



(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)



1-0040790

(51)^{2020.01} C07K 14/495

(13) B

(21) 1-2020-06349

(22) 29/03/2019

(86) PCT/US2019/024756 29/03/2019

(87) WO2019/195091 10/10/2019

(30) 62/653,759 06/04/2018 US

(45) 26/08/2024 437

(43) 25/03/2021 396

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

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

(72) GONCIARZ, Malgorzata Donata (US); OBUNGU, Victor H. (US); PICKARD, Richard Todd (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT CHỦ VẬN YẾU TỐ BIỆT HÓA TĂNG TRƯỞNG 15 VÀ ĐƯỢC
PHÂN CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các hợp chất mà gây ra sự giảm cân nặng và điều trị bệnh đái tháo đường, rối loạn lipid máu, NASH và/hoặc bệnh béo phì. Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa các hợp chất này, trong đó các hợp chất này có vai trò như các chất chủ vận GDF15 có thời gian tác dụng kéo dài và các đặc tính có lợi khác.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực sinh học và thuốc, và cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các hợp chất và các chế phẩm chứa hợp chất chủ vận yếu tố biệt hóa tăng trưởng 15 (growth differentiation factor 15 - GDF15) có thời gian tác dụng kéo dài và các đặc tính có lợi khác, cũng như đến các phương pháp sử dụng chúng để gây ra sự giảm cân nặng và để điều trị bệnh đái tháo đường, rối loạn lipid máu, bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (dyslipidemia, nonalcoholic steatohepatitis - NASH) và/hoặc bệnh béo phì.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

GDF15 (còn được gọi là MIC-1, NAG-1) là protein thất nút xystein (Cys, C) thuộc liên họ yếu tố tăng trưởng biến nạp-beta (transforming growth factor-beta - TGF β). Nồng độ tuần hoàn của nó đã được ngụ ý trong các chức năng sinh học khác nhau, như chứng suy mòn ung thư và sự chuyển hóa (*xem*, Emmerson *et al.* (2017) *Nat. Med.* 23:1215-1219). GDF15 của người trưởng thành (SEQ ID NO:1) là peptit có 112 axit amin. GDF15 tuần hoàn tạo ra homodime của protein trưởng thành (25 kDa) thông qua cái được báo cáo là một liên kết disulfua liên chuỗi giữa gốc Cys ở vị trí 77 của SEQ ID NO:1 trên mỗi chuỗi của homodime (mà tương ứng với vị trí 316 trong SEQ ID NO:2). Tin tưởng rằng sự tạo ra homodime là cần thiết cho hoạt tính sinh học của GDF15 (*xem*, đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số công bố WO 2017/147742).

Trong số nhiều chức năng sinh học được báo cáo của homodime GDF15 trưởng thành, sự điều hòa sự nội cân bằng năng lượng đã được chú ý do tiềm năng của nó để điều trị bệnh béo phì và bệnh đái tháo đường typ 2 (type 2 diabete - T2D). Mối quan hệ giữa hoạt tính của homodime GDF15 trưởng thành và sự nội cân bằng năng lượng là dựa trên quan sát rằng các mức huyết thanh tăng dần của GDF15 trưởng thành tương quan với mức giảm cân nặng ở các cá thể mắc bệnh ung thư tuyến tiền liệt tiến triển (Emmerson *et al.* (2017)).

Hơn nữa, GDF15 tăng dần ở chuột nhắt bằng cách dùng GDF15 tái tổ hợp hoặc thông qua sự biểu hiện và sự tiết của nó từ mảnh ghép khối u khác loài chứng tỏ rằng GDF15 gây ra sự giảm cân nặng thông qua khả năng của nó làm giảm mức

hấp thu thức ăn và làm tăng mức tiêu tốn năng lượng. Ngoài ra, chuột nhất chuyển gen biểu hiện quá mức GDF15 kháng với béo phì do chế độ ăn gây ra và biểu hiện sự dung nạp glucoza cải thiện, còn chuột nhất bất hoạt gen GDF15 có cân nặng cơ thể và khối lượng chất béo tăng. Mức giảm cân nặng do GDF15 gây ra còn được thể hiện là làm giảm đáp ứng viêm và làm tăng tuổi thọ ở loài gặm nhấm.

Thụ thể yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ tế bào thần kinh đệm (Glial cell-derived neurotrophic factor - GDNF) giống alpha (GDNF receptor alpha-like - GFRAL) đã được nhận diện là thụ thể gắn kết phối tử đối với GDF15. Sự mất tác dụng chán ăn của GDF15 ở chuột nhất thiếu hụt GFRAL cũng như ở chuột cống được dùng kháng thể đơn dòng trung hòa kháng GFRAL chứng tỏ rằng GFRAL chủ yếu chịu trách nhiệm về các tác dụng chuyển hóa của GDF15 (Emmerson *et al.* (2017)).

Thời gian bán thải ($t_{1/2}$) tự nhiên của chất chủ vận homodime GDF15 người tuân hoàn trưởng thành là tương đối ngắn (khoảng 2-3 giờ). Tuy nhiên, đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số công bố WO 2015/017710 nói chung mô tả việc kéo dài $t_{1/2}$ của các chất chủ vận GDF15 thông qua các tiếp hợp khác nhau bao gồm tiếp hợp với vùng có thể kết tinh được dạng mảnh (Fc).

Có nhu cầu đối với các hợp chất GDF15 có hoạt tính sinh học có thời gian tác dụng kéo dài mà có thể được sử dụng trong việc trị liệu để gây ra sự giảm cân nặng và để điều trị T2D, rối loạn lipid máu, NASH và/hoặc bệnh béo phì. Hợp chất đáng mong muốn về mặt trị liệu sẽ chủ vận thụ thể GFRAL và tạo ra các đặc tính có lợi. Một đặc tính có lợi sẽ là gây ra sự giảm cân nặng. Một đặc tính có lợi khác sẽ là độ ổn định *in vivo* trong cửa sổ thời gian kéo dài trong khoảng trị liệu để cho phép một mức ổn định của hợp chất trong dòng máu với việc dùng liều mỗi tuần một lần để đạt được tác dụng trị liệu mong muốn. Các đặc tính đáng mong muốn nữa cũng bao gồm khả năng sinh miễn dịch giảm. Ngoài ra, hợp chất đáng mong muốn sẽ có các đặc tính độ ổn định vật lý và/hoặc hóa học có lợi.

Xem xét trên đây, sáng chế mô tả các hợp chất tương tự GDF15 có hoạt tính sinh học mà có $t_{1/2}$ kéo dài và các đặc tính đáng mong muốn khác. Cụ thể hơn, các hợp chất trong bản mô tả này là các protein dung hợp tái tổ hợp có Fc IgG4 của người monome (một đơn vị Fc trên mỗi GDF15) không bản lề được liên kết thông qua cầu nối cố định với amino đầu tận cùng (N) của hợp chất tương tự GDF15, nhờ đó các hợp chất tạo ra homodime được liên kết cộng hóa trị thông qua ít nhất một liên kết disulfua liên chuỗi giữa các phần GDF15 của mỗi trong số các monome.

Một hợp chất được nêu làm ví dụ, hợp chất 2, là homodime của hai phân tử của hợp chất 1 (SEQ ID NO:2) và đã bất ngờ thể hiện $t_{1/2}$ được tăng cường lên đến khoảng 117 giờ, điều này có thể tạo ra hiệu quả kéo dài và có thể cho phép dùng liều hợp chất mỗi tuần một lần. Các hợp chất trong bản mô tả này cũng có độ ổn định vật lý được tăng cường. Ví dụ, hợp chất 2 có khối kết tập hòa tan được khối lượng phân tử cao (High Molecular Weight - HMW) 4,1% thấp trong phần gộp bất giữ Protein A. Hợp chất 2 cũng thể hiện độ ổn định hóa học được tăng cường, như sự phát triển phần trăm khối lượng phân tử thấp (Low Molecular Weight - LMW) 0,75% thấp ở 1 mg/ml sau 4 tuần bảo quản ở 40°C trong xitrat ở độ pH 6,0.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án, hợp chất được đề xuất chứa SEQ ID NO:2.

Theo một phương án khác, hợp chất được đề xuất chứa homodime bao gồm hai monome, mỗi monome bao gồm SEQ ID NO:2, trong đó hai monome được liên kết thông qua ít nhất một liên kết disulfua liên chuỗi giữa gốc Cys của monome thứ nhất và gốc Cys của monome thứ hai.

Theo một phương án khác, được phẩm được đề xuất mà chứa hợp chất có SEQ ID NO:2 hoặc homodime của hai monome của SEQ ID NO:2 và một hoặc nhiều tá dược được dụng.

Theo một phương án khác, phương pháp được đề xuất để gây ra sự giảm cân nặng hoặc để điều trị T2D, rối loạn lipid máu, NASH và/hoặc bệnh béo phì ở cá thể mà bao gồm việc cho cá thể dùng với lượng có hiệu quả của hợp chất có SEQ ID NO:2, homodime bao gồm hai monome của SEQ ID NO:2, hoặc được phẩm chứa hợp chất có SEQ ID NO:2 hoặc homodime bao gồm hai monome của SEQ ID NO:2.

Theo một phương án khác, hợp chất được đề xuất mà chứa SEQ ID NO:2 hoặc homodime bao gồm hai monome của SEQ ID NO:2 để sử dụng trong trị liệu. Theo cách khác, hợp chất được đề xuất mà chứa SEQ ID NO:2 hoặc homodime bao gồm hai monome của SEQ ID NO:2 để sử dụng trong việc gây ra sự giảm cân nặng hoặc để sử dụng trong việc điều trị T2D, rối loạn lipid máu, NASH và/hoặc bệnh béo phì.

Theo một phương án khác, việc sử dụng được đề xuất đối với hợp chất chứa SEQ ID NO:2 hoặc homodime bao gồm hai monome của SEQ ID NO:2 trong việc sản xuất thuốc để gây ra sự giảm cân nặng hoặc để điều trị T2D, rối loạn lipid máu, NASH và/hoặc bệnh béo phì.

