



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

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

(11)



1-0036084

(51)⁷ A61K 38/21; C07K 14/56

(13) B

(21) 1-2019-00293

(22) 16/06/2017

(86) PCT/US2017/037964 16/06/2017

(87) WO2017/222940 28/12/2017

(30) 62/352,163 20/06/2016 US

(45) 26/06/2023 423

(43) 25/03/2019 372A

(73) 1. ELANCO US INC. (US)

2500 Innovation Way, Greenfield, Indiana 46140, United States of America

2. AMBRX, INC. (US)

10975 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, United States of America

(72) CANNING, Peter Connor (US); KNUDSEN, Nickolas (US); SKIDMORE, Lillian (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) BIẾN THỂ INTERFERON ALPHA Ở LỢN, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHÚNG VÀ LỘ ĐA LIỀU CHỨA CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập đến biến thể interferon alpha ở lợn (pINF- α) chứa axit amin tổng hợp ở các vị trí chọn lọc trong pINF- α và một hoặc hai đoạn cài xen axit amin ở các đầu tận cùng N sau khi loại bỏ peptit tín hiệu. Biến thể pINF- α này có thể còn được pegyl hóa. Phương pháp điều chế hóa biến thể này, chế phẩm chứa biến thể này và lọ nhỏ đa liều chứa chế phẩm này cũng được đề xuất.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể interferon alpha ở lợn (pINF- α) chứa một axit amin tổng hợp ở các vị trí chọn lọc trong pINF- α và một hoặc hai đoạn cài xen axit amin ở các đầu tận cùng N sau khi loại bỏ peptit tín hiệu. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế biến thể này, chế phẩm chứa biến thể này, và lọ nhỏ đa liều chứa chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc dùng interferon alpha (INF- α) có những di chứng về mặt y tế mà cần phải được đánh giá và kiểm soát. Chẳng hạn, tính tự miễn dịch cũng có thể được gây ra bởi phương pháp trị liệu bằng INF- α đối với bệnh viêm gan mạn tính do virus ở người. Do vậy, thông thường việc điều trị cho người bị giới hạn ở những bệnh nhân cần phương pháp trị liệu này, do phương pháp trị liệu này có thể làm trầm trọng thêm tính tự miễn hiện có trước đó, bộc lộ các quá trình tự miễn thâm lặng, hoặc thậm chí còn gây ra các bệnh tự miễn. F.L. Dumoulin et al., “Autoimmunity induced by interferon- α therapy for chronic viral hepatitis”, *Biomed. & Pharmacother.*, 53: 242-54 (1999). Cũng nhận thấy là interferon- α không điều trị được nhiễm virus viêm gan C ở người.

Nhận thấy là interferon hữu hiệu để điều trị cho một số người mắc virus viêm gan C (hepatitis C virus - HCV), ở phạm vi hai dạng interferon alpha (INF- α) được pegyl hóa hiện được sử dụng trong lâm sàng cho người, nghĩa là Peginterferon- α -2a và Peginterferon- α -2b, tương ứng còn được biết đến như là PEGASYS® và PEGINTRON®. Tuy nhiên, vẫn chưa rõ INF- α ức chế sự sao chép HCV như thế nào. Thú vị hơn, Peginterferon- α -2a và Peginterferon- α -2b chỉ có hoạt tính 7% và 28% tương ứng so với các dạng nguyên thể (kiểu đại) của chúng.

Trong quá trình điều chế interferon, nhiều biến thể khác nhau đã được tạo ra để điều trị cho người nhằm gia tăng sinh khả dụng và tham dự vào quá trình sản sinh

protein. Một ví dụ là patent Mỹ số 8,106,160, nêu việc bổ sung một hoặc nhiều gốc axit amin vào xystein đầu tận cùng N của interferon alpha-2b trưởng thành ở người để giảm sự tạo thành các liên kết disulfid không có trong tự nhiên và nhờ đó làm giảm lượng các chất đồng dạng về mặt cấu trúc. Quá trình này bao gồm việc bổ sung gốc prolin ở đầu tận cùng N.

Phương pháp đưa các axit amin không có trong tự nhiên cài xen vào các vị trí trong protein được mô tả chẳng hạn trong WO2010/011735 và trong WO2005/074650.

Interferon alpha-1 kiểu đại ở lợn có chiều dài 189 axit amin và được lưu trữ ở GenBank X57191.

Cần có các dạng interferon- α để dùng trong động vật và trong chăn nuôi, đặc biệt là trong điều trị các quần thể lợn nhạy với sự nhiễm virus và thậm chí đặc biệt hơn là trong điều trị các quần thể lợn mà sự nhiễm virus đã và đang xảy ra để bảo vệ cho các đàn lợn khỏi bệnh học có liên quan đến nhiễm virus. Sẽ có lợi nếu tìm được biến thể IFN- α để sử dụng ở các động vật giống lợn mà hoạt động trong thời gian dài và hữu hiệu để ức chế hoặc làm giảm sự sao chép virus, sự phát bệnh ở đàn và sự chết của động vật có liên quan đến sự nhiễm virus. Biến thể IFN- α ở lợn sẽ duy trì hoạt tính sinh học, có sinh khả dụng dài hơn và có ít chất đồng phân hơn cho phép tinh chế dễ hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất biến thể interferon- α (pINF- α) ở lợn và phương pháp sử dụng nó mà có thể được sử dụng ở động vật không được chủng ngừa, như lợn mới sinh chưa được chủng ngừa cũng như ở các động vật bị ức chế miễn dịch, nghĩa là lợn đang mang thai (lợn nái hoặc lợn nái con mang thai); ở những động vật mà việc chủng ngừa mang lại sự bảo vệ không đủ; ở những động vật nhạy cảm với sự nhiễm virus mà không có vắc xin hữu hiệu nào có sẵn cho nó; và ở các động vật hiện đã bị nhiễm virus. Các chế phẩm và phương pháp sử dụng nó sẽ được dùng để ngăn ngừa đợt bùng phát nhiễm virus trên thực tế. Các chế phẩm cũng có thể được sử dụng để giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh ở lợn bị nhiễm virus. Thông thường, phác đồ liều đơn được dùng. Theo cách khác,

và nếu cần, các liều có thể được đề xuất cách nhau khoảng 1-3, hoặc 2 tuần, tùy ý chỉ một đến hai liều được dùng.

Interferon- α (pINF- α) kiểu đại ở lợn mà bao gồm trình tự tín hiệu gồm 23 gốc là:

maptsaflta lvllscnaic slgcdlpqth slahtralrl laqmrrisfp scldhrrdfg
 spheafggng vqkaqamalv hemlqqtfql fstegsaaaw nesllhqfct gldqqldle
 acvmqeagle gtplleedsilavrkyfhrl tlylqeksy pcaeivrae vmrsfsssrn
 lqdrllrkke (SEQ ID NO: 3).

Phần được gạch chân hai lần là trình tự tín hiệu không có mặt trong dạng trưởng thành của pINF- α kiểu đại.

Được đề xuất ở đây là biến thể (pINF- α). Biến thể này bỏ qua trình tự tín hiệu gồm 23 axit amin. Biến thể này có thể có một gốc methionin ở đầu tận cùng amino mà nó có thể được tách khỏi trong dạng trưởng thành của protein này. Methionin này không có mặt trong dạng kiểu đại của pINF- α . Biến thể pINF- α còn có một hoặc hai đoạn cài xen axit amin giữa methionin trong trình tự tín hiệu và xystein ở đầu tận cùng N. Đoạn cài xen này là prolin hoặc prolin-serin. Trình tự này được mô tả dưới đây: **MX_aX_bCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAGLEGTPILLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSYPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE** (SEQ ID NO: 2). “X_b” (vị trí 3 trong SEQ ID NO: 2) là Prolin, Serin hoặc không có mặt. X_a (vị trí 2 trong SEQ ID NO: 2) không có mặt hoặc là prolin. Khi X_b không có mặt thì X_a không có mặt, khi X_b là prolin thì X_a không có mặt, và khi X_b là serin thì X_a là prolin. Gốc axit glutamic in đậm “E” nằm xuôi chiều X_a và X_b là vị trí thay thế của axit amin tổng hợp, nghĩa là pAF.

Biến thể pINF- α còn có axit amin tổng hợp, para-axetyl-phenylalanin (pAF), được thế ở một trong số 5 vị trí trong SEQ ID NO: 1: gốc E103 (SEQ ID NOS: 9 đến 11 tương ứng), E107 (SEQ ID NOS: 12 đến 14 tương ứng), L112 (SEQ ID NOS: 15 đến 17 tương ứng), Y136 (SEQ ID NOS: 18 đến 20), hoặc Q102 (SEQ ID NOS: 6 đến 8 tương

ứng) (đánh số theo trình tự được chỉ ra trong SEQ ID NO: 4 không có Met ở đầu tận cùng N).

Biến thể pINF- α có thể còn được pegyl hóa ở pAF. Biến thể pINF- α có thể được pegyl hóa với PEG từ khoảng 5 đến khoảng 40 kDa, hoặc với PEG 30 kDa. Biến thể pINF- α có thể được pegyl hóa với oxyamino-PEG mạch thẳng 30 kDa. Nhóm oxyamino đã hoạt hóa phản ứng chọn lọc hóa học với mạch bên axetyl có mặt trên axit amin tổng hợp, như para-axetylphenyalanin. Biến thể pINF- α có PEG 30 kDa mạch thẳng được liên kết cộng hóa trị với pAF được thể ở E107 (SEQ ID NOS: 12 đến 14) (đánh số theo trình tự trưởng thành được chỉ ra trong SEQ ID NO: 4). Biến thể E107 pINF- α có thể còn có prolin hoặc prolin và serin ở đầu tận cùng N như được phản ánh trong SEQ ID NOS: 13 và 14.

Biến thể pINF- α có thể được kết hợp vào các chế phẩm. Chế phẩm chứa biến thể pINF- α có thể bao gồm 20 mM natri axetat, 100 mM natri clorua, 5% glyxerol ở độ pH 5,0 có độ chuẩn của INF- α lộn từ 2,0 đến 6,0 g/L.

