống đông là K3 EDTA) và phát hiện bằng peroxidaza cải ngựa của chuột nhất kháng vùng Fc của IgG người (SouthernBiotech 9040-05). ELISA IgG tổng số bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG₂ người (Abcam ab1933) làm chất phản ứng bắt giữ. Protein dung hợp theo ví dụ 1 được pha loãng trong 100% huyết thanh khỉ cynomolgus và kháng thể phát hiện là cùng loại kháng thể trong thử nghiệm ELISA thụ thể insulin. Kết quả từ cả hai thử nghiệm được thể hiện trong bảng 6, và các thông số PK có liên quan được thể hiện trong bảng 7. Protein dung hợp theo ví dụ 1 thể hiện sự sinh khả dụng hoàn toàn ở khỉ,

và thử nghiệm insulin hoạt động và thử nghiệm Fc tổng số tạo ra các kết quả tương tự nhau.

Bảng 6. Dược động học của protein dung hợp theo ví dụ 1 ở khỉ Cynomolgus bình thường.

Thời gian (giờ)	Nồng độ $\pm$ SD (ng/mL)			
	ELISA thụ thể insulin		ELISA Fc tổng số	
	IV	SC	IV	SC
	1,5 nmol/kg	3,0 nmol/kg	1,5 nmol/kg	3,0 nmol/kg
0,083	1213 $\pm$ 212	không xác định	2190 $\pm$ 1369	không xác định
1	1172 $\pm$ 182	<43,75 $\pm$ NC	1708 $\pm$ 1219	<43,75 $\pm$ NC
3	863 $\pm$ 114	87 $\pm$ 25	798 $\pm$ NC	92 $\pm$ 22
6	726 $\pm$ 119	272 $\pm$ 31	688 $\pm$ 96	209 $\pm$ 116
12	576 $\pm$ 88	579 $\pm$ 78	457 $\pm$ 178	409 $\pm$ 145
24	422 $\pm$ 67	788 $\pm$ 69	332 $\pm$ 95	685 $\pm$ 359
48	299 $\pm$ 39	805 $\pm$ 55	260 $\pm$ 19	802 $\pm$ 64
72	219 $\pm$ 42	651 $\pm$ 83	199 $\pm$ 34	770 $\pm$ 83
96	173 $\pm$ 26	544 $\pm$ 89	159 $\pm$ 25	703 $\pm$ 390
120	146 $\pm$ 28	452 $\pm$ 55	152 $\pm$ 27	574 $\pm$ 160
168	83 $\pm$ 13	289 $\pm$ 54	126 $\pm$ NC	395 $\pm$ 70
216	48 $\pm$ NC	183 $\pm$ 44	99 $\pm$ NC	208 $\pm$ 123
240	<43,75 $\pm$ NC	145 $\pm$ 25	80 $\pm$ NC	242 $\pm$ NC
336	<43,75 $\pm$ NC	63 $\pm$ NC	47 $\pm$ NC	NC
504	<43,75 $\pm$ NC	<43,75 $\pm$ NC	<43,75 $\pm$ NC	<43,75 $\pm$ NC

Dữ liệu thể hiện giá trị trung bình và độ lệch chuẩn với n=3. Các chữ viết tắt IV = trong tĩnh mạch; SD = độ lệch chuẩn; NC = không được tính toán

Bảng 7. Các thông số dược động học từ phép phân tích dữ liệu không ngăn trong bảng 6.

	ELISA thụ thể insulin		ELISA Fc tổng số	
	IV	SC	IV	SC
Liều (nmol/kg)	1,5	3,0	1,5	3,0
AUC _{0-inf} (μ g*giờ/mL)	51,1 $\pm$ 6,4	127 $\pm$ 7	62,7 $\pm$ 5,8	171 $\pm$ 17
C _{max} (μ g/mL)	1,22 $\pm$ 0,22	0,82 $\pm$ 0,06	2,24 $\pm$ 1,38	0,90 $\pm$ 0,21
T _{max} (giờ)	0	48 $\pm$ 24	0	64 $\pm$ 28

CL hoặc CL/F (mL/giờ/kg)	$1,99 \pm 0,24$	$1,59 \pm 0,09$	$1,61 \pm 0,15$	$1,19 \pm 0,11$
$T_{1/2}$ (giờ)	61 ± 9	70 ± 2	127 ± 18	148 ± 53
Vss (mL/kg)	164 ± 31	không xác định	256 ± 47	không xác định
%F	không xác định	125	không xác định	136

Dữ liệu thể hiện giá trị trung bình và độ lệch chuẩn với $n=3$. Các chữ viết tắt AUC_{0-inf} – diện tích dưới đường cong từ 0 đến vô cùng, C_{max} – nồng độ tối đa (đối với việc dùng IV C_{max} là nồng độ ngoại suy ở thời điểm 0), T_{max} – thời gian đạt nồng độ tối đa, CL – độ thanh thải, F – độ sinh khả dụng, $t_{1/2}$ – thời gian bán hủy, V_{ss} – thể tích phân bố ở trạng thái ổn định, NA – không áp dụng.

Độ ổn định

Chế phẩm chứa 65 mg/mL protein dung hợp theo ví dụ 1 không bảo quản

Protein dung hợp theo ví dụ 1 được bào chế ở nồng độ 65 mg/mL trong 10 mM xitrat, 46,4 mg/mL manitol, 0,02% polysorbat 80, độ pH = 6,5 và bảo quản ở 30 °C. Các mẫu được phân tích về tỷ lệ phần trăm có phân tử lượng cao bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước (size exclusion chromatography - SEC) ở 0, 2, và 4 tuần sau khi tiêm 1 μ L mẫu ở nồng độ 65 mg/mL. SEC phân tích được thực hiện trên hệ thống Agilent 1100 có trang bị cột TSKgel SuperSW3000 (Tosoh Bioscience) và pha động 50 mM natri phosphat, 300 mM NaCl, độ pH = 7,0 với tốc độ dòng 0,4 mL/phút trong 15 phút. Các đỉnh được phát hiện ở độ hấp thụ 280 nm và biểu đồ sắc ký được phân tích bằng phần mềm ChemStation. Tỷ lệ phần trăm có phân tử lượng cao ở thời điểm không là 1,13%, ở thời điểm hai tuần là 1,68%, và ở thời điểm bốn tuần là 1,74%. Kết quả này cho thấy độ ổn định của protein dung hợp theo ví dụ 1 ở nồng độ 65 mg/mL với sự phát triển tối thiểu của thể kết tụ hòa tan sau 4 tuần ở 30 °C.