Theo các phương án khác, hợp chất được đề xuất mà được sản xuất bằng cách nuôi cấy tế bào động vật có vú chứa phân tử ADN bổ trợ mã hóa polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2, trong các điều kiện sao cho polypeptit được biểu hiện, và thu gom hợp chất này. Ngoài ra, phương pháp được đề xuất để gây ra sự giảm cân nặng ở cá thể hoặc để điều trị T2D, rối loạn lipid máu, NASH và/hoặc bệnh béo phì mà bao gồm việc cho cá thể dùng với lượng có hiệu quả của hợp chất trong bản mô tả này hoặc chế phẩm trong bản mô tả này mỗi tuần một lần.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “khoảng” có nghĩa là trong phạm vi có nghĩa về mặt thống kê của trị số hoặc các trị số như, ví dụ, nồng độ, chiều dài, khối lượng phân tử, độ pH, mức độ đồng nhất trình tự, khung thời gian, nhiệt độ, thể tích được nêu, v.v.. Trị số hoặc phạm vi như vậy có thể nằm trong độ lớn thường là trong 20%, thông thường hơn là trong 10%, và thậm chí thông thường hơn nữa là trong 5% của trị số hoặc phạm vi đã cho. Sự biến thiên có thể chấp nhận được được bao gồm bởi “khoảng” sẽ phụ thuộc vào hệ thống cụ thể được nghiên cứu, và có thể dễ dàng được đánh giá bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “lượng có hiệu quả” có nghĩa là lượng hoặc liều của hợp chất trong bản mô tả này hoặc được phẩm chứa hợp chất trong bản mô tả này, mà khi dùng một hoặc nhiều liều cho bệnh nhân hoặc đối tượng, sẽ gây ra đáp ứng sinh học hoặc y học của hoặc tác dụng trị liệu mong muốn trên mô, hệ thống, động vật, động vật có vú hoặc người mà được xác định bởi nhà nghiên cứu, bác sĩ thú y, bác sĩ y khoa hoặc bác sĩ lâm sàng khác. Tốt hơn là, lượng có hiệu quả của hợp chất hoặc các chế phẩm chứa hợp chất theo sáng chế cho bệnh nhân cần điều trị sẽ dẫn đến sự giảm thực của cân nặng cơ thể. Liều có thể bao gồm liều nạp ban đầu cao hơn, tiếp theo là liều thấp hơn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “cá thể,” “bệnh nhân” và “đối tượng” được sử dụng thay thế cho nhau và có nghĩa là động vật, đặc biệt là người. Khi là người, cá thể này được đặc trưng với bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh mà sẽ có lợi từ việc dùng hợp chất hoặc chế phẩm trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “sự điều trị” hoặc “việc điều trị” có nghĩa là việc quản lý và chăm sóc cá thể có tình trạng bệnh mà được chỉ định dùng GDF15 để nhằm mục đích chống lại hoặc làm giảm bớt các triệu chứng và các biến chứng của các tình trạng bệnh đó. Việc điều trị bao gồm việc dùng hợp chất hoặc

chế phẩm chứa hợp chất trong bản mô tả này cho cá thể cần điều trị để ngăn ngừa sự khởi phát của các triệu chứng hoặc các biến chứng, làm giảm bớt các triệu chứng hoặc các biến chứng, hoặc làm mất bệnh, tình trạng bệnh hoặc rối loạn. Cụ thể là, việc điều trị bao gồm việc dùng hợp chất hoặc chế phẩm chứa hợp chất trong bản mô tả này cho cá thể cần điều trị để dẫn đến sự giảm thực của cân nặng cơ thể. Cá thể được điều trị có thể là động vật, đặc biệt là người.

Dược phẩm trong bản mô tả này có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa cho cá thể cần điều trị này. Việc dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được thực hiện bằng cách tiêm dưới da, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch bằng bơm tiêm, tùy ý bơm tiêm giống bút, hoặc máy tiêm được dẫn động cơ học. Theo cách khác, việc dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được thực hiện bằng cách bơm truyền. Hơn nữa, dược phẩm có thể chứa một hoặc nhiều tá dược được dùng. Dược phẩm như vậy có thể được bào chế bằng kỹ thuật bất kỳ trong số nhiều kỹ thuật bằng cách sử dụng các tá dược thông thường cho các sản phẩm dược mà đã được biết rõ trong lĩnh vực này (*xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Edition, University of the Sciences in Philadelphia, Philadelphia, PA, USA (2006)*).

Các hợp chất và các chế phẩm trong bản mô tả này có thể được sử dụng kết hợp đồng thời, riêng rẽ hoặc lần lượt với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung hữu ích để gây ra sự giảm cân nặng và để điều trị bệnh đái tháo đường, các tình trạng bệnh liên quan đến T2D, rối loạn lipid máu NASH và/hoặc bệnh béo phì. Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về các chất trị liệu bổ sung mà có thể được kết hợp với các hợp chất theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, insulin hoặc các chất tương tự insulin; biguanide; sulfonylure; thiazolidindion; chất ức chế dipeptidyl peptidaza-4 ("DPP-4"); chất ức chế vận chuyển glucoza phụ thuộc natri (sodium-dependent glucose transporter) (SGLT2); các hợp chất incretin như peptit giống glucagon-1 (glucagon-like-peptide-1 - GLP-1) hoặc các chất tương tự GLP-1, polypeptit ức chế dạ dày (gastric inhibitory polypeptide - GIP) hoặc các chất tương tự GIP, oxyntomodulin (OXM) hoặc các chất tương tự OXM; hoặc các tổ hợp của các chất bất kỳ trong số các chất nêu trên. Các hợp chất trong bản mô tả này và (các) chất trị liệu bổ sung có thể được dùng cùng nhau thông qua cùng đường phân phối và thiết bị như một viên tròn, viên nang, viên nén hoặc chế phẩm để tiêm; hoặc được dùng một cách riêng rẽ cùng một lúc trong các thiết bị hoặc các đường phân phối riêng rẽ; hoặc được dùng lần lượt.

Các hợp chất trong bản mô tả này có thể được điều chế bằng nhiều kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, các hợp chất có thể được điều chế thông qua sự sản xuất của protein hoặc phân tử protein tiền chất bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp. ADN, kể cả ADN hỗ trợ và ADN tổng hợp, có thể là sợi kép hoặc sợi đơn. Các trình tự mã hóa mà mã hóa các hợp chất có thể thay đổi do sự dư thừa hoặc sự thoái hóa của mã di truyền. ADN có thể được đưa vào tế bào chủ để sản xuất hợp chất hoặc tiền chất của nó. Các tế bào chủ có thể là các tế bào vi khuẩn như các chủng K12 hoặc B của *Escherichia coli*, các tế bào nấm như các tế bào nấm men, hoặc các tế bào của động vật có vú như các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary - “CHO”).

Tế bào chủ thích hợp được chuyển nhiễm hoặc được biến nạp một cách tạm thời hoặc ổn định bằng hệ biểu hiện, như các vector biểu hiện, để sản xuất hợp chất trong bản mô tả này hoặc tiền chất của nó. Các vector biểu hiện thường có thể sao chép được trong các sinh vật chủ dưới dạng episom hoặc dưới dạng phần không thể thiếu của ADN nhiễm sắc thể của vật chủ. Thông thường, các vector biểu hiện sẽ chứa các chất đánh dấu chọn lọc như, ví dụ, tetracyclin, neomycin, glutamin syntetaza và dihydrofolat reductaza, để cho phép chọn lọc các tế bào được biến nạp bằng trình tự ADN mong muốn.

Các hợp chất trong bản mô tả này có thể được điều chế bằng nhiều kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, cũng như các phương pháp được mô tả dưới đây. Các bước sinh tổng hợp hoặc tổng hợp cụ thể đối với mỗi trong số các bước được mô tả có thể được sử dụng, không được sử dụng hoặc được kết hợp theo các cách khác nhau để điều chế các hợp chất trong bản mô tả này.

Các hợp chất tương tự GDF15 trong bản mô tả này có thể có vai trò như các hợp chất GFRAL và được sản xuất trong hệ biểu hiện của tế bào động vật có vú bằng cách sử dụng các dẫn xuất tế bào CHOK1. Các gen mã hóa đối với các protein GDF15 được tách dòng phụ vào trong khung xương sống plasmit biểu hiện chứa glutamin syntetaza (glutamine synthetase - GS) (các plasmit dựa trên pEE12.4). Trình tự ADN hỗ trợ (SEQ ID NO:16) mã hóa Hợp chất 1 (SEQ ID NO:2), protein Fc-GDF15 được nêu làm ví dụ, được dung hợp trong khung với trình tự mã hóa của trình tự peptit tín hiệu, METDTLLLVVLLLVVPGSTG (SEQ ID NO:3) để tăng cường sự tiết của sản phẩm mong muốn vào trong môi trường nuôi cấy mô.

Sự biểu hiện được điều khiển bằng trình tự khởi động của cytomegalovirut (cytomegalovirus - CMV) của virut. Các tế bào CHOK1SV được chuyển nhiễm một

cách ổn định bằng cách sử dụng xung điện và một lượng thích hợp của plasmit biểu hiện tái tổ hợp, và các tế bào được chuyển nhiễm được giữ trong huyền phù nuôi cấy ở mật độ tế bào vừa đủ. Việc chọn lọc các tế bào được chuyển nhiễm được thực hiện bởi sự sinh trưởng trong môi trường không chứa huyết thanh chứa metionin sulfoximin (MSX) 25 μ M và được ủ ở khoảng 35°C-37°C và khoảng 5-7% CO₂. Các protein GDF15 hoặc các protein dung hợp Fc-GDF15 được tiết vào trong môi trường từ các tế bào CHO. Các phần GDF15 của các protein liên kết với nhau, tạo ra các homodime chứa hai protein GDF15 hoặc các homodime protein dung hợp Fc-GDF15 được nối với nhau thông qua liên kết disulfua liên chuỗi. Các homodime GDF15 hoặc Fc-GDF15 có thể được tinh chế bằng sắc ký ái lực Protein A tiếp theo là trao đổi anion và sắc ký kỵ nước.