Chế phẩm này có thể được điều chế bằng phương pháp bao gồm các bước:

- (a) tinh chế pINF- α ;
- (b) hòa tan biến thể pINF- α đã tinh chế trong 50 mM Tris, 6M guanidin ở độ pH 8;
- (c) ủ biến thể pINF- α đã hòa tan ở nhiệt độ trong phòng trong 16-24 giờ trong 20 mM Tris, 1M arginin, 10 mM methionin (met), 1 mM EDTA (axit etylendiamintetraaxetic) ở độ pH 8,0 để cho phép protein cuộn lại;
- (d) loại bỏ biến thể đã được axetyl hóa còn lại bằng cách phân giải nhờ sắc ký trên nhựa trao đổi anion mạnh;
- (e) cho biến thể pINF- α liên hợp với PEG ở tỷ lệ giữa PEG và protein nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:8 hoặc nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:2; và

(f) tinh chế biến thể pINF- α đã được pegyl hóa.

Biến thể pINF- α và chế phẩm của nó có thể được sử dụng để điều trị sự nhiễm virus. Phương pháp điều trị sự nhiễm virus ở lợn bao gồm bước cho lợn sử dụng biến thể pINF- α dưới da với lượng biến thể interferon- α (pINF- α) bất kỳ của lợn nằm trong khoảng từ 25 $\mu\text{g/kg}$ đến 150 $\mu\text{g/kg}$ thể trọng động vật. Phương pháp này có thể còn bao gồm bước dùng biến thể pINF- α lần thứ hai với lượng từ khoảng 25 $\mu\text{g/kg}$ đến khoảng 150 $\mu\text{g/kg}$ thể trọng động vật. Khi phương pháp bao gồm bước sử dụng lần thứ hai, bước sử dụng lần thứ hai này có thể xảy ra khoảng 7, 14, hoặc 21 ngày sau bước sử dụng lần thứ nhất.

Phương pháp điều trị sự nhiễm virus có thể được sử dụng để điều trị sự nhiễm virus được chọn từ nhóm gồm: bệnh virus hô hấp và sinh sản ở lợn, bệnh virus tay chân miệng, virus cúm ở lợn, circovirus ở lợn, virus gây dịch tiêu chảy ở lợn, và virus viêm dạ dày-ruột có thể truyền nhiễm. Phương pháp này có thể được sử dụng để điều trị cho lợn mới sinh hoặc lợn đang mang thai.

Bản mô tả cũng bao hàm việc sử dụng bất kỳ trong số các biến thể pIFN- α (hoặc chế phẩm chứa biến thể này) trong phương pháp trị liệu ở lợn để điều trị sự nhiễm virus, trong đó sự nhiễm virus này có thể gây ra bởi bất kỳ trong số các virus được nêu ở đây.

Bản mô tả cũng mô tả việc sử dụng biến thể pINF- α để dùng trong sản xuất thuốc để điều trị nhiễm virus ở lợn. Lợn có thể là lợn mới sinh hoặc lợn đang mang thai.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 mô tả plasmit pKG0083 với pIFN- α -PS-E107amber, bao gồm đoạn cài xen prolin-serin ở đầu tận cùng N. Plasmit này điều khiển sự sản sinh biến thể protein có SEQ ID NO: 14 bởi dòng tế bào AXID2820.

FIG. 2 mô tả sự sắp thẳng hàng trình tự và sự nhận dạng trình tự đối với biến thể pINF- α mang axit amin tổng hợp pAF được thể cho các gốc Q102, E103, E107, L112, và Y136. Các trình tự này đều không có trình tự tín hiệu đối với pINF- α . Các trình tự

này cũng không có (SEQ ID NOS: 6, 9, 12, 15, và 18) một axit amin khác ở đầu tận cùng N, hoặc có prolin (SEQ ID NOS: 7, 10, 13, 16, và 19) hoặc prolin-serin được bổ sung ở đầu tận cùng N (SEQ ID NOS: 8, 11, 14, 17, và 20).

FIG. 3 mô tả trình tự motif của SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 2 là giống như SEQ ID NO: 1, nhưng bao gồm methionin ở đầu tận cùng N, thường được tách loại trong quá trình trưởng thành của biến thể pIFN- α trưởng thành. SEQ ID NO: 3 bao gồm trình tự tín hiệu nhưng không có đoạn cài xen Proline, Prolin-serin, và/hoặc Methionin. SEQ ID NO: 4 là pIFN- α trưởng thành kiểu đại. SEQ ID NO: 5 là trình tự kiểu đại với methionin ở đầu tận cùng N.

FIG. 4 mô tả bảng các biến thể pIFN- α khác nhau của Q102, E103, E107, L112, và 136 không có gốc bổ sung hoặc có prolin hoặc prolin-serin được bổ sung ở đầu tận cùng N, như được chỉ ra ở các vị trí X_a và X_b. “abs” có nghĩa là không có mặt. SEQ ID NO: 1 được chỉ ra để tham chiếu.

FIG. 5 mô tả sự sắp thẳng hàng trình tự đối với ba biến thể pIFN- α khác, trong đó pAF được thể ở H7, R34, và H40, Các trình tự này không có prolin hoặc prolin-serin ở đầu tận cùng N, cũng như không có methionin ở đầu tận cùng N. Các vị trí đột biến được mô tả bởi các hộp trong trình tự WT pIFN-alpha trên bảng, và trong bảng chúng được mô tả bằng hộp “X”. X_a và X_b là như được xác định trong đồ thị. “abs” có nghĩa là không có mặt.

FIG. 6 mô tả các đột biến E107 khác được tổng hợp ở đó serin (SEQ ID NO: 24), serin-glyxin (SEQ ID NO: 25), và histidin (SEQ ID NO: 26) được bổ sung vào ở đầu tận cùng amino của biến thể pIFN- α có pAF được thể ở E107 (được biểu thị bởi hộp “X”). X_a và X_b là như được xác định trong đồ thị. “abs” có nghĩa là không có mặt.

Mô tả chi tiết sáng chế

“Dùng” có nghĩa là tiêm lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của các hợp chất và các chế phẩm chứa các hợp chất đã nêu được bộc lộ trong bản mô tả này. Dùng có thể là trong cơ (intramuscular - i.m) hoặc dưới da (subcutaneous - s.c.). Lượng biến thể pINF-

α được dùng sẽ được đưa ra dựa trên trọng lượng của động vật, ví dụ với lợn đang mang thai nhận lượng lớn hơn lợn mới sinh.

Chế phẩm được bộc lộ ở đây cũng có thể được đưa vào liều đơn hoặc lộ đa liều.

Lợn được điều trị bằng các phương pháp được mô tả ở đây là lợn mới sinh, lợn đang mang thai (lợn nái con hoặc lợn nái đang mang thai).

“Điều trị”, “việc điều trị”, hoặc “sự điều trị” có nghĩa là sự giảm hoặc sự thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan đến sự nhiễm một trong số các virus được nêu trong bản mô tả này. Chế phẩm này cũng có thể được sử dụng trong sản xuất thuốc để điều trị nhiễm virus ở lợn. Chế phẩm hoặc thuốc có thể được sử dụng để điều trị cho lợn. Lợn có thể là lợn mới sinh hoặc lợn đang mang thai.

Dưới đây đề cập cụ thể đến các hợp chất, chế phẩm chứa các hợp chất này, phương pháp bào chế chế phẩm này, và phương pháp sử dụng các hợp chất và các chế phẩm này để điều trị cho lợn (giống lợn hoặc lợn) bị nhiễm virus.

Như được sử dụng ở đây và trong yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít "một", "cái" và "này" bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ theo cách khác, và việc sử dụng số nhiều cũng có thể bao hàm cả việc sử dụng số ít.

"Axit amin tổng hợp" dùng để chỉ axit amin không phải là một trong 20 axit amin thông thường hoặc pyrolysine hoặc selenoxystein. Ví dụ về các axit amin tổng hợp như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, para-acetyl phenylalanine (pAF), acetylglucosaminyl-L-serine, và N-acetylglucosaminyl-L-treonine. Để biết thêm về các axit amin tổng hợp này và việc kết hợp và cải biến chúng, xem WO2010/011735 và WO2005/074650,

Thuật ngữ "đối tượng" như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ lợn, đặc biệt là lợn nuôi trong các hộ gia đình (*Sus scrofa domesticus* hoặc *Sus domesticus*) và có thể bao gồm lợn cảnh cũng như các giống được nuôi để sản xuất thịt. “Lợn”, “họ lợn” hoặc “giống lợn” có nghĩa bao gồm tất cả các giống lợn.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" như được sử dụng để chỉ lượng biến thể pINF- α được dùng mà nó sẽ ngăn ngừa, điều trị, hoặc làm giảm sự truyền nhiễm của virus ở lợn từ động vật đã bị lây nhiễm sang động vật chưa bị lây nhiễm hoặc sẽ ngăn ngừa, điều trị hoặc làm giảm triệu chứng của bệnh được gây ra bởi sự lây nhiễm virus ở lợn. Các biến thể (pINF- α) interferon alpha (pINF- α) ở lợn được bộc lộ ở đây. Các biến thể này có các axit amin tổng hợp được thể ở các vị trí khác nhau trên trình tự IFN- α ở lợn. Gen pINF- α *Sus scrofa domestica* (GenBank X57191) trong đó trình tự dẫn được gạch chân (các gốc 1-23 của SEQ ID NO: 3) được loại bỏ như được mô tả dưới đây (hướng đầu tận cùng amino đến carboxy):

MAPTSAFLTALVLLSCNAICSLGCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE. (SEQ ID NO:3).

Trình tự trưởng thành là:

CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE (SEQ ID NO: 4). Trình tự tín hiệu được gạch chân ở đầu tận cùng N của SEQ ID NO: 3 có thể được thay bởi một trình tự tín hiệu khác hoặc thậm chí bằng một gốc methionin đơn lẻ, ví dụ để phiên mã *in vitro*, tạo ra trình tự sau:

MCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE (SEQ ID NO: 5) hoặc có thể bao gồm các gốc prolin hoặc prolin-serin giữa methionin đầu tận cùng N và xystein (xem SEQ ID NO: 2). Các trình tự liên quan khác ở lợn có thể được sử dụng.