Các chế phẩm 1 mg/mL của protein dung hợp theo ví dụ 1 và 3 bảo quản và không bảo quản

Các protein dung hợp theo ví dụ 1 và 3 được bào chế ở nồng độ 1 mg/mL trong xitrat 10 mM, độ pH = 6,5 với sự có mặt hoặc không có mặt của m-Cresol 30 mM và được bảo quản ở 30 °C. Các mẫu được phân tích về tỷ lệ phần trăm có phân tử lượng cao bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC) ở thời điểm không và 2

tuần bằng cách tiêm 10 μ L mẫu 1 mg/mL. SEC phân tích được thực hiện trên hệ thống Agilent 1100 có trang bị cột TSKgel G3000SWxl (Tosoh Bioscience) và pha động PBS + NaCl 350 mM, pH 7.4 chảy ở tốc độ 0,5 mL/phút trong 35 phút hoặc 45 phút lần lượt đối với các mẫu không có mặt hoặc có mặt m-cresol. Các đỉnh được phát hiện ở độ hấp thụ 214 nm và biểu đồ sắc ký được phân tích bằng phần mềm ChemStation. Đối với protein dung hợp theo ví dụ 3, không có và có m-cresol, tỷ lệ phần trăm có phân tử lượng cao ở thời điểm không lần lượt là 0,2% và 3,06%. Tỷ lệ phần trăm có phân tử lượng cao ở thời điểm 2 tuần không có và có m-cresol lần lượt là 0,2% và 1,73%. Kết quả này thể hiện sự gia tăng thể kết tụ hòa tan ngay sau khi bổ sung m-cresol đối với protein dung hợp theo ví dụ 3 ở thời điểm không. Đối với protein dung hợp theo ví dụ 1, khi không có mặt và có mặt m-cresol, tỷ lệ phần trăm có phân tử lượng cao ở thời điểm không lần lượt là 0,16% và 0,15%. Tỷ lệ phần trăm có phân tử lượng cao ở thời điểm 2 tuần với khi không có mặt và có mặt m-cresol lần lượt là 0,18% và 0,31%. Kết quả này chứng tỏ sự ổn định với sự có mặt của chất bảo quản của protein dung hợp theo ví dụ 1, mà bao gồm cải biến axit amin ở vị trí số 10 trong thành phần tương tự chuỗi A insulin (biến X₁ trong SEQ ID NO:2, Z₃ trong protein dung hợp đầu tiên được mô tả trên đây) thành gốc T, so với protein dung hợp theo ví dụ 3, bao gồm gốc I tự nhiên ở vị trí đó, nhưng mặt khác chứa cùng trình tự axit amin của chất chủ vận thụ thể insulin với protein dung hợp theo ví dụ 1.

Trình tự

SEQ ID NO:1 – Thành phần tương tự chuỗi B insulin

X₁X₂X₃QHLCGSHLVEALX₄LVCGERGFX₅YX₆X₇X₈X₉

trong đó X₁ là F, Q hoặc A; X₂ là V hoặc G; X₃ là N, K, D, G, Q, A hoặc E; X₄ là E, Y, Q, hoặc H; X₅ là H hoặc F; X₆ là G, T, S, H, V hoặc không có mặt; X₇ là G, E, P, K, D, S, H hoặc không có mặt; X₈ là G, E, K, P, Q, D, H hoặc không có mặt; X₉ là G, T, S, E, K, A hoặc không có mặt, với điều kiện là thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm ít nhất một cải biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, hoặc X₉

SEQ ID NO:2 – Thành phần tương tự chuỗi A insulin

GIVEQCCTSX₁CSLX₂QLENYCX₃X₄

X_1 là T hoặc I; X_2 là D, Y, Q hoặc E; X_3 là G, N, S hoặc A; và X_4 là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên, hoặc không có mặt, với điều kiện là nếu X_3 là N, thì X_4 phải là axit amin không phải G hoặc N

SEQ ID NO:3 – Cầu liên kết peptit thứ nhất

X_1GX_2GGGG , trong đó X_1 là G hoặc không có mặt; và X_2 là G, S hoặc không có mặt

SEQ ID NO:4 – Chất chủ vận thụ thể insulin

$X_1X_2X_3QHLCGSHLVEALX_4LVCGERGFX_5YX_6X_7X_8X_9X_{10}GX_{11}GGGGGIVEQCCT$
 $SX_{12}CSLX_{13}QLENYCX_{14}X_{15}$

trong đó X_1 là F, Q hoặc A; X_2 là V hoặc G; X_3 là N, K, D, G, Q, A hoặc E; X_4 là E, Y, Q, hoặc H; X_5 là H hoặc F; X_6 là G, T, S, H, V hoặc không có mặt; X_7 là G, E, P, K, D, S, H hoặc không có mặt; X_8 là G, E, K, P, Q, D, H hoặc không có mặt; X_9 là G, T, S, E, K, A hoặc không có mặt; X_{10} là G hoặc không có mặt; X_{11} là G, S hoặc không có mặt; X_{12} là T hoặc I; X_{13} là D, Y, Q hoặc E; X_{14} là G, N, S hoặc A; và X_{15} là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên, hoặc không có mặt, với điều kiện là ít nhất một trong số X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , hoặc X_9 phải là axit amin khác với axit amin đã có lần lượt ở vị trí B₁₆, B₂₅, B₂₇, B₂₈, B₂₉ hoặc B₃₀ của chuỗi B của phân tử insulin người, và còn với điều kiện là nếu X_{14} là N, thì X_{15} phải là axit amin không phải G hoặc N