Các homodime protein GDF15 từ môi trường thu hoạch được bắt giữ lên trên nhựa Capto Blue (GE). Các homodime protein Fc-GDF15 từ môi trường thu hoạch được bắt giữ lên trên nhựa Mab Select Protein A (GE). Sau đó, nhựa được rửa nhanh bằng dung dịch đệm chạy, như dung dịch muối đệm phosphat (phosphate-buffered saline - PBS; độ pH 7,4) hoặc dung dịch đệm chạy chứa Tris, để loại bỏ chất không được gắn kết đặc hiệu. Protein được rửa giải khỏi nhựa bằng dung dịch có độ pH thấp, như dung dịch axit xitric 10 mM, độ pH 3. Các phân đoạn chứa các protein GDF15 được gộp lại và có thể được giữ ở độ pH thấp để làm bất hoạt các virus tiềm tàng. Độ pH có thể được trung hòa bằng cách bổ sung bazơ như dung dịch Tris 0,1 M, độ pH 8,0. Protein GDF15 có thể được tinh chế thêm bằng sắc ký trao đổi anion bằng cách sử dụng các nhựa như Poros XQ (Life Technologies). Protein GDF15 được rửa giải khỏi cột AEX bằng cách sử dụng gradien NaCl 0 đến 200 mM trong dung dịch Tris 50 mM, độ pH 8,0 trên 15 thể tích cột.

Protein dung hợp Fc-GDF15 có thể được tinh chế thêm bằng sắc ký tương tác kỵ nước bằng cách sử dụng cột sắc ký tương tác kỵ nước (Hydrophobic Interaction Chromatography - HIC) Capto Phenyl ImpRes (GE Healthcare). Cột này được thực hiện bằng cách điều chỉnh dung dịch điện tích đến quanh 0,5 M natri sulfat và được rửa giải bằng cách sử dụng gradien 10 thể tích cột (Column Volume - CV) đi từ 0,5 M đến 0 M natri sulfat trong dung dịch Tris 20 mM, độ pH 8. Sau khi HIC, protein có thể được tinh chế thêm bằng sắc ký loại cở bằng cách nạp phần gộp Capto Phenyl ImpRes đã được cô đặc trên Superdex200 (GE Healthcare) với sự rửa giải đẳng dòng trong PBS, độ pH 7,4.

Các hợp chất GDF15 đã được tinh chế có thể được cho đi qua bộ lọc giữ lại virut như Planova 20N (Asahi Kasei Medical) tiếp theo cô đặc/lọc tách vào trong 10 mM xitrat, 150 mM NaCl độ pH 7 bằng cách sử dụng sự siêu lọc dòng tiếp tuyến trên màng xenluloza tái sinh (Millipore).

Miền ngoại bào (extracellular domain - ECD) GFRAL của người hòa tan được được tạo ra trong hệ biểu hiện của tế bào động vật có vú bằng cách sử dụng các dẫn xuất tế bào CHOK1. ECD GFRAL đã được gắn nhãn polyhistidin từ môi trường thu hoạch được được bắt giữ lên trên sắc ký ái lực ion kim loại được làm bất động (immobilized metal ion affinity chromatography - IMAC) bằng niken. Sau đó, nhựa được rửa nhanh bằng dung dịch đệm chạy, như PBS độ pH 7,4, hoặc dung dịch đệm chạy chứa Tris (độ pH 8,0, 500 mM NaCl) để loại bỏ chất không được gắn kết đặc hiệu. ECD GFRAL đã được gắn nhãn HIS đã gắn kết (SEQ ID NO:4) được rửa giải bằng cách sử dụng 0-250 mM imidazol trong PBS hoặc TRIS (độ pH 8,0, 500 mM NaCl) trên 10 thể tích cột. ECD GFRAL đã được gắn nhãn HIS có thể được tinh chế thêm bằng sắc ký loại cỡ bằng cách nạp phần gộp IMAC đã được cô đặc trên Superdex200 (GE Healthcare) với sự rửa giải đẳng dòng trong PBS (độ pH 7,4).

Sự biểu hiện các kháng thể động vật có vú dẫn đến sự glycosyl hóa. Thông thường, sự glycosyl hóa xảy ra trong vùng Fc của kháng thể ở vị trí glycosyl hóa N được bảo toàn cao. Các N-glycan thường gắn với asparagin. Trong vùng ổn định điển hình của các globulin miễn dịch IgG, chỉ có một vị trí để glycosyl hóa được liên kết ở vị trí N. Tuy nhiên, vị trí này có thể được biến đổi để ngăn cản sự glycosyl hóa hoặc các vị trí bổ sung có thể được thêm vào đối với các cấu trúc glycosyl hóa bổ sung hoặc đa dạng. Ngoài ra, sự glycosyl hóa đôi khi xảy ra trong các vùng khác của các phân tử được biểu hiện trong các tế bào của động vật có vú.

Các hợp chất trong bản mô tả này được điều chế theo cách này hoặc theo cách tương tự mà sẽ dễ dàng xác định được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn sau được đưa ra để nhằm mục đích minh họa, không phải để giới hạn.

Ví dụ 1: Ái lực thụ thể *in vitro*

Các thông số gắn kết *in vitro* của homodime GDF15 của người và Hợp chất 2 được nêu làm ví dụ với thụ thể GFRAL của người được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance - SPR). ECD của GFRAL chứa ba miền giàu Cys (D1, D2 và D3). Ái lực của homodime của GDF15 của người (des-ARN SEQ ID NO:1; tức là, GDF15 không có Ala, Arg và Asp từ đầu tận cùng N) và Hợp chất 2, homodime của Hợp chất 1 Fc-GDF15 (SEQ ID NO:2) với ECD GFRAL của người đã được gắn nhãn HIS (SEQ ID NO:4) có thể được đo bằng SPR. Động học được tóm tắt trong bảng 1.

Để đo việc gắn kết của GDF15 của người (des-ARN SEQ ID NO:1) hoặc Hợp chất 2 với ECD GFRAL của người, thiết bị Biacore T200 được sử dụng để đo động học gắn kết của homodime GDF15 của người (des-ARN SEQ ID NO:1) và Hợp chất 2 với ECD GFRAL. Các phép đo được thực hiện ở 25°C. Các mẫu được hòa tan trong HBS-EP+, độ pH 7,4 (GE Healthcare; 10 mM HEPES độ pH 7,4 + 150 mM NaCl + 3 mM EDTA + 0,05% chất hoạt động bề mặt P20). Kháng thể của dê kháng GDF15 của thỏ (R&D) được làm bất động trên các tế bào dòng của chip cảm biến CM5 bằng cách sử dụng hóa học ghép đôi amin. Các mẫu GDF15 được chuẩn bị ở 25 µg/ml bằng cách pha loãng vào trong dung dịch đệm chạy.

Các mẫu ECD GFRAL của người được chuẩn bị ở các nồng độ cuối là 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0 và 0 (mẫu trắng) nM bằng cách pha loãng vào trong dung dịch đệm chạy. Thí nghiệm SPR bao gồm các bước sau: (1) bắt giữ các mẫu GDF15 trên các tế bào dòng riêng rẽ (Fc2, Fc3 và Fc4), (2) tiêm 200 µl ECD GFRAL của người trên tất cả các tế bào dòng ở 100 µl/phút, (3) phân ly trong 600 giây, (4) tái sinh các bề mặt chip bằng cách tiêm 10 µl (30 giây) glyxin, độ pH 1,5, ở 20 µl/phút, và (5) làm cân bằng các bề mặt chip bằng cách tiêm 10 µl (30 giây) HBS-EP+ ở 20 µl/phút. Mỗi nồng độ của ECD GFRAL của người được tiêm lặp lại hai lần.

Dữ liệu được xử lý bằng cách sử dụng tham chiếu kép tiêu chuẩn và khớp với mô hình gắn kết 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T200 để xác định tốc độ liên kết (k_{on} , $M^{-1}s^{-1}$), tốc độ phân ly (k_{off} , s^{-1}) và đáp ứng lớn nhất (R_{max} ; đơn vị đáp ứng (RU)). Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính từ mối quan hệ $K_D = k_{off}/k_{on}$ (M).

Bảng 1: Động học gắn kết của homodime GDF15 của người và homodime hợp chất 2 với thụ thể ECD GFRAL của người (D1-D2-D3-ECD) ở 25°C.

Hợp chất	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
GDF15 của người (homodime của hai hợp chất bao gồm des-ARN SEQ ID NO:1)	2,92E+05	7,21E-03	7,2
Hợp chất 2 (homodime của hai hợp chất bao gồm SEQ ID NO:2)	1,05E+06	8,71E-03	8,3

Các kết quả thể hiện rằng homodime GDF15 của người (hai hợp chất bao gồm des-ARN SEQ ID NO:1) có ái lực là 7,2 nM đối với ECD GFRAL của người, và homodime hợp chất 2 (hai hợp chất bao gồm SEQ ID NO:2) có ái lực là 8,3 nM đối với ECD GFRAL của người.

Ví dụ 2: Hoạt tính chức năng *in vitro*

GFRAL, thụ thể đối với GDF15, là thành viên của họ thụ thể GDNF và chứa miền xuyên màng đơn và không chứa miền tín hiệu nội bào. Các thành viên của họ thụ thể GDNF bao gồm GFRAL sử dụng đồng thụ thể RET để truyền tín hiệu. Sự kích thích của phức hợp thụ thể GDNF/RET đã được biết là kích hoạt mạng lưới truyền tín hiệu liên quan đến sự phosphoryl hóa ERK, AKT và STAT.