Biến thể pINF- α có các axit amin tổng hợp được đưa vào một trong số các vị trí

sau đây trên *Sus scrofa domestica* (bằng cách đánh số nó theo trình tự trưởng thành được chỉ ra trong SEQ ID NO: 4): Q102 (SEQ ID NO: 6), E103 (SEQ ID NO: 9), E107 (SEQ ID NO: 12), L112 (SEQ ID NO: 15), và Y136 (SEQ ID NO: 18) (được in đậm và gạch chân ở trên) và cũng được mô tả trên các FIG. 2-4. pINF- α trưởng thành có thể có gốc methionin ở đầu tận cùng N (chẳng hạn, gốc 1 của SEQ ID NO: 5) được tách loại trong khi trưởng thành.

Các axit amin tổng hợp và việc kết hợp chúng được thảo luận ví dụ trong WO2010/011735. Các axit amin tổng hợp có thể được sử dụng ở *Escherichia coli* (*E. coli*) (chẳng hạn, L. Wang, et al., (2001), *Science* 292: 498-500) và *Saccharomyces cerevisiae* có nhân điển hình (*S. cerevisiae*) (chẳng hạn, J. Chin et al., *Science* 301: 964-7 (2003)), cho phép kết hợp các axit amin tổng hợp vào protein *in vivo*.

Trong số năm (5) biến thể thay thế axit amin tổng hợp có hoạt tính sinh học (sự thể pAF ở một trong số năm gốc E103, E107, L112, Y136, hoặc Q102 được gạch chân trong trình tự dưới đây), các biến thể này có thể được cải biến tiếp bằng cách cài xen các axit amin ở đầu tận cùng N của phân tử. Ví dụ, prolin (Pro) hoặc prolin-serin (Pro-Ser) có thể được cài xen giữa Met ở đầu tận cùng N và Cys.

Dạng trưởng thành của các biến thể sẽ không chứa methionin ở đầu tận cùng N.

Phương pháp tạo ra pINF- α polypeptit được liên kết với polyme hòa tan trong nước được mô tả ở đây. “Pegyl hóa” và “được pegyl hóa” được dùng để đề cập đến việc liên kết cộng hóa trị của axit amin tổng hợp đã nêu với phân tử polyetylen glycol (PEG). Phương pháp có thể bao gồm cho pINF- α polypeptit phân lập chứa axit amin tổng hợp tiếp xúc với polyme hòa tan trong nước chứa gốc phản ứng với axit amin tổng hợp.

Phân tử poly(etylen glycol) có thể có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 0,1 kDa đến 100 kDa. Phân tử poly(etylen glycol) có thể có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 0,1 kDa đến 50 kDa, 20 kDa đến 40 kDa, và giá trị số nguyên bất kỳ nằm trong khoảng từ 25 kDa đến 35 kDa. Phân tử poly(etylen glycol) có thể có phân tử lượng khoảng 30 kDa. Phân tử poly(etylen glycol) có thể là phân tử mạch thẳng có phân tử lượng nằm

trong khoảng từ 0,1 kDa đến 50 kDa, 20 kDa đến 40 kDa, và giá trị số nguyên bất kỳ nằm trong khoảng từ 25 kDa đến 35 kDa. Phân tử poly(etylen glycol) có thể là phân tử mạch thẳng có phân tử lượng 30 kDa. Phân tử poly(etylen glycol) có thể có một nhóm aminooxy có khả năng phản ứng với nhóm axetyl trên axit amin tổng hợp. Phân tử poly(etylen glycol) có thể là PEG mạch thẳng được hoạt hóa aminooxy 30 kDa có khả năng tạo liên kết oxim với mạch bên axetyl của para-axetylphenylalanin.

Một pINF- α có PEG mạch thẳng khoảng 30 kDa gắn với gốc pAF.

Biến thể được nêu ở trên và dưới đây có thể được kết hợp tiếp vào chế phẩm với các tá dược, chất ổn định, chất đệm khác nhau, và các hợp phần khác để dùng cho động vật. Việc nhận biết các chế phẩm thích hợp về độ ổn định, việc dùng cho động vật, và hoạt tính không phải là vấn đề đơn giản. Thay vào đó, chế phẩm này phải được làm thích ứng với mỗi hợp chất, cần phải tinh chế hợp chất này, cần có chất ổn định để duy trì hợp chất này, và các hợp phần phối chế khác nhau khác.

Các muối thích hợp để bao hàm trong chế phẩm này bao gồm natri clorua, kali clorua hoặc canxi clorua.

Natri axetat có thể được sử dụng làm chất đệm và/hoặc chất ổn định.

Các chất đệm thích hợp có thể bao gồm đệm phosphat-xitrat, đệm phosphat, đệm xitrat, L-histidin, L-arginine hydroclorua, đệm bicacbonat, đệm suxinat, đệm xitrat, và đệm TRIS, ở dạng một mình hoặc tổ hợp.

Chế phẩm này cũng có thể bao gồm chất chống đông lạnh. Chất chống đông lạnh có thể bao gồm chất chống đông lạnh được chọn từ nhóm gồm hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD), sucraloza, và polyvinylpyrrolidon 4000 (PVP 4000).

Chế phẩm này có thể tùy ý bao gồm chất hoạt động bề mặt. Các chất hoạt động bề mặt thích hợp bao gồm polysorbat (chẳng hạn, polysorbat 80), dodexyl sulfat (SDS), lexitin ở dạng một mình hoặc tổ hợp.

Chế phẩm có thể là chế phẩm chứa nước hoặc ở dạng chế phẩm lỏng được hoàn

nguyên hoặc ở dạng bột. Chế phẩm có thể được bảo quản tiếp trong lọ nhỏ hoặc trong hộp hoặc trong xy-lanh vô trùng được nạp sẵn để dùng ngay cho đối tượng.

Độ pH của chế phẩm có thể nằm trong khoảng từ 4,0 đến 7,0 hoặc 4,5 đến 6,5 khi chế phẩm là ở dạng lỏng.

Nhiễm virus thích hợp có thể được điều trị bao gồm nhưng không giới hạn ở coronavirus, pestivirus (virus cúm lợn hoặc bệnh cúm lợn cổ điển (classical swine fever - CSF)), coronavirus gây viêm dạ dày-ruột có thể truyền nhiễm (transmissible gastroenteritis coronavirus - TGEV), arterivirus ở lợn (PoAV), virus hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus - PRRSV), circovirus ở lợn (porcine circovirus - PCV), virus gây dịch tiêu chảy ở lợn (porcine epidemic diarrhea virus - PEDV), bệnh virus tay chân miệng (foot and mouth disease virus - FMDV), coronavirus ở lợn như deltacoronavirus ở lợn (PDCoV), và virus cúm ở lợn (swine influenza virus - SIV).

Việc dùng biến thể hoặc chế phẩm chứa biến thể có thể là liều đơn hoặc liều đơn được theo sau bởi liều thứ hai 7 đến 21 ngày sau liều thứ nhất, chẳng hạn khoảng 14 ngày sau liều thứ nhất. Động vật được dùng biến thể với lượng biến thể từ khoảng 25 µg/kg đến khoảng 150 µg/kg biến thể trên một kg thể trọng động vật. Khoảng lượng biến thể pINF-α hữu hiệu khác là từ khoảng 50 µg/kg đến khoảng 100 µg/kg thể trọng động vật. Biến thể có thể được dùng trong chế phẩm hoặc dùng như nó vốn có. Biến thể này có thể được dùng một lần ví dụ trước đợt bùng phát dịch. Biến thể cũng có thể được dùng sau khi bùng phát dịch virus cho đàn để ngăn ngừa tổn thất tiếp theo cho đàn. Biến thể hoặc chế phẩm chứa nó có thể được dùng lần thứ hai. Lần sử dụng thứ hai có thể từ khoảng 7 đến khoảng 21 ngày sau lần sử dụng lần thứ nhất, ví dụ 14 ngày sau lần dùng lần thứ nhất. Các lần dùng tiếp theo có thể được dự tính nếu cần để giảm hoặc ngăn ngừa bệnh có liên quan đến sự nhiễm virus.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rõ rằng các cải biến và biến thể khác nhau có thể được tạo ra mà không đi trệch khỏi tinh thần hoặc phạm vi của các chế phẩm, hợp chất, và các phương pháp được bộc lộ ở đây. Do đó, sáng chế dự

định bao hàm cả những phương án cải biến và biến thể đó, miễn là chúng nằm trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ đính kèm và các phương án tương đương của chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Biến thể pAF

Mười một (11) biến thể pAF được tạo ra và được so sánh với pINF- α kiểu dại (wt). Trong số chúng, ba biến thể pINF- α bị dừng không thử nghiệm tiếp do các vấn đề liên quan đến sự biểu hiện/sự sản xuất protein là kém đối với các axit amin tổng hợp được thể ở các điểm khác nhau trong pINF- α .

AXID2820 có plasmit pKG0083 với pINF- α -E107amber và đoạn cài xen prolin-serin ở đầu tận cùng N (Fig. 1). Việc đánh số các gốc đã được chuẩn hóa theo trình tự pINF- α kiểu dại (SEQ ID NO:4). Trình tự axit amin của interferon α -1 kiểu dại ở lợn thu được từ GenBank (số truy cập X57191). Trình tự axit nucleic tương ứng được tổng hợp và được tạo dòng vào vectơ biểu hiện. Codon kết thúc amber (TAG) được cài xen ở codon axit glutamic tương ứng với vị trí axit amin 107 (hoặc các vị trí khác như được chỉ ra) của vùng mã hóa kiểu dại trưởng thành. Các axit nucleic mã hóa Pro-Ser được cài xen ở các đầu tận cùng amino sau codon methionin khởi đầu (AUG). Để xác nhận rằng việc tạo dòng và sinh đột biến tiếp theo có xảy ra như mong đợi mà không tạo ra các đột biến không mong muốn hay không, toàn bộ trình tự ADN plasmit của pKG0083 được lập trình tự.