SEQ ID NO:5 – Chất chủ vận thụ thể insulin

$FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQ$
 $LENYCG$

SEQ ID NO:6 – Cầu liên kết peptit thứ hai

$GGGGX_1GGGGX_2GGGGX_3GGGGX_4X_5X_6$

trong đó X_1 là Q hoặc E; X_2 là Q hoặc E; X_3 là Q hoặc E; X_4 là G, E, Q hoặc không có mặt; X_5 là G hoặc không có mặt; và X_6 là G hoặc không có mặt

SEQ ID NO:7 – Cầu liên kết peptit thứ hai

$GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG$

SEQ ID NO:8 – Vùng Fc của IgG người

$CPPCPAPELLGGPSVX_1LX_2PPKPKDTLMISRTPEVTCX_3VX_4DVSHEDPEVKFN$
 $WYVDGVEVHNAKTKPREEQYX_5STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN$

KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGX₆

trong đó X₁ là F, Q hoặc E; X₂ là F, Q hoặc E; X₃ là V hoặc T; X₄ là V hoặc T; X₅ là N,
D hoặc Q; và

X₆ là K hoặc không có mặt

SEQ ID NO:9 – Vùng Fc của IgG người

PCPPCPAPEAAGGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFX₅STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSX₆LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLGLGX₇

trong đó X₁ là F, Q hoặc E; X₂ F, Q hoặc E; X₃ là V hoặc T; X₄ là V hoặc T; X₅ là N, D
hoặc Q; X₆ là R, hoặc K; X₇ là K hoặc không có mặt

SEQ ID NO:10 – Vùng Fc của IgG người

ECPPCPAPPVAGPSVX₁LX₂PPKPKDTLMISRTPEVTCX₃VX₄DVSHEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFX₅STFRVVSFLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGX₆

trong đó X₁ là F, Q hoặc E; X₂ là F, Q hoặc E; X₃ là V hoặc T; X₄ là V hoặc T; X₅ là N,
D hoặc Q; và X₆ là K hoặc không có mặt

SEQ ID NO:11 – Protein dung hợp

X₁X₂X₃QHLCGSHLVEALX₄LVCGERGFX₅YX₆X₇X₈X₉X₁₀GX₁₁GGGGGIVEQCCT
SX₁₂CSLX₁₃QLENYCX₁₄X₁₅GGGGX₁₆GGGGX₁₇GGGGX₁₈GGGGX₁₉X₂₀X₂₁X₂₂CP
PCPAPX₂₃X₂₄AGX₂₅PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSX₂₆EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTX₂₇RVVSVLTVX₂₈HQDWLNGKEYKCKVSN
NKGLPX₂₉X₃₀IEKTISKX₃₁KGQPREPQVYTLPPSX₃₂EEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPX₃₃LDSDGSSFLYSX₃₄LTVDKSRWQX₃₅GNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSX₃₆G

trong đó X_1 là F, Q hoặc A; X_2 là V hoặc G; X_3 là N, K, D, G, Q, A hoặc E; X_4 là E, Y, Q, hoặc H; X_5 là H hoặc F; X_6 là G, T, S, H, V hoặc không có mặt; X_7 là G, E, P, K, D, S, H hoặc không có mặt; X_8 là G, E, K, P, Q, D, H hoặc không có mặt; X_9 là G, T, S, E, K, A hoặc không có mặt, với điều kiện là ít nhất một trong số X_4, X_5, X_6, X_7, X_8 , hoặc X_9 là axit amin không phải là axit amin có mặt lần lượt ở vị trí B₁₆, B₂₅, B₂₇, B₂₈, B₂₉ hoặc B₃₀ của chuỗi B insulin người; X_{10} là G hoặc không có mặt; X_{11} là G, S hoặc không có mặt; X_{12} là T hoặc I; X_{13} là D, Y, Q hoặc E; X_{14} là G, N, S hoặc A; X_{15} là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên, hoặc không có mặt, với điều kiện là nếu X_{14} là N, thì X_{15} phải là axit amin không phải G hoặc N; X_{16} là Q hoặc E; X_{17} là Q hoặc E; X_{18} là Q hoặc E; X_{19} là G, E, Q hoặc không có mặt; X_{20} là G hoặc không có mặt; X_{21} là G hoặc không có mặt; X_{22} là E hoặc P; X_{23} là E hoặc P; X_{24} là A hoặc V; X_{25} là G hoặc không có mặt; X_{26} là Q hoặc H; X_{27} là Y hoặc F; X_{28} là L hoặc V; X_{29} là S hoặc A; X_{30} là S hoặc P; X_{31} là A hoặc T; X_{32} là Q hoặc R; X_{33} là V hoặc M; X_{34} là R hoặc K; X_{35} là E hoặc Q; và X_{36} là L hoặc P.

SEQ ID NO:12 – Protein dung hợp

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG					
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS					
130	140	150	160	170	180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG					
190	200	210	220	230	240
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP					
250	260	270	280	290	
ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG					

SEQ ID NO:13 – Chuỗi A insulin người

GIVEQCCTSIQSLYQLENYCN

SEQ ID NO:14 – Chuỗi B insulin người

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT

SEQ ID NO:15 – Cầu liên kết peptit thứ nhất

GGSGGGG

SEQ ID NO:16 – Protein dung hợp

```

      10      20      30      40      50      60
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEETGGGGGGGIVEQCCTSICSLYQLENYCGGGG
      70      80      90     100     110     120
GSGGGGSGGGGSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
      130     140     150     160     170     180
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
      190     200     210     220     230     240
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
      250     260     270     280     290
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

```

SEQ ID NO:17 – Protein dung hợp

```

      10      20      30      40      50      60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGG
      70      80      90     100     110     120
GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
      130     140     150     160     170     180
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
      190     200     210     220     230     240
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
      250     260     270     280     290     300
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS

```

LG

SEQ ID NO:18 – Protein dung hợp

```

      10      20      30      40      50      60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGGG
      70      80      90     100     110     120
GEGGGGEGGGGEGGGGEGCPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
      130     140     150     160     170     180
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
      190     200     210     220     230     240
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
      250     260     270     280     290
NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

SEQ ID NO:19 – Protein dung hợp

```

      10      20      30      40      50      60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG
      70      80      90     100     110     120
GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
      130     140     150     160     170     180
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
      190     200     210     220     230     240
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
      250     260     270     280     290     300

```

GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LG

SEQ ID NO:20 – Protein dung hợp

10	20	30	40	50	60
FVGQHL	CGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCT	SICSLDQLENYCGGG			
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL	MISRTPEVTCVVV				
130	140	150	160	170	180
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS					
190	200	210	220	230	240
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN					
250	260	270	280	290	300
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS					

LG

SEQ ID NO:21 – Protein dung hợp

10	20	30	40	50	60
AGGQHL	CGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCT	SICSLDQLENYCGGGG			
70	80	90	100	110	120
GQGGGGQGGGGQGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL	MISRTPEVTCVVVDVSHE				
130	140	150	160	170	180
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP					
190	200	210	220	230	240
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN					
250	260	270	280	290	
NYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG					

SEQ ID NO:22 – Protein dung hợp

10	20	30	40	50	60
FVNQHL	CGSHLVEALELVCGERGFHYTPKTGGSGGGGGIVEQCCTSTC	SLDQLENYCGGG			
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGQGGGGQGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL	MISRTPEVTCVVVDVS				
130	140	150	160	170	180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG					
190	200	210	220	230	240
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP					
250	260	270	280	290	
ENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG					

SEQ ID NO:23 – Protein dung hợp

10	20	30	40	50	60
FVNQHL	CGSHLVEALELVCGERGFFYTEETGGGGGGGIVEQCCT	SICSLYQLENYCGGGG			
70	80	90	100	110	120
GSGGGGSGGGGSGGGGSECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL	MISRTPEVTCVVVDVSH				

```

      130      140      150      160      170      180
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
      190      200      210      220      230      240
PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
      250      260      270      280      290
NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

SEQ ID NO:24 – Protein dung hợp

```

      10      20      30      40      50      60
FVGQHLGSHLVEALELVCGERGFGHYGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG
      70      80      90      100     110     120
GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
      130     140     150     160     170     180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG
      190     200     210     220     230     240
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
      250     260     270     280     290
ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

SEQ ID NO:25 – GLP-1