Để đánh giá hoạt tính và hiệu lực tương đối của các biến thể GDF15 người trưởng thành, các tế bào HEK293 (ATCC) được chuyển nhiễm bằng các vector biểu hiện của động vật có vú được điều khiển bởi CMV chứa GFRAL của người (trình tự đối chiếu NCBI số NP_997293.2) và RET51 của người (trình tự đối chiếu NCBI số NP_066124.1) và được phát triển trong ba tuần với sự có mặt của geneticin và puromycin (Life Technologies) để tạo ra phần gộp của các tế bào biểu hiện một cách ổn định cả hai protein. Phép đo sự phosphoryl hóa ERK1/2 được chọn làm điểm cuối để đánh giá sự hoạt hóa RET sử dụng kit thử nghiệm AlphaLISA Surefire Ultra Phospho-ERK1/2 (Perkin Elmer), theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và mô hình máy đọc vi đĩa đa nhãn EnVision 2102 (Perkin Elmer).

Nói ngắn gọn, các tế bào HEK293-hGFRAL/hRET, giữa lần cấy truyền 10-20, được gieo ở 20.000 tế bào mỗi lỗ trên các đĩa 96 lỗ được phủ poly-D-lysine và được phát triển trong ba ngày ở 37°C trong môi trường 5% CO₂/95% O₂. Các tế bào được ủ trong môi trường không chứa huyết thanh trong 4 giờ và sau đó được xử lý, như được chỉ định, trong 10 phút, được dung giải và được kết đông cho đến khi được thử nghiệm. Các dịch tan tế bào được làm tan bằng cách ủ trong 1 giờ ở 4°C, được

trộn trên máy lắc đĩa quỹ đạo, và được chuyển sang đĩa 384 lỗ màu trắng. Phương pháp AlphaLISA “2-đĩa/1 ủ” được áp dụng bằng cách bổ sung hỗn hợp trộn chất nhận và chất cho, được cung cấp với kit thử nghiệm, vào các dịch tan và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối trong 8 giờ trước khi đo tín hiệu AlphaLISA trên máy đọc đĩa EnVision.

Mỗi đĩa của các tế bào được sử dụng cho thử nghiệm bao gồm GDF15 trưởng thành của người tự nhiên làm tiêu chuẩn tham chiếu đối với hiệu suất thử nghiệm. Dữ liệu phosphoryl hóa ERK1/2 (pERK1/2) từ nhiều đĩa được thu lại trong một đồ thị bằng cách chuyển dữ liệu tín hiệu AlphaLISA thô trên trục Y sang %lớn nhất so với tiêu chuẩn tham chiếu GDF15 của người sử dụng công thức sau:

$$\% \text{Lớn nhất} = 100 * (x - \text{min}) / (\text{max} - \text{min}),$$

trong đó min = 0 và biểu thị sự không kích thích, max = 100 và biểu thị sự kích thích quan sát được ở liều bão hòa của hợp chất, và x = việc điều trị đã cho bất kỳ. EC₅₀ đối với mỗi hợp chất được xác định bằng cách sử dụng đường cong đáp ứng liều dạng chữ S độ dốc thay đổi được với sự hồi quy logistic bốn thông số trong GraphPad Prism phiên bản 7.00. EC₅₀ được liệt kê đối với mỗi hợp chất trong bảng 2 được xác định bằng cách tạo ra số trung bình nhân của EC₅₀ đối với 3 thử nghiệm độc lập của mỗi hợp chất sử dụng công thức sau:

$$\text{Trung bình nhân} = \sqrt[3]{X1 * X2 * X3}.$$

Các tế bào HEK293 biểu hiện cả GFRAL của người và RET51 của người được sử dụng để đánh giá hiệu lực của hợp chất 2. GDF15 trưởng thành của người tự nhiên (SEQ ID NO:1), dưới dạng homodime, được sử dụng làm tiêu chuẩn tham chiếu trên mỗi đĩa tế bào. Các vật phẩm thử nghiệm được chạy lặp lại bốn lần trong ba thử nghiệm độc lập.

Bảng 2: So sánh hiệu lực của hợp chất 2 với GDF15 của người.

Vật phẩm thử nghiệm	EC ₅₀ (pM)	SEM	N
GDF15 người trưởng thành (homodime của hai hợp chất bao gồm SEQ ID NO:1)	27,9	2,9	3
Hợp chất 2 (homodime của hai hợp chất bao gồm SEQ ID NO:2)	86,2	5,8	3

Dữ liệu từ thử nghiệm đại diện được thể hiện dưới dạng trung bình cộng ± SE
N, số lượng thử nghiệm độc lập

Ví dụ 3: Hiệu quả *in vivo* trong các mô hình chuột cống bình thường

Bệnh béo phì là bệnh đồng mắc phổ biến liên quan đến bệnh đái tháo đường và chứng kháng insulin. GDF15 đã được báo cáo là hạn chế sự hấp thu thức ăn, gây ra sự giảm cân nặng và cải thiện sự nội cân bằng glucoza. Do đó, hợp chất GDF15 có thể hiệu quả trong việc trị liệu để gây ra sự giảm cân nặng và đối với các tình trạng bệnh như T2D, rối loạn lipid máu, NASH và/hoặc bệnh béo phì. Hợp chất 2 được dùng ở chuột cống Sprague Dawley đực trong khoảng thời gian 15 ngày kết hợp đo cân nặng cơ thể và mức hấp thu thức ăn hằng ngày.

Chuột cống Sprague-Dawley đực bình thường (Envigo; 14 tuần tuổi) được duy trì trên chế độ ăn thức ăn thông thường khi đến cơ sở nghiên cứu (TD2014; Teklad, Madison, WI) và được sử dụng trong các nghiên cứu sau. Các động vật được nhốt một cách riêng rẽ trong cơ sở nghiên cứu được kiểm soát nhiệt độ (24°C) với chu kỳ sáng/tối 12 giờ (chiếu sáng vào 0600) và tiếp cận tự do với thức ăn (TD2014) và nước.

Sau ít nhất một tuần thích nghi khí hậu với cơ sở nghiên cứu, chuột cống được ngẫu nhiên hóa theo cân nặng cơ thể của chúng, sao cho mỗi nhóm thử nghiệm của các động vật sẽ có cân nặng cơ thể tương tự. Các cân nặng cơ thể nằm trong khoảng từ 332 đến 369 gam.

Tất cả các nhóm chứa năm chuột cống. Chất dẫn hoặc hợp chất 2 (khoảng liều 0,01 đến 0,3 mg/kg) được hòa tan trong chất dẫn (PBS) được dùng bằng cách tiêm dưới da (subcutaneous - SC) (1 ml/kg) vào chuột cống bình thường được cho ăn tùy thích mỗi 3 ngày trong 15 ngày.

Các lần tiêm dưới da được thực hiện vào ngày 1, 4, 7, 10 và 13. Việc đo cân nặng cơ thể và mức hấp thu thức ăn hằng ngày được thực hiện trong toàn bộ giai đoạn nghiên cứu. Tỷ lệ phần trăm cân nặng cơ thể được tính hằng ngày từ mỗi cân nặng cơ thể ban đầu của động vật như sau:

$$\% \text{ Cân nặng cơ thể} = (\text{cân nặng cơ thể hằng ngày} / \text{cân nặng cơ thể ban đầu}) \times 100.$$

Tất cả dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình cộng $\pm$ SEM của năm con vật trên mỗi nhóm. Các nồng độ liều có hiệu quả đối với tỷ lệ phần trăm mức giảm cân nặng và mức hấp thu thức ăn tích lũy được xác định trong GraphPad Prism bằng cách sử dụng công cụ khớp không tuyến tính. Phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng ANOVA các phép đo lặp lại, tiếp theo là phương pháp của

Dunnett để so sánh nhiều cặp. Sự khác biệt có ý nghĩa được nhận diện ở *-p<0,05, **-p<0,01, ***-p<0,001, ****-p<0,0001.

Bảng 3: Tác dụng của việc điều trị bằng hợp chất 2 đến tỷ lệ phần trăm cân nặng cơ thể và mức hấp thu thức ăn tích lũy ở chuột cống SD bình thường.

Điều trị	Cân nặng cơ thể (%)	Mức hấp thu thức ăn tích lũy (g)
Chất dẫn (1 ml/kg, SC)	106,69±0,54	264,48±7,28
Hợp chất 2 (0,01 mg/kg)	93,34±2,13*	193,04±8,54*
Hợp chất 2 (0,03 mg/kg)	85,18±2,60*	155,42±11,13*
Hợp chất 2 (0,06 mg/kg)	81,80±1,66*	122,54±14,05*
Hợp chất 2 (0,1 mg/kg)	78,30±3,71*	115,74±15,75*
Hợp chất 2 (0,3 mg/kg)	73,57±1,56*	91,22±8,57*

Tất cả dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình cộng ± SEM của 5 con vật trên mỗi nhóm từ ngày 14. Phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng ANOVA các phép đo lặp lại, tiếp theo là phương pháp của Dunnett để so sánh nhiều cặp. Sự khác biệt có ý nghĩa được nhận diện ở *p<0,05.

Việc điều trị lâu dài bằng hợp chất 2 ở chuột cống đực SD bình thường dẫn đến sự giảm có ý nghĩa thống kê về mức hấp thu thức ăn và sự giảm có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ phần trăm cân nặng cơ thể khi hoàn thành nghiên cứu so với các động vật được điều trị bằng chất dẫn theo cách phụ thuộc liều. Mức hấp thu thức ăn tích lũy được giảm từ 264,48 xuống 91,22 ở liều cao nhất được thử nghiệm và mức giảm cân nặng cơ thể nằm trong khoảng từ mức giảm 7% đến 26%. Dữ liệu dường như chỉ ra rằng hợp chất 2 có tác dụng có ý nghĩa thống kê trong việc làm giảm cân nặng cơ thể và mức hấp thu thức ăn ở chuột cống SD bình thường theo cách phụ thuộc liều.

Ví dụ 4: Hiệu quả *in vivo* ở chuột nhắt béo phì gây ra do chế độ ăn (Diet-Induced Obese - DIO)

Để khảo sát tác dụng của hợp chất 2 đến mức giảm cân nặng, sự chuyển hóa, thành phần cơ thể và chứng nhiễm mỡ gan, hợp chất 2 được dùng liều lâu dài cho chuột nhắt DIO C57/B16.