Tám (8) biến thể pINF- α trong bảng 1 có khả năng biểu hiện protein. Tám biến thể này cũng được pegyl hóa với PEG mạch thẳng được hoạt hóa aminooxy 30 kD. Việc pegyl hóa biến thể được theo sau bởi việc điều chỉnh dung dịch protein (ở nồng độ protein bằng khoảng 20 mg/mL hoặc lớn hơn) đến độ pH 4,0 bằng axit axetic băng 10%. Axetic hydrazit được bổ sung đến nồng độ cuối 100 mM và oxyamino PEG được bổ sung với tỷ lệ phân tử gam nằm trong khoảng 1:1 và 2:1, hoặc lên đến khoảng 8:1, tương ứng với biến thể pINF α . Phản ứng được để tiến hành trong 1-3 ngày ở 28-30°C trong bóng tối. Dập tắt phản ứng bằng cách pha loãng hỗn hợp phản ứng 5 lần bằng dung dịch

natri axetat 30 mM, độ pH 5,0. 8 biến thể đã pegyl hóa này được phân tích bằng cách sử dụng sắc ký loại trừ theo kích thước (size exclusion chromatography - SEC), như được chỉ ra trong bảng 1. Biến thể pINF- α là giống như pINF- α kiểu đại chỉ khác là có sự thể pAF ở gốc được chỉ ra, chẳng hạn, His7 được thể bằng pAF, Arg34 được thể bằng pAF và tương tự. Nồng độ protein được tính bằng mg/mL. “RP” là pha đảo (nghĩa là sắc ký pha đảo, hoặc RP-HPLC).

Bảng 1. Sản xuất biến thể pIFN α được pegyl hóa.

Mẫu	Nồng độ protein (mg/mL)	% đỉnh chính theo RP	% Monome theo SEC
pIFN- α wt SEQ ID NO: 4	1,5	69,4	99,5
pIFN α -H7-PEG30 SEQ ID NO: 21	2,6	67,0	94,7
pIFN α -R34-PEG30 SEQ ID NO: 22	2,2	73,8	99,6
pIFN α -Q102-PEG30 SEQ ID NO: 6	1,9	68,1	97,7
pIFN α -E103-PEG30 SEQ ID NO: 9	2,1	58,2	96,3
pIFN α -E107-PEG30 SEQ ID NO: 12	1,9	60,2	98,2
pIFN α -L112-PEG30 SEQ ID NO: 15	3,4	60,1	98,3
pIFN α -Y136-PEG30 SEQ ID NO: 18	2,1	51,9	99,1
pIFN α -H40-PEG30 SEQ ID NO: 23	1,9	52,1	98,7

SEC được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống HPLC có khả năng phát hiện ở nhiều bước sóng (Agilent 1100 hoặc 1200, hoặc hệ thống tương đương). Pha động là kali phosphat 200 mM, kali clorua 250 mM, độ pH 6,0, 10% isopropanol (IPA).

8 biến thể này được đánh giá trong thử nghiệm hoạt tính sinh học *in vitro*. Kit thử

nghiệm interferon sẵn có trên thị trường *iLite™* huIFN α do Pestka Biomedical Laboratories, Inc. (Piscataway, NJ, USA) cung cấp được sử dụng để đánh giá hoạt tính sinh học của pIFN- α . Số lần giảm hoạt tính của biến thể PEG được tính toán so với protein Ambrx WT như sau:

$$\text{Số lần giảm hoạt tính biến thể PEG} = \frac{\text{EC50 biến thể PEG}}{\text{EC50 Ambrx WT}}$$

Như được chỉ ra trong bảng 2, trong số tám biến thể được thử nghiệm, ba biến thể pINF- α có hoạt tính về cơ bản kém hơn pINF- α kiểu đại chưa được pegyl hóa:

Bảng 2.

Thứ tự xếp hạng	Mẫu thử nghiệm	Số lần giảm về hoạt tính so với WT pIFN α	EC50 [ng/mL] của Mẫu thử nghiệm	EC50 [ng/mL] của Ambrx WT pIFN α
1	pIFN α E103-PEG30K	8x	184	22
2	pIFN α L112-PEG30K	15x	475	32
3	pIFN α E107-PEG30K	23x	731	32
4	pIFN α Y136-PEG30K	26x	874	33
5	pIFN α Q102-PEG30K	32x	693	22
6	pIFN α H40-PEG30K	171x	5662	33
7	pIFN α H7-PEG30K	387x	8761	23
Không có hoạt tính	pIFN α R34-PEG30K	Không có hoạt tính	Không có hoạt tính	23

Mẫu đối chứng pIFN- α kiểu đại không chứa peptit tín hiệu, không được cài xen các axit amin (Methionin, prolin hoặc Serin) ở đầu tận cùng N, không có sự thể pAF đối với axit amin bất kỳ, và không được pegyl hóa (SEQ ID NO: 4).

Kết quả của các thí nghiệm này, biến thể pIFN- α đã được pegyl hóa có sự thể

pAF ở H40 (SEQ ID NO: 23), H7 (SEQ ID NO: 21), và R34 (SEQ ID NO: 22) dường như không phải biến thể pIFN- α hữu hiệu để điều trị nhiễm virus ở lợn, do hoạt tính của chúng thấp so với kiểu đại trong thử nghiệm *iLite*TM huIFN α .

Phân tích RP-HPLC đối với cả biến thể đã được pegyl hóa và biến thể chưa được pegyl hóa bằng cách sử dụng pha động A (0,05% TFA / nước) và pha động B (0,05% TFA / ACN).

Ví dụ 2: Thử nghiệm *in vivo*

Mười tám chuột cống Sprague Dawley (n=3 nhóm) được cho dùng liều ở 0,2 mg/kg mỗi mẫu trong 6 mẫu thử nghiệm (được tái tạo huyền phù trong 20 mM natri axetat, pH 5,0, 100 mM NaCl, và 5% glyxerol) dưới da ở phần gáy của cổ của chúng, ở xa ống thông: (1) pIFN α -E103-PEG30K (SEQ ID NO: 9 đã được pegyl hóa) (2) pIFN α -L112-PEG30K (SEQ ID NO: 15 đã được pegyl hóa), (3) pIFN α -E107-PEG30K (SEQ ID NO: 12 đã được pegyl hóa), (4) pIFN α -Y136-PEG30K (SEQ ID NO: 18 đã được pegyl hóa), và (5) pIFN α -a-Q102-PEG30K (SEQ ID NO: 6 đã được pegyl hóa).

Biến thể pIFN- α được hòa tan trong 20 mM natri axetat ở độ pH 5,0, 100 mM NaCl và 5% glyxerol. Mỗi động vật được tiêm dưới da (nghĩa là, trong gáy) bằng một trong số 5 biến thể hoặc pIFN- α kiểu đại (tương tự như các biến thể được sử dụng trong ví dụ 1), vì vậy tạo thành 6 nhóm thử nghiệm gồm 3 con chuột cống mỗi nhóm.

Thời điểm lấy mẫu là: trước khi dùng liều và sau khi dùng liều ở 1 giờ, 6 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 144 giờ, 192 giờ, và 240 giờ sau khi dùng liều. Mẫu máu được thu nhận qua một ống thông tĩnh mạch cổ hoặc tĩnh mạch đuôi bên hoặc ở thời điểm kết thúc thí nghiệm bằng cách châm qua tim và được xử lý bằng cách để máu đông và loại bỏ huyết tương thu được. Nồng độ của mỗi biến thể pIFN- α được pegyl hóa được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm gắn kết phối tử có sử dụng kháng thể bắt giữ đơn dòng kháng PEG và kháng thể phát hiện đa dòng ở dê kháng IFN- α lợn. AUC_{last}, C_{max}, T_{max} được tính toán bằng cách phân tích dữ liệu thô thu được có sử dụng phần mềm mô hình hóa WINNONLIN® PK (Pharsight Corporation, nay là Certara USA, Inc.). Sự

phơi sáng (AUC_{last}) của biến thể đã được pegyl hóa được chia cho sự phơi sáng của pIFN kiểu đại (WT pIFN) để thu được chênh lệch theo số lần. Kết quả đối với các biến thể đã được pegyl hóa là như sau trong bảng 3:

Bảng 3. Sinh khả dụng của biến thể IFN- α đã được pegyl hóa.

Hợp chất	Động vật #	AUC_{last}	Chênh lệch theo số lần so với pIFN kiểu đại	Nồng độ tối đa C_{max}	T_{max}	$T_{1/2}$ ước tính
		(ng*h/mL)		(ng/mL)		
PEG Q102 pIFN α	Trung bình	12500	133	339	24	16,3
	SD	686		14,4	0	2,10
PEG E107 pIFN α	Trung bình	9420	100	246	24	17,6
	SD	2590		77,6	0	3,93
PEG L112 pIFN α	Trung bình	6000	64	165	24	12,7
	SD	510		15,6	0	1,11
PEG E103 pIFN α	Trung bình	5210	55	147	18	11,7
	SD	365		12,5	10,4	0,479
PEG Y136 pIFN α	Trung bình	5140	55	141	24	12,4
	SD	788		23,2	0	0,987
WT pIFN α SEQ ID NO: 4	Trung bình	94,2	1	81	1	NC
	SD	49,3		49,9	0	NC

“DN” là “liều được chuẩn hóa”; đơn vị đối với DN AUC_{last} là (ng*h/mL)/(mg/kg) và đối với DN C_{max} là (ng/mL)/(mg/kg). C_{max} được dùng để tính toán chu kỳ bán hủy. Tuy nhiên, biến thể pIFN- α đã được pegyl hóa E107 có chu kỳ bán hủy cao nhất trong số năm (5) biến thể này. “NC” có nghĩa là “không tính toán được” do các nồng độ có thể đo được chỉ ở hai thời điểm.