```

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG

```

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein dung hợp chứa:

a) chất chủ vận thụ thể insulin có công thức chung Z_1 - Z_2 - Z_3 , trong đó:

i) Z_1 là thành phần tương tự chuỗi B insulin, chứa trình tự axit amin:

$X_1X_2X_3QHLGSHLVEALX_4LVCGERGFX_5YX_6X_7X_8X_9$

trong đó X_1 là F, Q hoặc A; X_2 là V hoặc G; X_3 là N, K, D, G, Q, A hoặc E; X_4 là E, Y, Q, hoặc H; X_5 là H hoặc F; X_6 là G, T, S, H, V hoặc không có mặt; X_7 là G, E, P, K, D, S, H hoặc không có mặt; X_8 là G, E, K, P, Q, D, H hoặc không có mặt; X_9 là G, T, S, E, K, A hoặc không có mặt, với điều kiện là thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm ít nhất một cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi B của phân tử insulin người ở X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , hoặc X_9 (SEQ ID NO:1);

ii) Z_2 là cầu liên kết peptit thứ nhất gồm 5 đến 10 axit amin, trong đó ít nhất 5 trong số các axit amin này là các gốc G; và

iii) Z_3 là thành phần tương tự chuỗi A insulin, chứa trình tự axit amin:

$GIVEQCCTSX_1CSLX_2QLENYCX_3X_4$

trong đó X_1 là T hoặc I; X_2 là D, Y, Q hoặc E; X_3 là G, N, S hoặc A; và X_4 là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên, hoặc không có mặt, với điều kiện là nếu X_3 là N, thì X_4 phải là axit amin không phải G hoặc N (SEQ ID NO:2);

b) cầu liên kết peptit thứ hai có từ 10 đến 25 axit amin, trong đó ít nhất 50% số axit amin này là các gốc G; và

c) vùng Fc của IgG người;

trong đó gốc đầu tận cùng C của chất chủ vận thụ thể insulin được dung hợp trực tiếp với gốc đầu tận cùng N của cầu liên kết peptit thứ hai, và gốc đầu tận cùng C của cầu liên kết peptit thứ hai được dung hợp trực tiếp với gốc đầu tận cùng N của vùng Fc của IgG người.

2. Protein dung hợp theo điểm 1, trong đó:

thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm ít nhất một cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi B insulin người ở X_4 hoặc X_5 của SEQ ID NO:1; và

và thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm ít nhất một cái biến so với trình tự axit amin của chuỗi A insulin người ở X_1 hoặc X_2 của SEQ ID NO:2.

3. Protein dung hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó:

thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm trình tự SEQ ID NO:1, trong đó: X_1 là F; X_2 là V; X_3 là N hoặc D; X_4 là E; X_5 là H; và

thành phần tương tự chuỗi A insulin bao gồm trình tự SEQ ID NO:2, trong đó: X_1 là I hoặc T; X_2 là D; X_3 là G; và X_4 không có mặt.

4. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó thành phần tương tự chuỗi B insulin bao gồm trình tự SEQ ID NO:1, trong đó mỗi X_6 - X_9 là G.

5. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó cầu liên kết peptit thứ nhất chứa trình tự axit amin sau:

X_1GX_2GGGG

trong đó X_1 là G hoặc không có mặt; và X_2 là G, S hoặc không có mặt (SEQ ID NO:3).

6. Protein dung hợp theo điểm 5, trong đó X_1 và X_2 của SEQ ID NO:3 lần lượt là G và S.

7. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó chất chủ vận thụ thể insulin có trình tự axit amin sau:

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSL
DQLENYCG (SEQ ID NO:5).

8. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó cầu liên kết peptit thứ hai chứa peptit có trình tự $[GGGGX]_n$

trong đó X là Q, E hoặc S; và trong đó n là 2-5.

9. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó cầu liên kết peptit thứ hai chứa trình tự axit amin sau:

$GGGGX_1GGGGX_2GGGGX_3GGGGX_4X_5X_6$

X_1 là Q hoặc E

X_2 là Q hoặc E

X_3 là Q hoặc E

X₄ là G, E, Q hoặc không có mặt

X₅ là G hoặc không có mặt; và

X₆ là G hoặc không có mặt

(SEQ ID NO:6).

10. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó cầu liên kết peptit thứ hai có trình tự axit amin sau:

GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (SEQ ID NO:7).

11. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó vùng Fc của IgG người là vùng Fc từ IgG1, IgG2 hoặc IgG4.

12. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó vùng Fc của IgG người chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 và SEQ ID NO:10.

13. Protein dung hợp có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:12.

14. Homodime gồm hai protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13.

15. Dược phẩm chứa protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 hoặc homodime theo điểm 14, và ít nhất một tá dược.

16. Dược phẩm theo điểm 15, trong đó dược phẩm này còn chứa một hoặc nhiều chất đệm, một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt, và một hoặc nhiều chất đẳng trương.

17. Dược phẩm theo điểm 15, trong đó dược phẩm này còn chứa xitrat, axit xitric, polysorbat 80, và manitol.

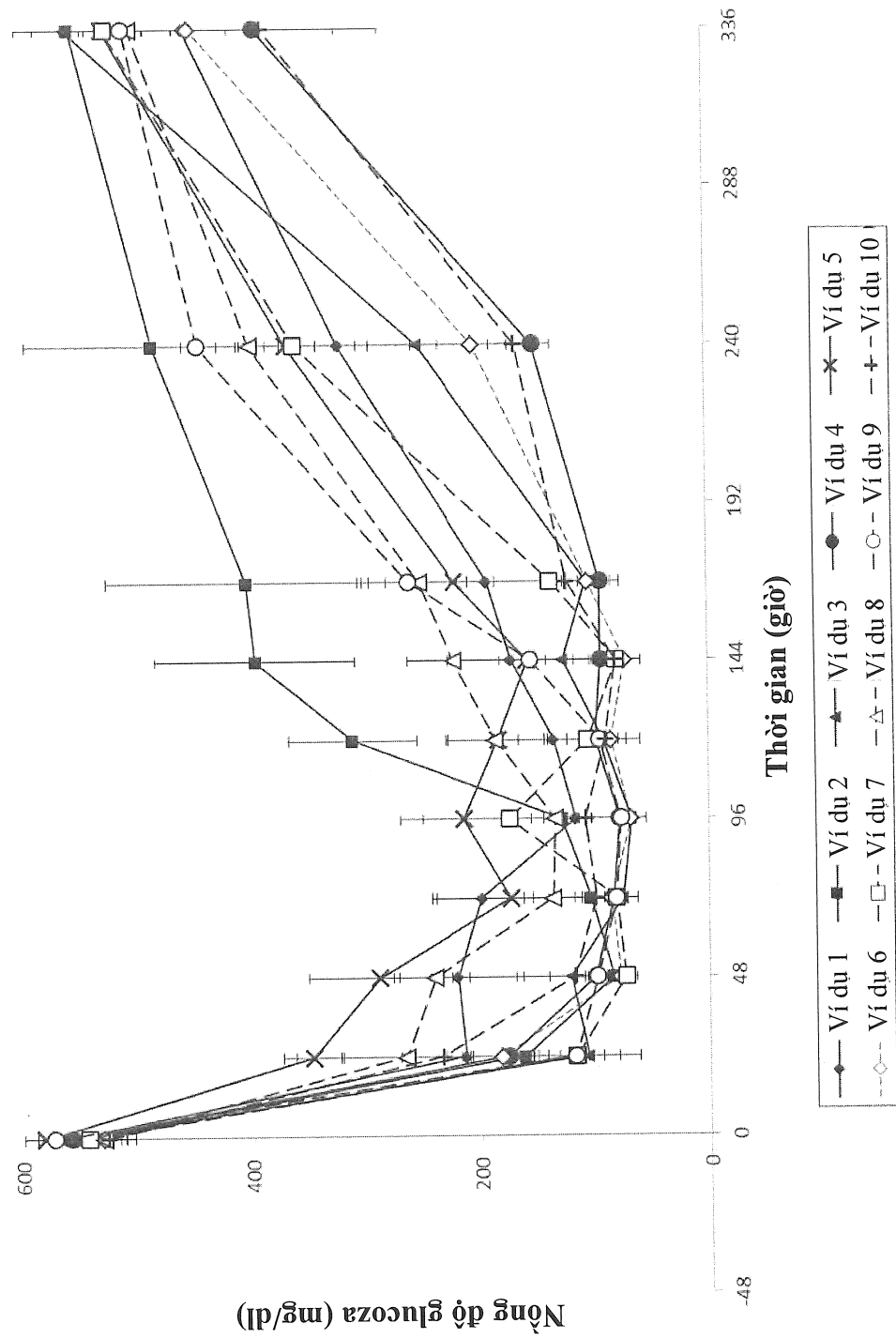
18. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 17, trong đó độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 8,0.

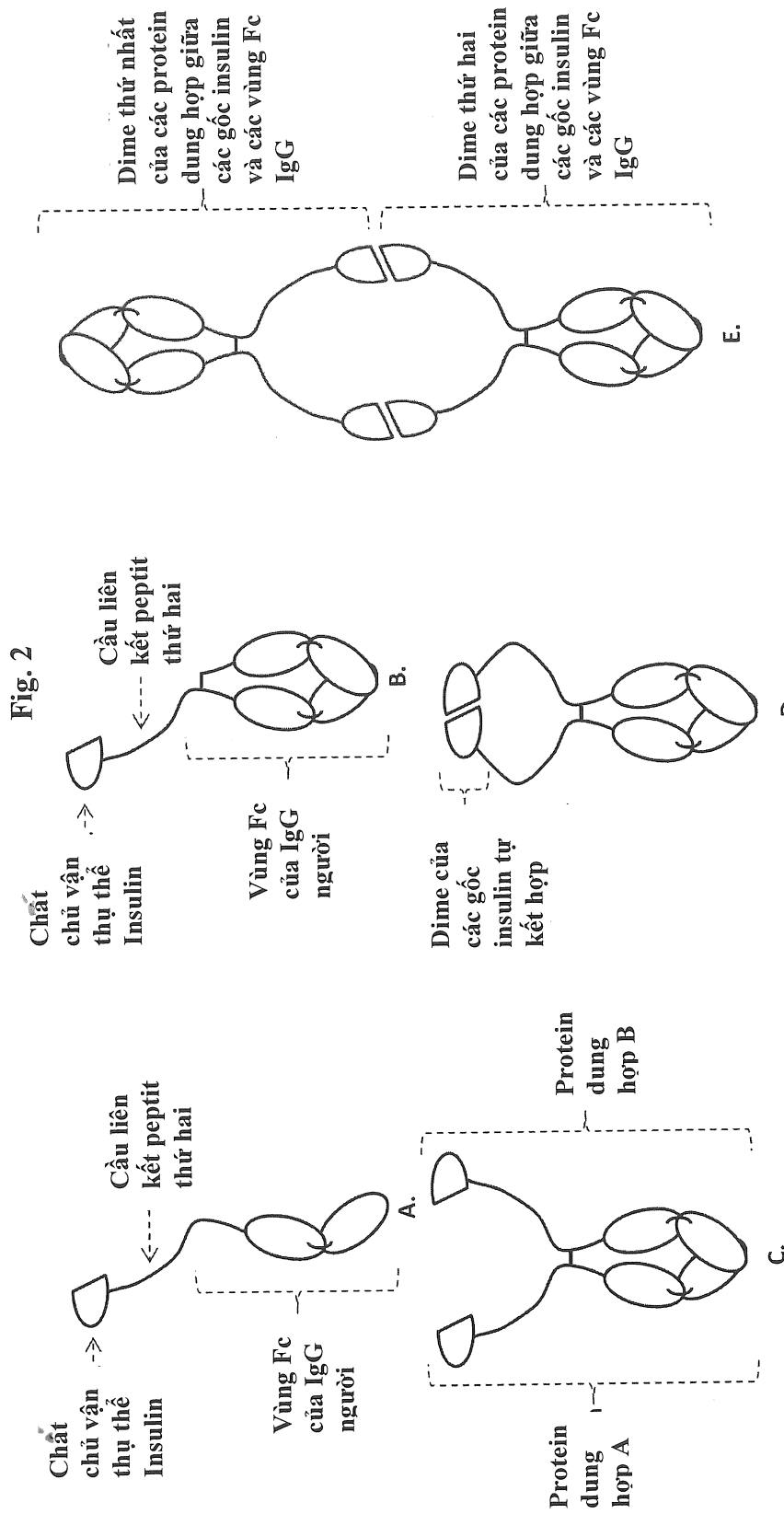
19. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 18, trong đó độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 6,0 đến khoảng 6,75.

20. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 19, trong đó dược phẩm này còn chứa thành phần hoạt tính bổ sung.

21. Dược phẩm theo điểm 20, trong đó thành phần hoạt tính bổ sung là liệu pháp dựa trên incretin.
22. Dược phẩm theo điểm 21, trong đó liệu pháp dựa trên incretin là chất chủ vận GLP-1R.
23. Dược phẩm theo điểm 22, trong đó chất chủ vận GLP-1R là dulaglutide.
24. Dược phẩm chứa homodime theo điểm 14 và dulaglutide.
25. Polynucleotit mã hóa protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13.

Fig. 1





Chú thích:

- A. Protein dung hợp trong đó vùng Fc của IgG người bao gồm vùng Fc từ một chuỗi nặng
- B. Protein dung hợp trong đó vùng Fc của IgG người bao gồm vùng Fc từ hai chuỗi nặng
- C. Dime của hai protein dung hợp
- D. Dime của hai protein dung hợp trong đó hai gốc insulin tự kết hợp hoặc dime hóa
- E. Dime của hai protein dung hợp trong đó hai gốc insulin của protein dung hợp thứ nhất tự kết hợp hoặc dime hóa với hai gốc insulin của dime thứ hai

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company
 <120> PROTEIN DUNG HỢP VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN DUNG HỢP NÀY
 <130> X20356
 <150> 62/158079
 <151> 2015-05-07
 <160> 25
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa ở vị trí số 1 là Phe, Gln hoặc Ala
 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí số 2 là Val hoặc Gly
 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa ở vị trí số 3 là Asn, Lys, Asp, Gly, Gln, Ala hoặc Glu
 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa ở vị trí số 16 là Glu, Tyr, Gln hoặc His
 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa ở vị trí số 25 là His hoặc Phe
 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa ở vị trí số 27 là Gly, Thr, Ser, His, Val, hoặc không có mặt
 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa ở vị trí số 28 là Gly, Glu, Pro, Lys, Asp, Ser, His, hoặc không có mặt

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa ở vị trí số 29 là Gly, Glu, Lys, Pro, Gln, Asp, His, hoặc không có mặt

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa ở vị trí số 30 là Gly, Thr, Ser, Glu, Lys, Ala, hoặc không có mặt

<400> 1

Xaa	Xaa	Xaa	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Xaa
1				5				10						15	

Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa		
			20				25						30		

<210> 2
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa ở vị trí số 10 là Thr hoặc Ile

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa ở vị trí số 14 là Asp, Tyr, Gln hoặc Glu

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa ở vị trí số 21 là Gly, Asn, Ser, hoặc Ala

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa ở vị trí số 22 là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên, hoặc không có mặt

<400> 2

Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Xaa	Cys	Ser	Leu	Xaa	Gln	Leu
1				5				10					15		

Glu	Asn	Tyr	Cys	Xaa	Xaa										
			20												

<210> 3

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa ở vị trí số 1 là Gly hoặc không có mặt

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa ở vị trí số 3 là Gly, Ser, hoặc không có mặt

<400> 3

Xaa Gly Xaa Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 4
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa ở vị trí số 1 là Phe, Gln, hoặc Ala

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí số 2 là Val hoặc Gly

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa ở vị trí số 3 là Asn, Lys, Asp, Gly, Gln, Ala, hoặc Glu

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa ở vị trí số 16 là Glu, Tyr, Gln, hoặc His

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa ở vị trí số 25 là His hoặc Phe

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (27)..(27)

<223> Xaa ở vị trí số 27 là Gly, Thr, Ser, His, Val, hoặc không có mặt

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (28)..(28)

<223> Xaa ở vị trí số 28 là Gly, Glu, Pro, Lys, Asp, Ser, His, hoặc không có mặt

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (29)..(29)

<223> Xaa ở vị trí số 29 là Gly, Glu, Lys, Pro, Gln, Asp, His, hoặc không có mặt

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (30)..(30)

<223> Xaa ở vị trí số 30 là Gly, Thr, Ser, Glu, Lys, Ala, hoặc không có mặt

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (31)..(31)

<223> Xaa ở vị trí số 31 là Gly hoặc không có mặt

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (33)..(33)

<223> Xaa ở vị trí số 33 là Gly, Ser, hoặc không có mặt

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (47)..(47)

<223> Xaa ở vị trí số 47 là Thr hoặc Ile

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (51)..(51)

<223> Xaa ở vị trí số 51 là Asp, Tyr, Gln, hoặc Glu

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (58)..(58)

<223> Xaa ở vị trí số 58 là Gly, Asn, Ser, hoặc Ala

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (59)..(59)