Chuột nhắt DIO C57/B16 đực (Taconic) 24 đến 25 tuần tuổi, được duy trì trên chế độ ăn giàu calo khi đến cơ sở nghiên cứu (TD95217; Teklad, Madison, WI) và được sử dụng trong các nghiên cứu sau. Các động vật được nhốt một cách riêng rẽ trong cơ sở nghiên cứu được kiểm soát nhiệt độ (24°C) với chu kỳ sáng/tối 12 giờ

(chiếu sáng vào 2200) và tiếp cận tự do với thức ăn (TD95217) và nước. Sau ít nhất 2 tuần thích nghi khí hậu với cơ sở nghiên cứu, chuột nhất được ngẫu nhiên hóa theo cân nặng cơ thể của chúng, sao cho mỗi nhóm thử nghiệm của các động vật sẽ có cân nặng cơ thể tương tự. Cân nặng cơ thể nằm trong khoảng từ 40 đến 50 gam.

Tất cả các nhóm chứa năm chuột nhất. Chất dẫn hoặc hợp chất 2 (0,002, 0,006, 0,02, 0,06, và 0,2 mg/kg) được hòa tan trong chất dẫn (PBS) và được dùng bằng cách tiêm dưới da (SC) (10 ml/kg) vào chuột nhất DIO được cho ăn *tùy thích* 30 đến 90 phút trước khi bắt đầu chu kỳ tối mỗi 3 ngày trong 21 ngày. Các lần tiêm SC được thực hiện vào ngày 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 và 22. Cân nặng cơ thể và mức hấp thu thức ăn được đo hằng ngày trong toàn bộ nghiên cứu.

Mức độ thay đổi tuyệt đối về cân nặng cơ thể được tính bằng cách trừ cân nặng cơ thể của cùng con vật trước khi tiêm phân tử lần thứ nhất. Vào ngày 17, các con vật bị bỏ đói ở 0600 và ở 1300, máu được lấy để đo glucoza và insulin máu khi đói. Glucoza máu được đo bằng máy đo đường huyết AccuChek® (Roche Diabetes Care, Inc.; Indianapolis, IN). Insulin được đo bằng ELISA (MSD, Rockville, MD). Chỉ số kháng insulin được tính bằng công thức:

$$\text{HOMA IR} = \text{insulin huyết tương khi đói (mIU/l)} * (\text{glucoza máu khi đói (mmol/l)} / 22,5).$$

Vào ngày 24, các con vật được làm chết trước chu kỳ sáng tối, và gan được lấy ra và được kết đông. Các triglycerit gan, được xác định từ các dịch treo mô đồng thể của gan thu được khi làm chết, và các chất phân tích trong huyết tương được đo trên máy phân tích lâm sàng Hitachi Modular P.

Bảng 4: Tác dụng của việc điều trị bằng hợp chất 2 đến cân nặng cơ thể và mức hấp thu thức ăn tích lũy ở chuột nhất DIO vào ngày 16.

Điều trị	Mức độ thay đổi cân nặng cơ thể so với lần đo ban đầu (g)	Mức hấp thu thức ăn tích lũy (g)
Chất dẫn (10 ml/kg, SC)	-0,68±0,14	41,30±0,94
Hợp chất 2 (0,002 mg/kg)	-4,58±0,71*	33,22±0,99*
Hợp chất 2 (0,006 mg/kg)	-8,64±0,41*	29,24±1,41*
Hợp chất 2 (0,02 mg/kg)	-11,82±0,57*	23,00±1,86*
Hợp chất 2 (0,06 mg/kg)	-9,02±0,57*	23,86±0,96*
Hợp chất 2 (0,2 mg/kg)	-9,08±0,59*	27,52±1,30*

Tất cả dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình cộng ± SEM của 5 con vật trên mỗi nhóm. Các trị số được biểu thị dưới dạng trung bình cộng ± SEM với n = 5. *p<0,05 so với nhóm chất dẫn; ANOVA một chiều, tiếp theo là phương pháp của Dunnett để so sánh nhiều cặp.

Bảng 5: Tác dụng của việc điều trị bằng hợp chất 2 đến glucoza huyết thanh, Cholesterol, Alanin Aminotransferaza (Alanine Aminotransferase - ALT) và các triglyxerit gan ở chuột nhắt DIO vào ngày 24.

Điều trị	Glucoza (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)	ALT (IU/l)	Triglyxerit gan (mg/g mô)
Chất dẫn (10 ml/kg, SC)	339,18±30,58	271,80±12,02	310,80±34,92	210,10±11,82
Hợp chất 2 (0,002 mg/kg)	317,52±17,95	220,80±4,89*	231,60±25,39	69,88±18,88*
Hợp chất 2 (0,006 mg/kg)	261,00±20,43*	177,00±7,82*	159,60±73,32*	46,56±13,85*
Hợp chất 2 (0,02 mg/kg)	223,38±16,02*	172,80±18,51*	87,00±13,04*	24,82±8,80*
Hợp chất 2 (0,06 mg/kg)	245,94±10,10*	199,20±15,34*	114,60±22,72*	58,90±14,45*
Hợp chất 2 (0,2 mg/kg)	241,02±8,88*	167,40±8,72*	112,80±19,15*	34,62±10,88*

Các trị số được biểu thị dưới dạng trung bình cộng ± SEM với n = 5. *p<0,05 so với nhóm chất dẫn; ANOVA một chiều, tiếp theo là của Dunnett.

Bảng 6: Tác dụng của việc điều trị bằng hợp chất 2 đến glucoza, insulin máu khi đói và HOMA-IR ở chuột nhắt DIO vào ngày 17.

Điều trị	Glucoza khi đói (mmol/l)	Insulin khi đói (mIU/l/ml)	HOMA-IR
Chất dẫn (10 ml/kg, SC)	6,80±0,28	85,64±13,68	25,78±4,13
Hợp chất 2 (0,002 mg/kg)	6,64±0,28	45,94±4,66*	13,51±1,32*
Hợp chất 2 (0,06 mg/kg)	5,16±0,53*	26,44±2,95*	6,22±1,15*

Tất cả dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình cộng ± SEM của 5 con vật trên mỗi nhóm từ ngày 17.

Phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng ANOVA các phép đo lặp lại, tiếp theo là phương pháp của Dunnett để so sánh nhiều cặp.

Sự khác biệt có ý nghĩa được nhận diện ở p<0,05.

Hợp chất 2 làm giảm theo cách phụ thuộc liều cân nặng cơ thể và mức hấp thu thức ăn ở chuột nhất DIO được, điều này chứng tỏ nó có thể được sử dụng trong việc trị liệu để gây ra sự giảm cân nặng và cho bệnh béo phì (bảng 4). Hợp chất 2 cũng làm giảm glucoza huyết thanh, điều này chứng tỏ nó có thể được sử dụng trong trị liệu bệnh đái tháo đường (bảng 5). Hợp chất 2 còn làm giảm cholesterol, điều này chứng tỏ nó có thể được sử dụng trong trị liệu rối loạn lipid máu (bảng 5). Hợp chất 2 cải thiện sức khỏe của gan (được chứng minh bởi sự giảm ALT huyết thanh) và làm giảm triglycerit gan, điều này chứng tỏ nó có thể được sử dụng trong trị liệu NASH (bảng 5). Việc kiểm tra glucoza và insulin máu khi đói được thực hiện vào ngày 17 chứng tỏ độ nhạy của insulin được tăng lên và chỉ số kháng insulin giảm, điều này còn hỗ trợ khả năng sử dụng hợp chất 2 trong trị liệu bệnh đái tháo đường (bảng 6).

Ví dụ 5: Độ ổn định của các cấu trúc Fc-GDF15 khác nhau

Sự kết tập protein trong sản phẩm được là không mong muốn bởi vì nó làm giảm hiệu suất sản xuất tổng cộng, và nó có thể kích hoạt đáp ứng miễn dịch khi được dùng cho các cá thể. Do đó, việc duy trì hợp chất ở trạng thái monome, hoặc trong trường hợp này, homodime được gắn kết cộng hóa trị, là được ưu tiên.

Để thử nghiệm khuynh hướng của các protein dung hợp GDF15 khác nhau để kết tập và/hoặc thoái hóa, các protein dung hợp Fc-GDF15 khác nhau có thể được biểu hiện trong các tế bào CHO của động vật có vú. Các protein dung hợp Fc-GDF15 có thể được bắt giữ lên trên Mab Select Protein A (GE; Piscataway, NJ) với dung dịch đệm chạy PBS (độ pH 7,4); một cách nhanh chóng có thể được rửa bằng dung dịch đệm chạy để loại bỏ chất không được gắn kết đặc hiệu; và có thể được rửa giải bằng 20 mM axit axetic và 5 mM axit xitric, độ pH 3. Các phân đoạn chứa các protein Fc-GDF15 được gộp lại, và độ pH được trung hòa bằng cách bổ sung 1/10 thể tích của 1 M Tris độ pH 8,0.

Phần gộp bắt giữ protein A sau đó được phân tích bằng sắc ký loại cỡ (size exclusion chromatography - SEC) để xác định % khối kết tập khối lượng phân tử cao (HMW), cho thấy sự kết tập xảy ra nhiều thể nào. Phương pháp phân tách SEC được thực hiện trên Tosoh Bioscience 3000SWXL, cột 5 μ m với kích thước 30 cm x 0,78 cm. Pha động là PBSx1, 350 mM NaCl (độ pH 7,4) ở tốc độ dòng là 0,5 ml/phút. Các mẫu nồng độ thấp ban đầu được áp dụng dưới dạng các lần tiêm 10

mcl và được giám sát ở bước sóng hấp thụ là 214 nm. Loại % LMW cho thấy độ ổn định hóa học, hoặc các sản phẩm phân hủy khối lượng phân tử nhỏ của hợp chất.

Bảng 7: So sánh độ ổn định vật lý và hóa học của các protein dung hợp Fc-GDF15 khác nhau.