Rõ ràng là, sự phơi sáng (liên quan tới AUC_{last}) là cao nhất đối với PEG30K-Q102 và PEG30K-E107, và như được thể hiện trong bảng theo thứ tự phơi sáng giảm dần. Tất cả năm biến thể pIFN- α được thử nghiệm có độ phơi sáng đối với pIFN- α lớn hơn dạng pIFN- α kiểu đại (SEQ ID NO: 4). T_{max} thường được quan sát ở 24 giờ sau

dùng liều đối với biến thể pIFN- α đã được pegyl hóa so với 1 giờ sau khi dùng liều đối với pIFN- α kiểu dại. Đối với thí nghiệm này, $C_{\max}$ được dùng để tính toán chu kỳ bán hủy do các điểm dữ liệu không đủ ở pha kết thúc. Do thời gian tại $C_{\max}$ không đại diện cho pha loại trừ thực, chu kỳ bán hủy ước tính cần được xem như là giá trị xấp xỉ.

Cần lưu ý rằng sự khác nhau về loài không ảnh hưởng đến kiểu nghiên cứu này.

Ví dụ 3: Mô tả đặc trưng sự nhiễm tạp về mặt sản phẩm đối với pIFN α -E107pAF

Dựa trên phổ khối (mass spectroscopy - MS) của pIFN- α A-E107 (SEQ ID NO: 12), có các dạng axetyl hóa, dạng 58 Da và các tạp chất oxy hóa. Biến thể trở nên được axetyl hóa trong quá trình tổng hợp bên trong chủng sản xuất E. coli. Vì vậy, một phương án lựa chọn để sản xuất pIFN- α A-E107 là bổ sung axetyltransferaza ở thời điểm thích hợp trong quá trình sản xuất hoặc sử dụng loại bỏ ribosom-protein-alanin axetyltransferaza (RimJ) (axetyltransferaza ở đầu tận cùng N). Ngoài ra, sắc ký quy mô nhỏ và lớn có thể được sử dụng để tinh chế. Theo cách khác và như được chỉ ra ở đây, trình tự đầu tận cùng N có thể được cải biến tiếp để ngăn ngừa sự axetyl hóa xảy ra hoàn toàn ở biến thể.

Đối với phương tiện sắc ký, một phương pháp là sử dụng CAPTO Adhere Impres (GE Healthcare Lifesciences), mà là phương tiện sắc ký BIOPROCESS đa phương thức trao đổi ion mạnh (nhựa). Phương pháp này được sử dụng với pha động gồm 25 mM amoni axetat (ở độ pH 6,5), nạp biến thể pIFN- α chưa được cải biến (nghĩa là chưa được pegyl hóa) vào ở nồng độ 1-5 mg/mL nhựa. Cột được rửa bằng 5 lần thể tích cột (CV) amoni axetat 25 mM ở độ pH 6,5. Rửa giải biến thể pIFN- α A với gradient tuyến tính đến 100% dung dịch đệm rửa giải (axit axetic 5 mM), và 0-100%B trên 40 CV, nhờ đó các đỉnh pIFN- α đã oxy hóa được loại bỏ. Đỉnh 1 có pIFN- α không bị axetyl hóa xystein ở đầu tận cùng N, trong khi đỉnh 2 chứa dạng được axetyl hóa (+42 Da), dạng +58 Da, dạng +58+1 Ox (có thể là các loại chỉ được oxy hóa một lần và được axetyl hóa), và dạng +58Da+2 Ox (có thể là dạng được axetyl hóa với ít nhất hai lần oxy hóa).

Do các kết quả này, prolin được cài xen ở các đầu tận cùng amino của pIFN- α để

ngăn ngừa các dạng axetyl hóa. Vì vậy, Pro-pIFN α -E107pAF (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 13) được tạo ra. Để làm rõ, việc đánh số các vị trí axit amin thường bắt đầu với xystein đầu tận cùng N (C1). Prolin được bổ sung vào trở thành gốc -1, và methionin đầu tận cùng N (nếu có) trở thành gốc -2. Sự cài xen Pro-Ser cũng có thể được thực hiện, trong đó peptit chứa serin ở vị trí -1, prolin ở vị trí -2, và có thể là một methionin ở vị trí -3 so với xystein đầu tận cùng N. Việc bổ sung prolin giúp loại bỏ các đỉnh khác được nhận thấy đối với các biến thể đã biết trước đây khi được phân tích bằng phương pháp khối phổ.

Trong bảng 4 dưới đây, Pro-pIFN α -E107pAF có prolin ở đầu tận cùng N và sự thể pAF trên E107. Hoạt tính của biến thể Pro-pIFN α -E107pAF được so sánh với hoạt tính của biến thể không có sự bổ sung prolin ở đầu tận cùng N, pIFN α -E107pAF. Biến thể có prolin được bổ sung có ít biến thể được axetyl hóa và oxy hóa hơn. Lưu ý các biến thể này không được pegyl hóa và chúng không bao hàm trình tự tín hiệu methionin.

Bảng 4.

	Pro-pIFN α -E107pAF EC50, ng/mL	pIFN α -E107pAF EC50, ng/mL
Lần chạy 1	6,46	8,08
Lần chạy 2	4,55	7,01

Ví dụ 4: Các biến thể khác ở đầu tận cùng N

Căn cứ vào thành công với việc bổ sung prolin vào đầu tận cùng N của pIFN α -E107pAF, các biến thể khác ở đầu tận cùng N cũng được đánh giá bao gồm bổ sung serin (Ser, S), bổ sung Pro-Ser (PS), bổ sung His (H), và bổ sung Ser-Gly (SG) vào pIFN α -E107pAF. Các biến thể khác ở đầu tận cùng N này không được pegyl hóa. Sau đó, hoạt tính của các biến thể khác ở đầu tận cùng N (đều là biến thể E107-pAF) được đánh giá trong thử nghiệm sinh học *in vitro* bằng cách sử dụng kit *iLite*TM huIFN α do Pestka Biomedical Laboratories được mô tả ở trên cung cấp và kết quả được trình bày

trong bảng 5.

Bảng 5.

Đột biến	EC50 (ng/mL)
Pro-pINF α SEQ ID NO: 13	18,3
S (-1) pINF α SEQ ID NO: 24	34,2
SG (-2/-1) pINF α SEQ ID NO: 25	69,1
PS (-2/-1) pINF α SEQ ID NO: 14	28,7
H (-1) pINF α SEQ ID NO: 26	25,4

Pro-pINF α là biến thể có prolin được bổ sung ở các đầu tận cùng amino giữa methionin (trong peptit chưa trưởng thành) và xystein.

Ví dụ 5: Sự liên hợp của biến thể pINF- α với PEG

Biến thể pINF α -PS-E107 (SEQ ID NO: 14) thu được từ phần gom sắc ký Capto sau khi sử dụng sắc ký Capto theo hướng dẫn của nhà sản xuất và 0,2 M glyxin được bổ sung vào dạng tinh chế này. Độ pH của hỗn hợp được điều chỉnh đến 4,0 bằng axit axetic. Tiếp theo, biến thể pINF- α được cô đặc đến 8,2 mg/mL bằng cách sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khi đã cô đặc, PEG mạch thẳng 30K (PEG có thể được mua trên thị trường từ NOF America Corporation hoặc EMD Merck chẳng hạn) được bổ sung ở tỷ lệ phân tử gam pEG : biến thể pINF α là 8:1. Tiếp theo, hỗn hợp PEG / biến thể pINF- α được ủ ở 28°C trong khoảng 18 giờ. Phương pháp này tạo ra >95% biến thể pINF- α đã được liên hợp với PEG sau 18 giờ ủ.

Tiếp theo, biến thể đã được pegyl hóa (pINF α -PS-E107-PEG30K) có thể được tinh chế như sau. Cột SP650S Tosoh 143 mL có thể được sử dụng để tinh chế biến thể

đã pegyl hóa bằng cách sử dụng pha động gồm:

A: 30 mM natri axetat, pH 5,0

B: 30 mM natri axetat, 5% etylen glycol, pH 5,0

0 đến 100% B trên 20 thể tích cột.

Ví dụ 6: Thử nghiệm so sánh các biến thể khác nhau ở đầu tận cùng N

Thử nghiệm hoạt tính được thực hiện đối với một số biến thể ở cả các dạng đã được pegyl hóa (PEG mạch thẳng 30 KDa) và chưa được pegyl hóa để đánh giá ảnh hưởng của sự pegyl hóa đến biến thể có pAF được thể ở E107 và có prolin-serin ở các đầu tận cùng amino (SEQ ID NO: 14). Kết quả được đưa ra dưới đây trong bảng 6. Các giá trị nồng độ protein, SEC, RP, và EC50 được xác định như đã thảo luận trên đây. pIFN α -P-E107-pAF được dùng làm mẫu so sánh để phản ánh kết quả đối với protein không mở rộng đầu tận cùng amino.

Bảng 6.

Mẫu	Nồng độ protein (mg/mL)	SEC% Monome	RP% đỉnh chính	EC50 (ng/mL)
pIFN α -PS-E107-pAF	8,2	99,8	84,8	5,96
pIFN α -PS-E107-30KPEG	7,3	99,0	98,2	409,7
pIFN α -P-E107-pAF				4,27
pIFN α -P-E107-30KPEG	3,3	99,3	99,7	641,2

Trong khi kiểm tra đặc tính của biến thể, nhận thấy là norleucine đã bị kết hợp không đúng. Norleucine được biết là bị kết hợp không đúng ở axit amin methionin khi lên men ở mật độ cao bằng *E. coli*. Điều này được quan sát khi quá trình lên men được thực hiện. Sự kết hợp norleucine được giảm bằng cách sử dụng một hoặc nhiều bước sau đây: nạp dung dịch với methionin, lên men với môi trường phức hợp so với môi trường

đã xác định (môi trường phức hợp có một hoặc nhiều hợp phần không xác định trong đó bao gồm nhưng không giới hạn ở glyxerol, muối, axit amin, vitamin, dịch chiết nấm men, dịch thủy phân thực vật và động vật, pepton, và trypton), và/hoặc làm giảm nhiệt độ của hỗn hợp phản ứng sau cảm ứng. L-methionin được bổ sung vào môi trường theo mẻ ở nồng độ 1,2 mM cũng như được nạp liên tục qua dung dịch nạp chứa 20 mM L-methionin.