<223> Xaa ở vị trí số 59 là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên, hoặc không có mặt

<400> 4

Xaa	Xaa	Xaa	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Xaa
1				5				10						15	

Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Gly
			20					25						30	

Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Xaa Cys

35 40 45

Ser Leu Xaa Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Xaa Xaa
50 55

<210> 5
<211> 58
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 5

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

<210> 6
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (5)..(5)
<223> Xaa ở vị trí số 5 là Gln hoặc Glu

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (10)..(10)
<223> Xaa ở vị trí số 10 là Gln hoặc Glu

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (15)..(15)
<223> Xaa ở vị trí số 15 là Gln hoặc Glu

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (20)..(20)
<223> Xaa ở vị trí số 20 là Gly, Glu, Gln, hoặc không có mặt

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (21)..(21)

<223> Xaa ở vị trí số 21 là Gly hoặc không có mặt

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (22)..(22)

<223> Xaa ở vị trí số 21 là Gly hoặc không có mặt

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (22)..(22)

<223> Xaa ở vị trí số 22 là Gly hoặc không có mặt

<400> 6

Gly	Gly	Gly	Gly	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Xaa	Gly
1				5				10						15	

Gly	Gly	Gly	Xaa	Xaa	Xaa
			20		

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7

Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Gly
1				5				10						15	

Gly	Gly	Gly	Gly
			20

<210> 8

<211> 222

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (16)..(16)

<223> Xaa ở vị trí số 16 là Phe, Gln hoặc Glu

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (18)..(18)

<223> Xaa ở vị trí số 18 là Phe, Gln hoặc Glu

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (37)..(37)

<223> Xaa ở vị trí số 37 là Val hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (39)..(39)

<223> Xaa ở vị trí số 39 là Val hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (72)..(72)

<223> Xaa ở vị trí số 72 là Asn, Asp hoặc Gln

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (222)..(222)

<223> Xaa ở vị trí số 222 là Lys hoặc không có mặt

<400> 8

Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Xaa
1				5					10					15	

Leu	Xaa	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
			20					25					30		

Glu	Val	Thr	Cys	Xaa	Val	Xaa	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
		35					40					45			

Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
	50					55					60				

Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Xaa	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
65					70					75					80

Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
				85					90					95	

Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
			100					105					110		

Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
		115					120					125			

Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
	130					135					140				

Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
145					150					155					160

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

Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
			180					185					190		

Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
		195					200					205			

Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Xaa		
	210					215					220				

<210> 9

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

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa ở vị trí số 17 là Phe, Gln hoặc Glu

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa ở vị trí số 19 là Phe, Gln hoặc Glu

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa ở vị trí số 38 là Val hoặc Thr

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (40)..(40)
 <223> Xaa ở vị trí số 40 là Val hoặc Thr

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (73)..(73)
 <223> Xaa ở vị trí số 73 là Asn, Asp hoặc Gln

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (185)..(185)
 <223> Xaa ở vị trí số 185 là Arg hoặc Lys

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (223)..(223)
 <223> Xaa ở vị trí số 223 là Lys hoặc không có mặt

<400> 9

Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
1				5					10					15	

Xaa	Leu	Xaa	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
			20					25						30	

Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Xaa	Val	Xaa	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu
		35					40					45			

Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
	50					55					60				

Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Xaa	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
65					70					75					80

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

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (222)..(222)

<223> Xaa ở vị trí số 222 là Lys hoặc không có mặt

<400> 10