Hợp chất	% HMW	% LMW
Hợp chất 2 (bao gồm Fc monome)	4,1	2,3
Hợp chất 3 (bao gồm Fc bộ đôi)	60,8	3,6
Hợp chất 4 (bao gồm Fc heterodime)	2,0	49,1

Cấu trúc protein dung hợp Fc-GDF15 bộ đôi (hai phần Fc tương tự của kháng thể được gắn với nhau giữa các đầu, chứa vùng bản lề, và sau đó, được gắn với phân tử GDF15 tại đó các phần GDF15 sau đó tự liên kết để tạo ra dime), hợp chất 3 (homodime của hai phân tử, mỗi phân tử bao gồm SEQ ID NO:5) có 60,8% HMW so với 4,1% HMW của hợp chất 2. Điều này gợi ý rằng hợp chất 2 có độ ổn định vật lý tốt hơn, với mức độ kết tập thấp hơn và ít nguy cơ của các khối kết tập sinh miễn dịch hơn so với cấu trúc protein dung hợp Fc-GDF15 bộ đôi.

Fc-GDF15 heterodime (hai phần Fc khác nhau của kháng thể mà liên kết với nhau cạnh nhau và tại đó một phần Fc (chuỗi B, SEQ ID NO:17) được liên kết với một phần Fc khác mà được gắn với phân tử GDF15 (Chuỗi A, SEQ ID NO:6) và tại đó các phần GDF15 sau đó tự liên kết để tạo ra homodime), hợp chất 4 (homodime của hai phân tử, mỗi phân tử bao gồm heterodime của SEQ ID NO:6 & SEQ ID NO:17) có loại LMW 49,1% cao so với hợp chất 2, mà chỉ có 2,3% LMW, gợi ý rằng hợp chất 2 có độ ổn định hóa học tốt hơn và khuynh hướng giảm các phân cắt hóa học hoặc phân giải protein. Độ ổn định hóa học và việc tránh sự phân hủy giúp giữ được hiệu lực của hợp chất trong các khoảng thời gian dài. Ngoài ra, sự phân hủy ít hơn làm giảm đến mức tối thiểu nguy cơ rằng các sản phẩm phụ của quá trình phân hủy sẽ gây ra các vấn đề thêm nữa về hiệu lực bởi việc cản trở hoạt chất trong chế phẩm hoặc nguy cơ các sản phẩm phụ của quá trình phân hủy sẽ kết tập và gây ra các vấn đề về khả năng sinh miễn dịch.

Ví dụ 6: Độ ổn định của các đột biến Fc kép so với đơn

Cấu trúc duy nhất của phần Fc của các hợp chất trong bản mô tả này, với hai đột biến đặc hiệu, bất ngờ thể hiện độ ổn định tốt hơn và mức độ hòa tan cao hơn ở

các nồng độ cao so với cấu trúc Fc với mỗi một trong số các đột biến riêng rẽ. Hai Fc với đột biến đơn được tạo ra để phá vỡ sự liên kết CH3/CH3 trong IgG4-Fc và để tạo ra cấu trúc Fc monome. Thử đột biến đơn thứ nhất là hợp chất 7, với glutamin được thay cho phenylalanin ở vị trí 405 trong chuỗi nặng IgG4 của người có chiều dài đầy đủ, tương ứng với vị trí 173 trong SEQ ID NO:2 (vị trí 175 trong SEQ ID NO:9). Thử đột biến đơn thứ hai được tạo ra là hợp chất 8, Fc với axit glutamic được thay cho tyrosin ở vị trí 407 trong chuỗi nặng IgG4 của người có chiều dài đầy đủ, tương ứng với vị trí 175 trong SEQ ID NO:2 (vị trí 177 trong SEQ ID NO:10). Thử đột biến Fc kép, hợp chất 5 (SEQ ID NO:7), cũng được tạo ra, và nó chứa cả hai đột biến Fc từ các hợp chất 7 và 8. Hợp chất 5 có trình tự giống như hợp chất 2 ngoại trừ hai axit amin bổ sung, AP, có mặt ở đầu tận cùng N của vùng Fc trong hợp chất 5. Các hợp chất 2, 5, 7 và 8 không có vùng bản lề của ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:8) để đảm bảo sự tạo thành Fc IgG4 monome.

Các hợp chất trong ví dụ này được biểu hiện trong các tế bào CHO của động vật có vú, và môi trường thu hoạch được được bắt giữ lên trên Mab Select Protein A (GE) với dung dịch đệm chạy PBS (độ pH 7,4); một cách nhanh chóng được rửa bằng dung dịch đệm chạy để loại bỏ chất không được gắn kết đặc hiệu; và được rửa giải bằng 20mM axit axetic và 5 mM axit xitric, độ pH 3,0. Các phân đoạn chứa các protein GDF15 được gộp lại, và độ pH được trung hòa bằng cách bổ sung 1/10 thể tích của 1 M Tris độ pH 8,0.

Sau đó, các phần gộp bắt giữ protein A đã được trung hòa được trao đổi chất đệm trong 10 mM xitrat độ pH 5,0 trong máy cô ly tâm Amicon Ultra 0,5 ml với 10 MWCO. Các thử đột biến Fc-GDF15 đơn và kép tiếp theo được nỗ lực để cô đặc lên đến hoặc trên 10 mg/ml bằng cách sử dụng máy cô ly tâm Amicon Ultra 0,5 ml với 10 MWCO.

Bảng 8: Mức độ hòa tan lớn nhất của các thử dung hợp GDF15 ở độ pH 5,0.

Hợp chất	Mức độ hòa tan lớn nhất ở độ pH 5,0 (mg/ml)	Quan sát bằng mắt thường
Homodime của hợp chất 7 (SEQ ID NO:9)	1,7	Không thể đạt được 10 mg/ml; sự kết tủa quan sát được trong khi cô đặc
Homodime của hợp chất 8 (SEQ ID NO:10)	6,7	Không thể đạt được 10 mg/ml; sự kết tủa quan sát được trong khi cô đặc

Homodime của hợp chất 5 (SEQ ID NO:7)	9,8	Dung dịch trong
Đối chứng chi Fc IgG4 monome	12,0	Dung dịch trong

Các kết quả thể hiện rằng các thể đột biến Fc đơn, các homodime của hợp chất 7 và hợp chất 8, có mức độ hòa tan giảm khi so với thể đột biến Fc kép, homodime của hợp chất 5. Homodime của hợp chất 7 không thể đạt được 10 mg/ml do sự kết tủa và tổn hao nguyên liệu. Homodime của hợp chất 8 thể hiện độ hòa tan cải thiện khi so với homodime của hợp chất 7; tuy nhiên, nó không thể đạt được 10 mg/ml do sự tổn hao nguyên liệu trong quá trình cô đặc. Homodime của hợp chất 5, với sự đột biến kép mới trong Fc, giữ được mức độ hòa tan ở 9,8 mg/ml. Đối chứng chỉ Fc IgG4 monome hòa tan được lên đến 12 mg/ml.

Ví dụ 7: So sánh độ ổn định hóa học đối với các cầu nối linh động hoặc cố định

Để thử nghiệm độ ổn định hóa học của các hợp chất GDF15 trong bản mô tả này, các hợp chất như vậy có thể được thẩm tách qua đêm ở 4°C vào trong các dung dịch đệm sau: 10 mM xitrat, pH6 (C6), 10 mM xitrat, pH7 (C7), 10 mM Tris, độ pH 7,0 (T7), 10 mM Tris, độ pH 8,0 (T8) hoặc 1x PBS, độ pH 7,4 (PBS). Để đánh giá độ ổn định trong thời gian dài của các thể dung hợp Fc-GDF15, các dung dịch protein 1,0 mg/ml trong các dung dịch đệm tương ứng có thể được bảo quản ở 4°C, 25°C và 40°C trong 4 tuần, và % LMW được xác định bằng SEC phân tích.

Phương pháp phân tách SEC có thể được thực hiện trên Tosoh Bioscience 3000SWXL, cột 5 μm với kích thước 30 cm x 0,78 cm. Pha động có thể là PBS, 350 mM NaCl, độ pH 7,4 ở tốc độ dòng là 0,5 ml/phút. Các mẫu nồng độ thấp ban đầu có thể được áp dụng dưới dạng các lần tiêm 10 μl và được giám sát ở bước sóng hấp thụ là 214 nm.

Các thay đổi về độ ổn định hóa học, đo được bằng % LMW, được đánh giá so với các mẫu thời điểm 0. Như được xác định bằng các nghiên cứu được thực hiện về cơ bản như được mô tả trên đây, sự phát triển % LMW đối với các hợp chất GDF15 được tóm tắt trong bảng 9.

Các hợp chất được thử nghiệm là hợp chất 2, homodime của hợp chất 1 (SEQ ID NO:2), với cầu nối G4-AP10-G4 cố định, homodime của hợp chất 5 (SEQ ID NO:7) với cầu nối L5Q linh động (GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ

(SEQ ID NO:12)), và homodime của hợp chất 6 (SEQ ID NO:11), với cầu nối G4S-AP10-G4S cố định.

Bảng 9: Sự phát triển về % LMW đối với các hợp chất GDF15 ở 1 mg/ml như được xác định bằng SEC phân tích.

	Sự phát triển % LMW ở 1 mg/ml sau 4 tuần bảo quản ở 4°C, 25°C và 40°C								
	Xitrat pH 6,0			Xitrat pH 7,0 hoặc Tris pH 7,0			Tris pH 8,0 hoặc PBS pH 7,4		
	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
Hợp chất 2 Cầu nối: GGGG-AP10- GGGG	0	0	0,75	0	0,36	3,45	0,15	0,99	7,09
Homodime của hợp chất 5 Cầu nối: L5Q	0,37	0,81	3,99	0,56	1,8	6,63	0,71	2,8	10,5
Homodime của hợp chất 6 Cầu nối: GGGGS-AP10- GGGGS	1,65	0,76	2,7	1,52	1,2	5,76	1,83	1,52	5,65

Cầu nối L5Q có % LMW cao hơn sau khi bảo quản ở 25°C và 40°C so với mỗi trong số hai cầu nối AP10, gợi ý khuynh hướng phân hủy hóa học cao hơn đối với các protein dung hợp GDF15 chứa cầu nối linh động L5Q so với protein chứa cầu nối cố định AP10 (APAPAPAPAPAPAPAPAPAP; SEQ ID NO:13). Ngoài ra, homodime của hợp chất 6, với cầu nối chứa G4S (GGGGS; SEQ ID NO:14), có % LMW cao hơn so với hợp chất 2, với cầu nối chứa G4 (GGGG; SEQ ID NO:15), trong hầu hết các điều kiện, gợi ý độ ổn định hóa học lớn hơn của hợp chất 2 với cầu nối G4-AP10-G4 của nó.