Biến thể pINF- α chịu sự kiểm soát của gen khởi đầu T7. Việc bổ sung arabinosa (chất cảm ứng) vào quá trình lên men dẫn đến dòng thác mà cho phép sản sinh ra biến thể. Vì vậy, sau cảm ứng có nghĩa là sau khi chất cảm ứng, trong trường hợp này là arabinosa, được thêm vào.

Ví dụ 7: Ảnh hưởng của việc làm tan giá lạnh đông đến các biến thể đã được pegyl hóa và chưa được pegyl hóa

Các mẫu được làm lạnh đông và tan giá theo năm chu trình bằng cách làm tan giá ở 0°C trong các ống nghiệm 1,5 mL và làm tan giá trong bể nước ở nhiệt độ trong phòng. Không quan sát thấy ảnh hưởng đáng kể đối với biên dạng protein phân tử lượng cao (HMW) so với năm chu trình tan giá lạnh như chứng tỏ trong bảng 7 dưới đây:

Bảng 7.

	pINF α -PS-E107pAF		pINF α -PS-E107-30KPEG	
Chu trình lạnh đông/tan giá	% đỉnh chính	%HMW	% đỉnh chính	% HMW
0	99,8	0,2	99,0	0,7
1	99,8	0,2	99,0	0,8
3	99,8	0,2	99,0	0,9
5	99,8	0,2	99,0	0,9

Bảng 7 mô tả sự khác nhau giữa các biến thể đã được pegyl hóa và chưa được pegyl hóa có prolin-serin ở đầu tận cùng N cũng như pAF được thế ở E107, trong đó biến thể này

có sự cài xen prolin-serin ở các đầu tận cùng amino (pIFN α -PS-E107-30), nghĩa là ở các gốc -2 và -1.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể interferon- α (pINF- α) ở lợn chứa:

X_aX_bCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKA
QAMALVHEMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGGLDQQLRDLEACVMQE
AGLEGTPILLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNL
QDRLRKKE (SEQ ID NO: 1), trong đó gốc E103, E107, L112, Y136, hoặc Q102 (đánh
số đối với SEQ ID NO: 4) được thế bằng axit amin tổng hợp; và

trong đó X_aX_b không phải là các axit amin, Prolin duy nhất hoặc Prolin-Serin.

2. Biến thể pINF- α theo điểm 1, trong đó axit amin tổng hợp là para-axetyl-phenylalanin (pAF).

3. Biến thể pINF- α theo điểm 1, trong đó biến thể này là SEQ ID NO: 7.

4. Biến thể pINF- α theo điểm 1, trong đó biến thể này là SEQ ID NO: 10.

5. Biến thể pINF- α theo điểm 1, trong đó biến thể này là SEQ ID NO: 13.

6. Biến thể pINF- α theo điểm 1, trong đó biến thể này là SEQ ID NO: 16.

7. Biến thể pINF- α theo điểm 1, trong đó biến thể này là SEQ ID NO: 19.

8. Biến thể pINF- α theo điểm 1, trong đó biến thể này là SEQ ID NO: 8.

9. Biến thể pINF- α theo điểm 1, trong đó biến thể này là SEQ ID NO: 11.

10. Biến thể pINF- α theo điểm 1, trong đó biến thể này là SEQ ID NO: 14.

11. Biến thể pINF- α theo điểm 1, trong đó biến thể này là SEQ ID NO: 17.

12. Biến thể pINF- α theo điểm 1, trong đó biến thể này là SEQ ID NO: 20.

13. Biến thể pINF- α theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó axit amin tổng hợp được pegyl hóa.

14. Biến thể pINF- α theo điểm 13, trong đó biến thể pINF- α đã được pegyl hóa được pegyl hóa với PEG từ khoảng 5 kDa đến 40 kDa.

15. Biến thể pINF- α theo điểm 14, trong đó PEG là PEG 30 kDa.

16. Biến thể interferon- α ở lợn (pINF- α) chứa:

PSCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRI SPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQ
AMALVHEMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEA
GL-pAF-

GTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRL
RKKE (SEQ ID NO: 14), trong đó gốc tương ứng với E107 (đánh số đối với SEQ ID
NO: 4) được thế bằng para-axetyl-phenylalanin (pAF) và gốc pAF đã nêu được pegyl
hóa với PEG mạch thẳng 30 kDa.

17. Chế phẩm chứa biến thể pINF- α theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, chứa 20 mM natri axetat, 100 mM natri clorua, 5% glyxerol ở độ pH 5,0 và có độ chuẩn biến thể pINF- α nằm trong khoảng từ khoảng 2,0 đến khoảng 6,0 g/L.

18. Phương pháp điều chế biến thể pINF- α theo điểm 1 bao gồm các bước:

(a) tinh chế pINF- α ;

(b) hòa tan biến thể pINF- α đã tinh chế trong 50 mM Tris, 6M guanidin ở độ pH 8;

(c) ủ biến thể pINF- α đã được hòa tan ở nhiệt độ trong phòng trong 16-24 giờ trong 20 mM Tris, 1M arginin, 10 mM methionin (met), 1 mM EDTA ở độ pH 8,0;

(d) loại bỏ biến thể đã được axetyl hóa còn lại;

(e) cho biến thể pINF- α liên hợp với PEG ở tỷ lệ giữa PEG và protein nằm trong khoảng 1:1 đến 1:2; và

(f) tinh chế biến thể pINF- α đã được pegyl hóa.

19. Lộ đa liều chứa chế phẩm theo điểm 17.

Danh mục trình tự

- <110> Eli Lilly and Company
Ambrx Inc.
- <120> BIẾN THỂ INTERFERON ALPHA Ở LỢN, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHỨNG VÀ
LỢ ĐA LIỀU CHỨA CHỨNG
- <130> 204257-0028-00-WO-561478
- <150> 62/352,163
<151> 2016-06-20
- <160> 26
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 168
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
- <220>
<223> Polypeptit tổng hợp
- <220>
<221> dấu hiệu hỗn tạp
<222> (1)..(1)
<223> Xa là Pro hoặc không có mặt
- <220>
<221> dấu hiệu hỗn tạp
<222> (2)..(2)
<223> Xb là Pro, Ser hoặc không có mặt, trong đó khi Xb không có mặt,
Xa không có mặt, khi Xb là Pro, Xa không có mặt, và khi Xb là
Ser, Xa là Pro
- <220>
<221> dấu hiệu hỗn tạp
<222> (104)..(104)
<223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp
- <220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (105)..(105)
<223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp
- <220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (109)..(109)
<223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (114)..(114)
 <223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (138)..(138)
 <223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp

<400> 1

Xaa Xaa Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala
 1 5 10 15

Leu Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu
 20 25 30

Asp His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn
 35 40 45

Gln Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln
 50 55 60

Gln Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn
 65 70 75 80

Glu Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg
 85 90 95

Asp Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Glu Gly Thr Pro
 100 105 110

Leu Leu Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg
 115 120 125

Leu Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu
 130 135 140

Ile Val Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn Leu
 145 150 155 160

Gln Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
165

<210> 2
<211> 169
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit tổng hợp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (1)..(1)
<223> có thể được loại bỏ trong polypeptit trưởng thành

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (2)..(2)
<223> Xa là Pro hoặc không có mặt

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (3)..(3)
<223> Xb là Pro, Ser hoặc không có mặt, trong đó khi Xb không có mặt, Xa không có mặt, khi Xb là Pro, Xa không có mặt, và khi Xb là Ser, Xa là Pro

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (105)..(105)
<223> có thể được thế bằng axit amin tổng hợp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (106)..(106)
<223> có thể được thế bằng axit amin tổng hợp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (110)..(110)
<223> có thể được thế bằng axit amin tổng hợp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (115)..(115)
<223> có thể được thế bằng axit amin tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (139)..(139)

<223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp

<400> 2

Met Xaa Xaa Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg
1 5 10 15

Ala Leu Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys
20 25 30

Leu Asp His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly
35 40 45

Asn Gln Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu
50 55 60

Gln Gln Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp
65 70 75 80

Asn Glu Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu
85 90 95

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

Pro Leu Leu Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His
115 120 125

Arg Leu Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp
130 135 140

Glu Ile Val Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn
145 150 155 160

Leu Gln Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
165

<210> 3

<211> 189

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<220>

<221> mat_peptit

<222> (24)..(189)

<400> 3

Met Ala Pro Thr Ser Ala Phe Leu Thr Ala Leu Val Leu Leu Ser Cys
 -20 -15 -10

Asn Ala Ile Cys Ser Leu Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
 -5 -1 1 5

Ala His Thr Arg Ala Leu Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
 10 15 20 25

Pro Phe Ser Cys Leu Asp His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu
 30 35 40

Ala Phe Gly Gly Asn Gln Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val
 45 50 55

His Glu Met Leu Gln Gln Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser
 60 65 70

Ala Ala Ala Trp Asn Glu Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu
 75 80 85

Asp Gln Gln Leu Arg Asp Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly
 90 95 100 105

Leu Glu Gly Thr Pro Leu Leu Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg
 110 115 120

Lys Tyr Phe His Arg Leu Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser
 125 130 135

Pro Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser
 140 145 150

Ser Ser Arg Asn Leu Gln Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
 155 160 165

<210> 4
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (102)..(102)
 <223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (103)..(103)
 <223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (107)..(107)
 <223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (112)..(112)
 <223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (136)..(136)
 <223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp

<400> 4

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala Leu Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Asp His
 20 25 30

Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn Gln Val
 35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln Gln Thr

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

<210> 5
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (1)..(1)
 <223> có thể được loại bỏ trong polypeptit trưởng thành

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (103)..(103)
 <223> có thể được thế bằng axit amin tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (104)..(104)
 <223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (108)..(108)
 <223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (113)..(113)
 <223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (137)..(137)
 <223> có thể được thể bằng axit amin tổng hợp

<400> 5

Met	Cys	Asp	Leu	Pro	Gln	Thr	His	Ser	Leu	Ala	His	Thr	Arg	Ala	Leu
1				5					10					15	

Arg	Leu	Leu	Ala	Gln	Met	Arg	Arg	Ile	Ser	Pro	Phe	Ser	Cys	Leu	Asp
			20					25					30		