```

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Xaa
1          5          10          15

Leu Xaa Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20          25          30

Glu Val Thr Cys Xaa Val Xaa Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35          40          45

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50          55          60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Xaa Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
65          70          75          80

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85          90          95

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100         105         110

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115        120        125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
130        135        140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145        150        155        160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
165        170        175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180        185        190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195        200        205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210        215        220

```

<210> 11

<211> 303

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (1)..(1)

<223> Xaa ở vị trí số 1 là Phe, Gln, hoặc Ala

 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí số 2 là Val hoặc Gly

 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa ở vị trí số 3 là Asn, Lys, Asp, Gly, Gln, Ala, hoặc Glu

 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa ở vị trí số 16 là Glu, Tyr, Gln, hoặc His

 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa ở vị trí số 25 là His hoặc Phe

 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa ở vị trí số 27 là Gly, Thr, Ser, His, Val, hoặc không có mặt

 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa ở vị trí số 28 là Gly, Glu, Pro, Lys, Asp, Ser, His, hoặc không có mặt

 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa ở vị trí số 29 là Gly, Glu, Lys, Pro, Gln, Asp, His, hoặc không có mặt

 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa ở vị trí số 30 là Gly, Thr, Ser, Glu, Lys, Ala, hoặc không có mặt

 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa ở vị trí số 31 là Gly, hoặc không có mặt

 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa ở vị trí số 33 là Gly, Ser, hoặc không có mặt

 <220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (47)..(47)
 <223> Xaa ở vị trí số 47 là Thr hoặc Ile

 <220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (51)..(51)
 <223> Xaa ở vị trí số 51 là Asp, Tyr, Gln, hoặc Glu

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (58)..(58)
 <223> Xaa ở vị trí số 58 là Gly, Asn, Ser hoặc Ala

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (59)..(59)
 <223> Xaa ở vị trí số 59 là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên, hoặc không có mặt

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (64)..(64)
 <223> Xaa ở vị trí số 64 là Gln hoặc Glu

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (69)..(69)
 <223> Xaa ở vị trí số 69 là Gln hoặc Glu

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (74)..(74)
 <223> Xaa ở vị trí số 74 là Gln hoặc Glu

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (79)..(79)
 <223> Xaa ở vị trí số 79 là Gly, Glu, Gln, hoặc không có mặt

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (80)..(80)
 <223> Xaa ở vị trí số 80 là Gly hoặc không có mặt

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (81)..(81)
 <223> Xaa ở vị trí số 81 là Gly hoặc không có mặt

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (82)..(82)
 <223> Xaa ở vị trí số 82 là Glu hoặc Pro

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (90)..(90)
 <223> Xaa ở vị trí số 90 là Glu hoặc Pro

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (91)..(91)
 <223> Xaa ở vị trí số 91 là Ala and Val

<220>

```

<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (94)..(94)
<223> Xaa ở vị trí số 94 là Gly hoặc không có mặt

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (125)..(125)
<223> Xaa ở vị trí số 125 là Gln hoặc His

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (157)..(157)
<223> Xaa ở vị trí số 157 là Tyr hoặc Phe

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (166)..(166)
<223> Xaa ở vị trí số 166 là Leu hoặc Val

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (187)..(187)
<223> Xaa ở vị trí số 187 là Ser hoặc Ala

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (188)..(188)
<223> Xaa ở vị trí số 188 là Ser hoặc Pro

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (196)..(196)
<223> Xaa ở vị trí số 196 là Ala hoặc Thr

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (212)..(212)
<223> Xaa ở vị trí số 212 là Gln hoặc Arg

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (254)..(254)
<223> Xaa ở vị trí số 254 là Val hoặc Met

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (266)..(266)
<223> Xaa ở vị trí số 266 là Arg hoặc Lys

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (276)..(276)
<223> Xaa ở vị trí số 276 là Glu hoặc Gln

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (302)..(302)
<223> Xaa ở vị trí số 302 là Leu hoặc Pro

<400> 11
Xaa Xaa Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Xaa

```


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

<210> 12
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

```

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu
1          5          10          15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20          25          30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Thr Cys
35          40          45

Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly
50          55          60

Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gly Glu Cys
65          70          75          80

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
85          90          95

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
100         105         110

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
115         120         125

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
130         135         140

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
145         150         155         160

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
165         170         175

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
180         185         190

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
195         200         205

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
210         215         220

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
225         230         235         240

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
245         250         255

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
260         265         270

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
275         280         285

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

```

290

295

<210> 13
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 13

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

<210> 14
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 14

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 20 25 30

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 16
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Glu Glu Thr Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser

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

<210> 17
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 17
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu

```

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

<210> 18
<211> 297
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 18

```

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

```

290

295

<210> 19
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 19

```

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu
1          5          10          15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20          25          30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Thr Cys
35          40          45

Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly
50          55          60

Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly
65          70          75          80

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
85          90          95

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
100         105         110

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
115         120         125

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
130         135         140

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
145         150         155         160

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
165         170         175

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
180         185         190

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
195         200         205

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
210         215         220

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
225         230         235         240

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
245         250         255

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

```

260 265 270
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 275 280 285
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 290 295 300

 <210> 20
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

 <400> 20

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

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

```
<210> 21
<211> 297
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 21

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

195	200	205
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
210	215	220
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
225	230	235 240
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
	245	250 255
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
	260	265 270
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
	275	280 285
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
290	295	
<210> 22		
<211> 299		
<212> PRT		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Cấu trúc tổng hợp		
<400> 22		
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu		
1	5	10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Lys Thr Gly Gly		
	20	25 30
Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Thr Cys		
	35	40 45
Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly		
	50	55 60
Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gly Glu Cys		
65	70	75 80
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
	85	90 95
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
	100	105 110
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
	115	120 125
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
	130	135 140
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
145	150	155 160
Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		

	165		170		175
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr					
	180		185		190
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg					
	195		200		205
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly					
	210		215		220
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro					
225		230		235	240
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser					
	245		250		255
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln					
	260		265		270
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His					
	275		280		285
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
	290		295		
<210> 23					
<211> 298					
<212> PRT					
<213> Trình tự nhân tạo					
<220>					
<223> Cấu trúc tổng hợp					
<400> 23					
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu					
1	5		10		15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Glu Glu Thr Gly Gly					
	20		25		30
Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser					
	35		40		45
Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly					
	50		55		60
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Cys Pro					
65		70		75	80
Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro					
	85		90		95
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr					
	100		105		110
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn					
	115		120		125
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg					

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

<210> 24
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 24

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

100	105	110
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe 115 120 125		
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro 130 135 140		
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr 145 150 155 160		
Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val 165 170 175		
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr 180 185 190		
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg 195 200 205		
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 210 215 220		
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro 225 230 235 240		
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser 245 250 255		
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln 260 265 270		
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His 275 280 285		
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 290 295		
<210> 25		
<211> 31		
<212> PRT		
<213> Người hiện đại		
<400> 25		
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly 1 5 10 15		
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly 20 25 30		