Độ ổn định hóa học và vật lý của các hợp chất GDF15 với cầu nối cố định (hợp chất 2 và hợp chất 6) và cầu nối linh động (hợp chất 5) có thể được đánh giá ở nồng độ cao là 10 mg/ml. Các hợp chất trước tiên có thể được thẩm tách O/N ở 4°C vào trong các dung dịch đệm sau: (a) 10 mM xitrat độ pH 6,5; (b) 10 mM xitrat độ pH 6,5, 150 mM NaCl; và (c) 10 mM xitrat độ pH 6,5, 0,02% Polysorbate 80. Các tá được như 150 mM NaCl và 0,02% Polysorbate được bổ sung vào chế phẩm để thử nghiệm tác dụng của chúng đến độ ổn định hóa học và vật lý của các thể dung hợp GDF15. Tiếp theo, các hợp chất có thể được cô đặc đến 10 mg/ml bằng cách sử

dụng máy cô quay Millipore 10.000 MWCO, 15 ml. Sau khi cô đặc, % HMW và % LMW có thể được xác định bằng SEC bằng cách sử dụng protein đã được cô đặc ($t=0$).

Phương pháp phân tách SEC có thể được thực hiện trên Tosoh Bioscience 3000SWXL, cột 5 μm với kích thước 30 cm x 0,78 cm. Pha động là PBS, 350 mM NaCl, độ pH 7,4 ở tốc độ dòng là 0,5 ml/phút. Các mẫu 10 mg/ml được pha loãng đến 1 mg/ml trong các dung dịch đệm tương ứng của chúng và sau đó, được áp dụng dưới dạng các lần tiêm 10 μl và được giám sát ở bước sóng hấp thụ là 214 nm.

Các chế phẩm 10 mg/ml có thể được ủ trong 4 tuần ở 4°C, 25°C và 40°C để đánh giá độ ổn định trong thời gian dài dưới các điều kiện bất lợi. % LMW và % HMW có thể được xác định lại ở thời gian 4 tuần ($t = 4\text{w}$) bằng SEC. Mức độ thay đổi về độ ổn định hóa học (% LMW) có thể được đánh giá so với các mẫu thời điểm 0.

Bảng 10: Độ ổn định hóa học được biểu thị dưới dạng sự phát triển tính theo % LMW đối với các hợp chất GDF15 ở 10 mg/ml.

	% LMW sự phát triển ở 10 mg/ml sau 4 tuần bảo quản ở 4°C, 25°C và 40°C								
	Xitrat pH 6,5			Xitrat pH 6,5 + 150 mM NaCl			Xitrat pH 6,5 + 0,02% Polysorbate 80		
	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
Homodime của hợp chất 5 Cầu nối: L5Q	0,52	1,03	6,39	0,25	0,86	5,11	0,27	1,04	6,2
Homodime của hợp chất 6 Cầu nối: GGGGS-AP10-GGGGS	0	0,2	2,73	0	0,3	2,52	0	0,31	2,8

Bảng 11: Độ ổn định vật lý được biểu thị dưới dạng sự phát triển tính theo % HMW đối với các hợp chất GDF15 ở 10 mg/ml.

	% HMW sự phát triển ở 10 mg/ml sau 4 tuần bảo quản ở 4, 25 và 40°C								
	Xitrat pH 6,5			Xitrat pH 6,5 + 150mM NaCl			Xitrat pH 6,5 + 0,02% Polysorbate 80		
	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
Homodime của hợp chất 5 Cầu nối: L5Q	0,06	0,23	3,04	0,05	0,19	7,3	0,1	0,24	3,13
Homodime của hợp chất 6 Cầu nối: GGGGS-AP10-GGGGS	0	0,1	2,98	0	0,33	7,18	0	0	2,85

Như được thể hiện trong bảng 10, homodime của hợp chất 5 ở 10 mg/ml, chứa cầu nối linh động, cho thấy mức cao hơn của % LMW so với homodime của hợp chất 6, với cầu nối cố định, ở 25°C và 40°C, điều này chứng tỏ độ ổn định hóa học thấp hơn.

Như được thể hiện trong bảng 11, homodime của hợp chất 5 ở 10 mg/ml, chứa cầu nối linh động, cho thấy mức cao hơn của % HMW so với homodime của hợp chất 6, với cầu nối cố định, điều này chứng tỏ độ ổn định vật lý thấp hơn. Độ ổn định hóa học và/hoặc vật lý thấp có thể gây ra các vấn đề kết tủa và khả năng sinh miễn dịch có thể.

Ví dụ 8: Tập tính được động học của các hợp chất GDF15

Tập tính được động học của hợp chất 2 được thử nghiệm ở khí. Nồng độ trong huyết tương của các hợp chất GDF15 được xác định bằng phương pháp ELISA ở Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN). ELISA kẹp sử dụng kháng thể đa dòng của dê kháng GDF15 của người (R&D Systems/AF957) hoặc kháng thể đơn dòng của chuột nhắt kháng GDF15 của người/động vật linh trưởng (R&D Systems/MAB957) được phủ ở 1 hoặc 3 µg/ml làm chất phản ứng bất giữ. Sau đó, hợp chất GDF15 được phát hiện bằng kháng thể pFc-HRP của chuột nhắt kháng IgG4 của người (Southern Biotech/9190-05) hoặc kháng thể Fc-HRP của chuột nhắt kháng IgG của

người (Southern Biotech/9200-05). Các đĩa được phát triển bằng cách sử dụng hệ cơ chất tetramethylbenzidin (TMB) (SeraCare/5120), và phản ứng enzym được làm ngừng bằng dung dịch ngừng TMB (KPL/50-85-04).

Khí Cynomolgus được dùng liều đơn dưới da (0,3 mg/kg) của hợp chất 2 trong PBS (độ pH 7,4) ở thể tích là 0,5 ml/kg. Máu được lấy từ mỗi con vật ở thời điểm trước khi dùng liều và ở 6, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 408 và 504 giờ sau khi dùng liều để xác định đặc điểm dược động học.

Bảng 12: Các thông số dược động học riêng rẽ và trung bình cộng sau khi dùng liều dưới da đơn 0,3 mg/kg cho khí Cynomolgus được.

Hợp chất (Liều)	Động vật	$t_{1/2}$ (giờ)	T_{max} (giờ)	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	AUC_{0-inf} (giờ* $\mu\text{g/ml}$)	CL/F (ml/hr/kg)
Hợp chất 2 (0,3 mg/kg)	1	118	48	1,96	206	1,45
	2	116	48	2,44	184	1,63
	Trung bình cộng	117	48	2,20	195	1,54

Các từ viết tắt: AUC_{0-inf} = diện tích dưới đường cong từ thời điểm 0 giờ đến vô cực, CL/F = độ thanh thải/độ sinh khả dụng, T_{max} = thời gian đến nồng độ lớn nhất, C_{max} = nồng độ trong huyết tương lớn nhất quan sát được, $t_{1/2}$ = thời gian bán thải.

Dữ liệu trong bảng 12 thể hiện rằng $t_{1/2}$ ở khí được đo ở 117 giờ. Đây là $t_{1/2}$ dài bất ngờ đối với phân tử Fc monome. Ngoài ra, kiểu dược động học ở khí là ổn định trong cửa sổ thời gian kéo dài, điều này gợi ý rằng kiểu dược động học của hợp chất 2 ở người cũng có thể ổn định rõ rệt trong cửa sổ thời gian kéo dài ở khoảng trị liệu để cho phép mức dược chất ổn định trong dòng máu với việc dùng liều mỗi tuần một lần.

CÁC TRÌNH TỰ

Các trình tự axit nucleic và/hoặc axit amin sau được đề cập đến trong bản mô tả này và được đưa ra dưới đây để tham khảo.

SEQ ID NO:1 – GDF15 của người trưởng thành

ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRLASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACP
SQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQ
TYDDLLAKDCHCI

SEQ ID NO:2 – Trình tự nhân tạo

EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLGGGGGAPAPAPAPAPAPAPAPAPAGGGGGDHCPLGPG
RCCRLHTVRLASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQI
KTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

SEQ ID NO:3 – Trình tự dẫn đầu

METDTLLLWVLLLVPGSTG

SEQ ID NO:4 – Trình tự nhân tạo

QTNNCTYLREQCLRDANGCKHAWRVMEDACNDSDPGDPCKMRNSSYCN
LSIQYLVESNFQFKECLCTDDFYCTVNKLLGKKCINKSDNVKEDKFKWNL
TTRSHHGFKGMWSCLEVAEACVGDVVCNAQLASYLKACSANGNPCDLK
QCQAAIRFFYQNIPFNIAQMLAFCDCAQSDIPCQQSKEALHSKTCAVNMVP
PPTCLSVIRSCQNDELCCRHYRTFQSKCWQRVTRKCHEDENCISTLSKQDL
TCSGSDDCKAAYIDILGTVLQV
QCTCRTITQSEESLCKIFQHMLHRKSCFNYP TLSNVKGMALYTRKHANKH
HHHHH

SEQ ID NO:5 – Trình tự nhân tạo

ERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY

KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
 GSGGGGSGGGGSGGGGSSERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
 VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGG
 GGASARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCI
 GACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTG
 VSLQTYDDLLAKDCHCI

SEQ ID NO:6 – Trình tự nhân tạo

DKTHTCPPCPAPALGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
 SNGTHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ
 FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLSQTY
 DDLLAKDCHCI