His	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Ser	Pro	His	Glu	Ala	Phe	Gly	Gly	Asn	Gln
			35				40					45			

Val	Gln	Lys	Ala	Gln	Ala	Met	Ala	Leu	Val	His	Glu	Met	Leu	Gln	Gln
			50			55					60				

Thr	Phe	Gln	Leu	Phe	Ser	Thr	Glu	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Trp	Asn	Glu
65					70					75					80

Ser	Leu	Leu	His	Gln	Phe	Tyr	Thr	Gly	Leu	Asp	Gln	Gln	Leu	Arg	Asp
				85					90					95	

Leu	Glu	Ala	Cys	Val	Met	Gln	Glu	Ala	Gly	Leu	Glu	Gly	Thr	Pro	Leu
			100					105					110		

Leu	Glu	Glu	Asp	Ser	Ile	Arg	Ala	Val	Arg	Lys	Tyr	Phe	His	Arg	Leu
			115				120					125			

Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile
130 135 140

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

Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
165

<210> 6
<211> 166
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit tổng hợp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (102)..(102)
<223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 6

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala Leu Arg
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Asp His
20 25 30

Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn Gln Val
35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln Gln Thr
50 55 60

Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn Glu Ser
65 70 75 80

Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg Asp Leu
85 90 95

Glu Ala Cys Val Met Xaa Glu Ala Gly Leu Glu Gly Thr Pro Leu Leu
 100 105 110

Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Leu Thr
 115 120 125

Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile Val
 130 135 140

Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn Leu Gln Asp
 145 150 155 160

Arg Leu Arg Lys Lys Glu
 165

<210> 7
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẬP
 <222> (103)..(103)
 <223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 7

Pro Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala Leu
 1 5 10 15

Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Asp
 20 25 30

His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn Gln
 35 40 45

Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln Gln
 50 55 60

Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn Glu
65 70 75 80

Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg Asp
85 90 95

Leu Glu Ala Cys Val Met Xaa Glu Ala Gly Leu Glu Gly Thr Pro Leu
100 105 110

Leu Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Leu
115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile
130 135 140

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

Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
165

<210> 8
<211> 168
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit tổng hợp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (104)..(104)
<223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 8

Pro Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala
1 5 10 15

Leu Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu
20 25 30

Asp His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn
 35 40 45

Gln Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln
 50 55 60

Gln Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn
 65 70 75 80

Glu Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg
 85 90 95

Asp Leu Glu Ala Cys Val Met Xaa Glu Ala Gly Leu Glu Gly Thr Pro
 100 105 110

Leu Leu Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg
 115 120 125

Leu Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu
 130 135 140

Ile Val Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn Leu
 145 150 155 160

Gln Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
 165

<210> 9
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (103)..(103)
 <223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 9

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

<210> 10
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (104)..(104)

<223> para-acetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 10

Pro Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala Leu
 1 5 10 15

Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Asp
 20 25 30

His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn Gln
 35 40 45

Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln Gln
 50 55 60

Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn Glu
 65 70 75 80

Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg Asp
 85 90 95

Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Xaa Ala Gly Leu Glu Gly Thr Pro Leu
 100 105 110

Leu Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Leu
 115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile
 130 135 140

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

Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
 165

<210> 11
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (105)..(105)
 <223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 11

Pro Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala
 1 5 10 15

Leu Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu
 20 25 30

Asp His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn
 35 40 45

Gln Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln
 50 55 60

Gln Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn
 65 70 75 80

Glu Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg
 85 90 95

Asp Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Xaa Ala Gly Leu Glu Gly Thr Pro
 100 105 110

Leu Leu Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg
 115 120 125

Leu Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu
 130 135 140

Ile Val Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn Leu
 145 150 155 160

Gln Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
 165

<210> 12
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (107)..(107)
 <223> para-acetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 12

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala Leu Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Asp His
 20 25 30

Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn Gln Val
 35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln Gln Thr
 50 55 60

Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn Glu Ser
 65 70 75 80

Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg Asp Leu
 85 90 95

Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Xaa Gly Thr Pro Leu Leu
 100 105 110

Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Leu Thr
 115 120 125

Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile Val
 130 135 140

Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn Leu Gln Asp
 145 150 155 160

Arg Leu Arg Lys Lys Glu
 165

<210> 13
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (108)..(108)
 <223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 13

Pro Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala Leu
 1 5 10 15

Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Asp
 20 25 30

His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn Gln
 35 40 45

Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln Gln
 50 55 60

Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn Glu
 65 70 75 80

Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg Asp
85 90 95

Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Xaa Gly Thr Pro Leu
100 105 110

Leu Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Leu
115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile
130 135 140

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

Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
165

<210> 14
<211> 168
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit tổng hợp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẬP
<222> (109)..(109)
<223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 14

Pro Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala
1 5 10 15

Leu Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu
20 25 30

Asp His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn
35 40 45

Gln Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln
50 55 60

Gln Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn
65 70 75 80

Glu Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg
85 90 95

Asp Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Xaa Gly Thr Pro
100 105 110

Leu Leu Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg
115 120 125

Leu Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu
130 135 140

Ile Val Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn Leu
145 150 155 160

Gln Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
165

<210> 15
<211> 166
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit tổng hợp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẬP
<222> (112)..(112)
<223> para-acetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 15

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala Leu Arg
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Asp His
20 25 30

Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn Gln Val
35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln Gln Thr
50 55 60

Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn Glu Ser
65 70 75 80

Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg Asp Leu
85 90 95

Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Glu Gly Thr Pro Leu Xaa
100 105 110

Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Leu Thr
115 120 125

Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile Val
130 135 140

Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn Leu Gln Asp
145 150 155 160

Arg Leu Arg Lys Lys Glu
165

<210> 16
<211> 167
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit tổng hợp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (113)..(113)

<223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 16

Pro Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala Leu
1 5 10 15

Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Asp
20 25 30

His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn Gln
35 40 45

Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln Gln
50 55 60

Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn Glu
65 70 75 80

Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg Asp
85 90 95

Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Glu Gly Thr Pro Leu
100 105 110

Xaa Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Leu
115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile
130 135 140

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

Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
165

<210> 17

<211> 168

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (114)..(114)

<223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 17

Pro Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala
 1 5 10 15

Leu Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu
 20 25 30

Asp His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn
 35 40 45

Gln Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln
 50 55 60

Gln Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn
 65 70 75 80

Glu Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg
 85 90 95

Asp Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Glu Gly Thr Pro
 100 105 110

Leu Xaa Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg
 115 120 125

Leu Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu
 130 135 140

Ile Val Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn Leu
 145 150 155 160

Gln Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
165

<210> 18
<211> 166
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit tổng hợp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (136)..(136)
<223> para-acetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 18

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala Leu Arg
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Asp His
20 25 30

Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn Gln Val
35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln Gln Thr
50 55 60

Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn Glu Ser
65 70 75 80

Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg Asp Leu
85 90 95

Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Glu Gly Thr Pro Leu Leu
100 105 110

Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Leu Thr
115 120 125

Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Xaa Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile Val
 130 135 140

Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn Leu Gln Asp
 145 150 155 160

Arg Leu Arg Lys Lys Glu
 165

<210> 19
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẬP
 <222> (137)..(137)
 <223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 19

Pro Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala Leu
 1 5 10 15

Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Asp
 20 25 30

His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn Gln
 35 40 45

Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln Gln
 50 55 60

Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn Glu
 65 70 75 80

Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg Asp
 85 90 95

Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Glu Gly Thr Pro Leu
 100 105 110

Leu Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Leu
 115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Xaa Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile
 130 135 140

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

Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
 165

<210> 20
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẬP
 <222> (138)..(138)
 <223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 20

Pro Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala
 1 5 10 15

Leu Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu
 20 25 30

Asp His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn
 35 40 45

Gln Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln
 50 55 60

Gln Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn
65 70 75 80

Glu Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg
85 90 95

Asp Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Glu Gly Thr Pro
100 105 110

Leu Leu Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg
115 120 125

Leu Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Xaa Ser Pro Cys Ala Trp Glu
130 135 140

Ile Val Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn Leu
145 150 155 160

Gln Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
165

<210> 21
<211> 166
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit tổng hợp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (7)..(7)
<223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 21

Cys Asp Leu Pro Gln Thr Xaa Ser Leu Ala His Thr Arg Ala Leu Arg
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Asp His
20 25 30

Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn Gln Val
 35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln Gln Thr
 50 55 60

Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn Glu Ser
 65 70 75 80

Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg Asp Leu
 85 90 95

Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Glu Gly Thr Pro Leu Leu
 100 105 110

Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Leu Thr
 115 120 125

Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile Val
 130 135 140

Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn Leu Gln Asp
 145 150 155 160

Arg Leu Arg Lys Lys Glu
 165

<210> 22
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (34) .. (34)
 <223> para-acetyl-phenylalanin (pAF)
 <400> 22

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

<210> 23
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (40)..(40)

<223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 23

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala Leu Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Asp His
 20 25 30

Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro Xaa Glu Ala Phe Gly Gly Asn Gln Val
 35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln Gln Thr
 50 55 60

Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn Glu Ser
 65 70 75 80

Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg Asp Leu
 85 90 95

Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Glu Gly Thr Pro Leu Leu
 100 105 110

Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Leu Thr
 115 120 125

Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile Val
 130 135 140

Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn Leu Gln Asp
 145 150 155 160

Arg Leu Arg Lys Lys Glu
 165

<210> 24
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (108)..(108)
 <223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 24

Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala Leu
 1 5 10 15

Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Asp
 20 25 30

His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn Gln
 35 40 45

Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln Gln
 50 55 60

Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn Glu
 65 70 75 80

Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg Asp
 85 90 95

Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Xaa Gly Thr Pro Leu
 100 105 110

Leu Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Leu
 115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile
 130 135 140

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

Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
 165

<210> 25
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (109)..(109)
 <223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 25

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

Leu Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu
 20 25 30

Asp His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn
 35 40 45

Gln Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln
 50 55 60

Gln Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn
 65 70 75 80

Glu Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg
 85 90 95

Asp Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Xaa Gly Thr Pro
 100 105 110

Leu Leu Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg
 115 120 125

Leu Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu
 130 135 140

Ile Val Arg Ala Glu Val Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn Leu
 145 150 155 160

Gln Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
 165

<210> 26
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẬP
 <222> (108)..(108)
 <223> para-axetyl-phenylalanin (pAF)

<400> 26

His Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ala His Thr Arg Ala Leu
 1 5 10 15

Arg Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Asp
 20 25 30

His Arg Arg Asp Phe Gly Ser Pro His Glu Ala Phe Gly Gly Asn Gln
 35 40 45

Val Gln Lys Ala Gln Ala Met Ala Leu Val His Glu Met Leu Gln Gln
 50 55 60

Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu Gly Ser Ala Ala Ala Trp Asn Glu
 65 70 75 80

Ser Leu Leu His Gln Phe Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Gln Leu Arg Asp
 85 90 95

Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Ala Gly Leu Xaa Gly Thr Pro Leu
 100 105 110

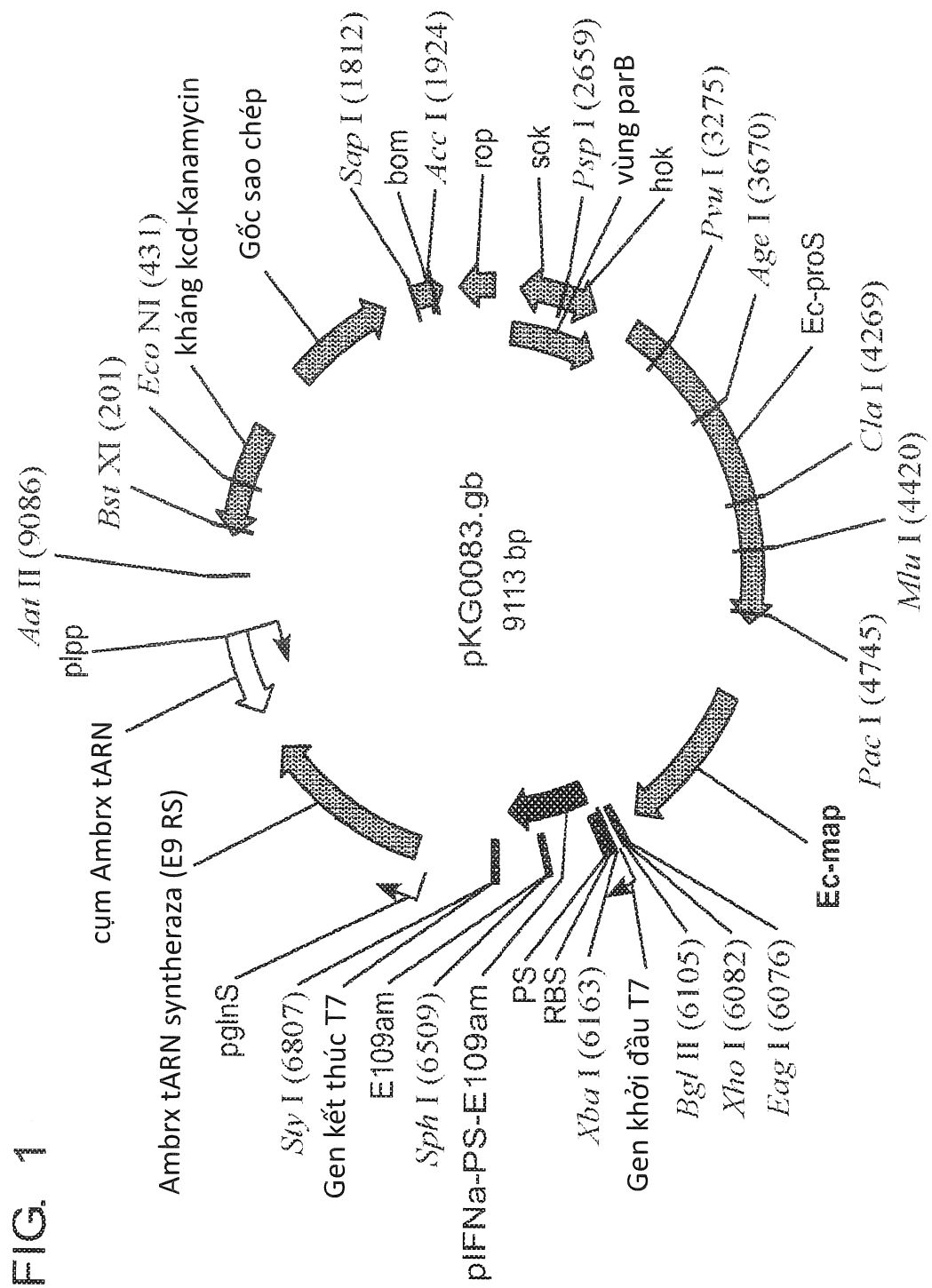
Leu Glu Glu Asp Ser Ile Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Leu
 115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile
 130 135 140

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

Asp Arg Leu Arg Lys Lys Glu
 165

1/5



2/5

Vị trí pAF	Trình tự	SEQ ID NO:	X=
Q102	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALV HEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPLEE EDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	6	102
Q102	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMAL VHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPLL EEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	7	103
Q102	PSCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMA LVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPL LEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	8	104
E103	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALV HEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPLEE EDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	9	103
E103	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMAL VHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPLL EEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	10	104
E103	PSCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMA LVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPL LEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	11	105
E107	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALV HEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPLEE EDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	12	107
E107	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMAL VHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPLL EEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	13	108
E107	PSCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMA LVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPL LEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	14	109
L112	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALV HEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPLEE EDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	15	112
L112	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMAL VHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPLL EEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	16	113
L112	PSCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMA LVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPL LEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	17	114
Y136	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALV HEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPLEE DSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	18	136
Y136	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMAL VHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPLEE EDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	19	137
Y136	PSCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMA LVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQAEAGLEGTPLL EEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	20	138

FIG. 2

FIG. 3

Trình tự	SIN	Chiều dài	Nhận xét
X_aX_b CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACV Q AG Q EGTP Q EEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEK S ISPCAMEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	1	168	interferon-α-1 kiểu đại ở lợn (có bổ sung ở đầu tận cùng N, pIFN- α từ <i>Sus scrofa domestica</i> (GenBank X57191))
MX_aX_b CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACV Q AG Q EGTP Q EEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEK S ISPCAMEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	2	169	Tương tự như SIN 1 nhưng với M ở đầu tận cùng N (thường được tách loại trong polypeptit trưởng thành)
MARTSAFL TALVLLSCNAICSLGCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACV Q AG Q EGTP Q EEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEK S ISPCAMEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	3	189	pIFN- α từ <i>Sus scrofa domestica</i> (GenBank X57191) với peptit tín hiệu
CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACV Q AG Q EGTP Q EEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEK S ISPCAMEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	4	166	Trình tự trưởng thành của pIFN- α từ <i>Sus scrofa domestica</i> (GenBank X57191)
MCDDLQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACV Q AG Q EGTP Q EEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEK S ISPCAMEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	5	167	Trình tự trưởng thành của pIFN- α từ <i>Sus scrofa domestica</i> (GenBank X57191) với Met được bổ sung vào đầu tận cùng N

FIG. 4

X_a	X_b	vi trí pAF	Trình tự	SIN	Chiều dài	X=
abs	abs	Q102	CDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLHQF YTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	6	166	102
abs	Pro	Q102	PCDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLHQ FYTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	7	167	103
Pro	Ser	Q102	PSCDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLH QFYTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	8	168	104
abs	abs	E103	CDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLHQF YTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	9	166	103
abs	Pro	E103	PCDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLHQ FYTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	10	167	104
Pro	Ser	E103	PSCDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLH QFYTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	11	168	105
abs	abs	E107	CDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLHQF YTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	12	166	107
abs	Pro	E107	PCDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLHQ FYTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	13	167	108
Pro	Ser	E107	PSCDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLH QFYTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	14	168	109
abs	abs	L112	CDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLHQF YTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	15	166	112
abs	Pro	L112	PCDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLHQ FYTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	16	167	113
Pro	Ser	L112	PSCDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLH QFYTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	17	168	114
abs	abs	Y136	CDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLHQF YTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	18	166	136
abs	Pro	Y136	PCDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLHQ FYTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	19	167	137
Pro	Ser	Y136	PSCDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLH QFYTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	20	168	138

X_a X_a CDLPQTHSLAHTRALRLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQDTFQLFSTEGSAAAMNESLLHQFYTGDDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE (SEQ ID NO: 1)

Trình tự "WT pIFN- α lpha" gồm 166 gốc

1 CDLPQTSLA HTRALRLLAQ MRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVOKAQAAMALVHEMLQOTFQLFS EGSAAWNES
81 LLHQFYTGLD QQLRDLACV MQEAGLEGTP LLEDSIRAV RKYFHRLTLY LQEKSYSPCA WEIVRAEVMR SFSSSRNLQD
161 RLKKE

X _a	X _b	Vị trí pAF	Trình tự	SIN	Chiều dài	X ₌
abs	abs	H7	CDLPQTSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVOKAQAAMALVHEMLQOTFQLFS TEGSAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLACVMQEALEGTPLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSP CAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLKKE	21	166	7
abs	abs	R34	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVOKAQAAMALVHEMLQOTFQLFS TEGSAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLACVMQEALEGTPLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSP CAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLKKE	22	166	34
abs	abs	H40	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVOKAQAAMALVHEMLQOTFQLFS TEGSAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLACVMQEALEGTPLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSP CAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLKKE	23	166	40

FIG. 5

X _s	X _b	Vị trí pAF	Trình tự	SIN	Chiều dài	X ₌
Không có mặt	Ser	E107	SCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVOKAQAAMALVHEMLQOTFQLF STEGSAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLACVMQEALEGTPLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSP PCAMEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLKKE	24	167	108
Ser	Gly	E107	SGCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVOKAQAAMALVHEMLQOTFQLF FSTEGSAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLACVMQEALEGTPLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSY SPCAMEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLKKE	25	168	109
Không có mặt	His	E107	HCDDLQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVOKAQAAMALVHEMLQOTFQLF STEGSAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLACVMQEALEGTPLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSP PCAMEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLKKE	26	167	108

FIG. 6