SEQ ID NO:7 – Trình tự nhân tạo

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
 SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGDHCP
 LGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANM
 HAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLSQTYDDLLAK
 DCHCI

SEQ ID NO:8 – Mảnh Fc

ESKYGPPCPPCP

SEQ ID NO:9 – Trình tự nhân tạo

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
 SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFQLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLGLGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGDHCP
 LGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANM
 HAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAK
 DCHCI

SEQ ID NO:10 – Trình tự nhân tạo

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
 SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLESRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLGLGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGDHCP
 LGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANM
 HAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAK
 DCHCI

SEQ ID NO:11 – Trình tự nhân tạo

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
 SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFQLESRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLGLGGGGGSAPAPAPAPAPAPAPAPAPGGGGSGDHCP
 LGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANM
 HAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAK
 DCHCI

SEQ ID NO:12 – Trình tự nhân tạo

GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ

SEQ ID NO:13 – Trình tự nhân tạo

APAPAPAPAPAPAPAPAPAP

SEQ ID NO:14 – Trình tự nhân tạo

GGGGS

SEQ ID NO:15 – Trình tự nhân tạo

GGGG

SEQ ID NO:16 – Trình tự nhân tạo

gaggccgcccggggaccatcagttcttctgttcccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccggaccctga
 ggtcacgtgctggtggtggacgtgagccaggaagacccccgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggag
 gtgcataatgccaagacaaagccgcccggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcct
 gcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaa
 accatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgcccccatcccaggaggagatgacc
 aagaaccagggtcagcctgacctgctgtgcaaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggaaagcaatg
 ggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgggtccttccagctcgagagcagggt
 aaccgtggacaagagcagggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccact
 acacacagaagagcctctccctgtctctgggtggcggtggtggagctccagccccagctcctgctcctgcaccagca
 cctgcccccgctccagcaccgcacctggaggagggggcggtgaccactgtcccctggggcctggccggtgttgca
 gactgcatacagtcgggctcctggaagacctgggtgggcagattgggtgctctcacctcgcgaggttcagggtga
 ccatgtgcattggggcttgcctcacaatttcgcgcagctaacatgcacgcccaaatcaaacctccctgcaccggctt
 aaaccggatactgttctgtcctgtgctgcgtgccagcatcctacaaccccatggtgctgatccagaagacggatacag
 ggggtgctactgcagacctatgatgacctcctggccaaagattgccactgtatc

SEQ ID NO:17 – Trình tự nhân tạo

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất chứa SEQ ID NO:2.
2. Hợp chất được cấu thành từ SEQ ID NO:2.
3. Homodime bao gồm hai hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, trong đó các hợp chất được liên kết thông qua ít nhất một liên kết disulfua liên chuỗi giữa gốc xystein của hợp chất thứ nhất và gốc xystein của hợp chất thứ hai.
4. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc 2 hoặc homodime theo điểm 3 và một hoặc nhiều tá dược được dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company

<120> Hợp chất chủ vận yếu tố biệt hóa tăng trưởng 15 và được phẩm chứa hợp chất này

<130> X21678

<140> US 16/369,096

<141> 2019-03-29

<150> US 62/653,759

<151> 2018-04-06

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 1 5 10 15

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 20 25 30

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 35 40 45

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 50 55 60

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 65 70 75 80

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 85 90 95

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 100 105 110

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 115 120 125

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 130 135 140

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

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Gln Leu Glu Ser
 165 170 175

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 180 185 190

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 195 200 205

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro Ala Pro Ala Pro
 210 215 220

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
 245 250 255

His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
 260 265 270

Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro
 275 280 285

Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
 290 295 300

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
 305 310 315 320

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
 325 330 335

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 340 345 350

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 4
<211> 325
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

Gln Thr Asn Asn Cys Thr Tyr Leu Arg Glu Gln Cys Leu Arg Asp Ala
1 5 10 15

Asn Gly Cys Lys His Ala Trp Arg Val Met Glu Asp Ala Cys Asn Asp
20 25 30

Ser Asp Pro Gly Asp Pro Cys Lys Met Arg Asn Ser Ser Tyr Cys Asn
35 40 45

Leu Ser Ile Gln Tyr Leu Val Glu Ser Asn Phe Gln Phe Lys Glu Cys
50 55 60

Leu Cys Thr Asp Asp Phe Tyr Cys Thr Val Asn Lys Leu Leu Gly Lys
65 70 75 80

Lys Cys Ile Asn Lys Ser Asp Asn Val Lys Glu Asp Lys Phe Lys Trp
85 90 95

Asn Leu Thr Thr Arg Ser His His Gly Phe Lys Gly Met Trp Ser Cys
100 105 110

Leu Glu Val Ala Glu Ala Cys Val Gly Asp Val Val Cys Asn Ala Gln
115 120 125

Leu Ala Ser Tyr Leu Lys Ala Cys Ser Ala Asn Gly Asn Pro Cys Asp
130 135 140

Leu Lys Gln Cys Gln Ala Ala Ile Arg Phe Phe Tyr Gln Asn Ile Pro
145 150 155 160

Phe Asn Ile Ala Gln Met Leu Ala Phe Cys Asp Cys Ala Gln Ser Asp
 165 170 175

Ile Pro Cys Gln Gln Ser Lys Glu Ala Leu His Ser Lys Thr Cys Ala
 180 185 190

Val Asn Met Val Pro Pro Pro Thr Cys Leu Ser Val Ile Arg Ser Cys
 195 200 205

Gln Asn Asp Glu Leu Cys Arg Arg His Tyr Arg Thr Phe Gln Ser Lys
 210 215 220

Cys Trp Gln Arg Val Thr Arg Lys Cys His Glu Asp Glu Asn Cys Ile
 225 230 235 240

Ser Thr Leu Ser Lys Gln Asp Leu Thr Cys Ser Gly Ser Asp Asp Cys
 245 250 255

Lys Ala Ala Tyr Ile Asp Ile Leu Gly Thr Val Leu Gln Val Gln Cys
 260 265 270

Thr Cys Arg Thr Ile Thr Gln Ser Glu Glu Ser Leu Cys Lys Ile Phe
 275 280 285

Gln His Met Leu His Arg Lys Ser Cys Phe Asn Tyr Pro Thr Leu Ser
 290 295 300

Asn Val Lys Gly Met Ala Leu Tyr Thr Arg Lys His Ala Asn Lys His
 305 310 315 320

His His His His His
 325

<210> 5
 <211> 616
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 5

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

Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 245 250 255
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg Lys Ser Ser
 260 265 270
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 275 280 285
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 290 295 300
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 305 310 315 320
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 325 330 335
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 340 345 350
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 355 360 365
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 370 375 380
 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 385 390 395 400
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 405 410 415
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 420 425 430
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 435 440 445

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 450 455 460

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 465 470 475 480

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
 485 490 495

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro
 500 505 510

Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu
 515 520 525

Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln
 530 535 540

Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn
 545 550 555 560

Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr
 565 570 575

Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu
 580 585 590

Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu
 595 600 605

Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 610 615

<210> 6
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6

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

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly .
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Gly Thr His Cys
 245 250 255

Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser
 260 265 270

Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val
 275 280 285

Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala
 290 295 300

Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp
 305 310 315 320

Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val
 325 330 335

Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp
 340 345 350

Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 355 360

<210> 7
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

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

Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp
 260 265 270

Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala
 275 280 285

Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr
 290 295 300

Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val
 305 310 315 320

Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly
 325 330 335

Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys
 340 345 350

Ile

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 9
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 9

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

Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Gln Gly Gly Gly Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys
 245 250 255

Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp
 260 265 270

Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala
 275 280 285

Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr
 290 295 300

Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val
 305 310 315 320

Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly
 325 330 335

Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys
 340 345 350

Ile

<210> 10
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

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

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

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

Glu Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180 185 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly
 210 215 220

Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Gln Gly Gly Gly Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys
 245 250 255

Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp
260 265 270

Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala
275 280 285

Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr
290 295 300

Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val
305 310 315 320

Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly
325 330 335

Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys
340 345 350

Ile

<210> 11
<211> 355
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 11

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

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

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

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

Glu Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180 185 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala
 210 215 220

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg
 245 250 255

Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp
 260 265 270

Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile
 275 280 285

Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile
 290 295 300

Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys
 305 310 315 320

Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp
 325 330 335

Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys
 340 345 350

His Cys Ile
 355

<210> 12
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

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

Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln
 20 25

<210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro
 20

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15

Gly Gly Gly Gly
 1

<210> 16
 <211> 1053
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16
 gaggcgcgcg ggggaccatc agtcttctctg ttccccccaa aacccaagga cactctcatg 60
 atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg gtggtggacg tgagccagga agaccccag 120
 gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 180
 gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 240
 tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc 300
 gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc 360
 ccatcccagg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 420
 taccgccgcg acatcgccgt ggagtgggaa agcaatgggc agccggagaa caactacaag 480


```

accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttccagc tcgagagcag gctaaccgtg      540
gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg      600
cacaaccact acacacagaa gagcctctcc ctgtctctgg gtggcgggtgg tggagctcca      660
gccccagctc ctgctcctgc accagcacct gcccccgctc cagcaccgcg acctggagga      720
gggggcggtg accactgtcc cctggggcct ggccgggtgtt gcagactgca tacagtccgg      780
gcctccctgg aagacctggg ttgggcagat tgggtgctct cacctcgcga ggttcagggtg      840
accatgtgca ttggggcttg tccctcacia ttctgcgcag ctaacatgca cgcccaaadc      900
aaaacctccc tgcaccggct taaaccggat actgttctct ctccctgctg cgtgccagca      960
tcctacaacc ccatggtgct gatccagaag acggatacag ggggtgtcact gcagacctat     1020
gatgacctcc tggccaaaga ttgccactgt atc                                     1053

```

<210> 17
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 17

```

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
1              5              10              15

```

```

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                20              25              30

```

```

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
                35              40              45

```

```

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50              55              60

```

```

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65              70              75              80

```

```

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85              90              95

```

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

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

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

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225