



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

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



1-0041393

(51)^{2020.01} A61K 38/22; A61P 31/04; A61P 15/14; (13) B
A61K 47/60; A61P 15/00

(21) 1-2020-01974

(22) 10/10/2018

(86) PCT/US2018/055203 10/10/2018

(87) WO 2019/075053 18/04/2019

(30) 62/570,877 11/10/2017 US

(45) 25/10/2024 439

(43) 25/08/2020 389

(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); RASHID, Md Harunur (US).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) DƯỢC PHẨM CHỨA BIẾN THỂ YẾU TỐ KÍCH THÍCH TĂNG SINH BẠCH CẦU HẠT CỦA LỢN

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa biến thể yếu tố kích thích tăng sinh bạch cầu hạt của lợn (pG-CSF: porcine granulocyte colony stimulating factor). Các biến thể pG-CSF này là hữu ích trong điều trị hoặc phòng ngừa hoặc làm giảm tỷ lệ mắc nhiễm khuẩn ở lợn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến được phẩm chứa polypeptit là biến thể yếu tố kích thích tăng sinh bạch cầu hạt của lợn (pG-CSF: porcine granulocyte colony stimulating factor) chứa axit amin tổng hợp. Axit amin tổng hợp này được biến đổi bằng cách gắn polyetylen glycol. Biến thể pG-CSF được gắn polyetylen glycol được sử dụng để điều trị nhiễm khuẩn ở lợn. Khi lợn này là lợn nái ngay trước, trong hoặc sau khi sinh, nhiễm khuẩn có thể là hội chứng viêm vú, viêm tử cung, và mất sữa (MMA: mastitis, metritis, and agalactia). Việc làm giảm nhiễm khuẩn ở lợn nái chữa làm cải thiện sự sống sót của lợn con.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tác động kinh tế của các bệnh truyền nhiễm trong ngành chăn nuôi động vật làm thực phẩm đã được ghi nhận rõ ràng. Các bệnh truyền nhiễm làm giảm lợi nhuận, tăng chi phí sản xuất và gây nguy hiểm cho các sản phẩm thực phẩm, cũng như ảnh hưởng đến hiệu suất, sức khỏe và phúc lợi của động vật. Bệnh có thể gây bệnh tật và tử vong cho động vật mới sinh, động vật còn non (ví dụ: động vật thay thế) hoặc động vật trưởng thành, dẫn đến hậu quả tàn phá trong ngành chăn nuôi động vật làm thực phẩm.

Ở lợn, một trong những bệnh như vậy có thể là hội chứng viêm vú, viêm tử cung, và mất sữa (MMA). Bệnh viêm vú là một bệnh nhiễm khuẩn của bầu vú. Chỉ một hoặc hai tuyến có thể bị ảnh hưởng hoặc nhiễm khuẩn có thể lan sang nhiều tuyến. Bệnh viêm tử cung là bệnh nhiễm khuẩn đường tiết niệu, đôi khi xuất hiện dưới dạng xuất tiết âm hộ. Hội chứng mất sữa là giảm hoặc mất toàn bộ sản lượng sữa của lợn nái. Hội chứng MMA có thể rất khác nhau và có thể không biểu hiện tất cả các triệu chứng trên. Do đó, hội chứng MMA có thể khó phát hiện và chẩn đoán, và nó có thể không được phát hiện cho đến khi lợn con đang bú có dấu hiệu đói, giảm cân hoặc thậm chí tử vong.

Vì hội chứng MMA khó phát hiện, nên điều trị phòng bệnh được ưu tiên. Việc sử dụng dược chất kháng sinh, đặc biệt là kháng sinh nhóm sử dụng chung, không được khuyến khích ở động vật sản xuất thực phẩm, vì vậy một phương pháp điều trị không sử dụng kháng sinh được ưu tiên hơn trong điều trị lợn. Xytokin như pG-CSF có thể làm

tăng số lượng bạch cầu trung tính ở động vật, do đó tạo ra hệ thống miễn dịch bẩm sinh để đáp ứng nhanh chóng với nhiễm khuẩn. Việc sửa đổi biến thể pG-CSF bằng PEG có thể kéo dài được động học và tính ổn định của xytokin, do đó làm tăng tác dụng của nó.

G-CSF bò được gắn polyetylen glycol có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm vú ở bò sữa (WO2010/011735). G-CSF người được gắn polyetylen glycol cũng đã được mô tả (WO2000/044785). G-CSF lợn thể đại được gắn polyetylen glycol cũng đã được đề cập đến để điều trị các bệnh nhiễm đường hô hấp, chẳng hạn như nhiễm virus (WO2005/025593). Như được bộc lộ ở nhiều khía cạnh khác nhau trong bản mô tả này, biến thể pG-CSF được PEGyl hóa làm tăng số lượng bạch cầu trung tính trong máu của lợn, làm giảm tỷ lệ mắc hội chứng MMA ở lợn nái ngay trước, trong hoặc sau khi sinh và/hoặc cải thiện khả năng sống sót của lợn con.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến biến thể yếu tố kích thích tăng sinh bạch cầu hạt của lợn (pG-CSF) có trình tự liên ứng:

X₁PLSPASSLPQSFLKX₂LEQVRKIQADGAELQERLCATHKLCX₃PQELVLLGHSLGLPQASLSSCSSQALQLTGCLNQLHGGLVLYQGLLQALAGISPELAPALDI LQLDVTDLATNIWLQX₄EDLRX₄APASLPTQGTVPFTSAFQRRAGGVLVVSQQLQSFLELAYRVRLRYLAEP (SEQ ID NO.13). Biến X₁ có thể là dipeptit methionin alanin như nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.9, dipeptit norleuxin alanin như nêu trong SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.10, alanin như nêu trong SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.11, hoặc là vắng mặt như nêu trong SEQ ID NO.8 và SEQ ID NO.12. Biến X₂ có thể là xystein như nêu trong SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.7, và SEQ ID NO.8, hoặc X₂ có thể là serin như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11, và SEQ ID NO.12. Biến X₃ có thể là axit amin tổng hợp. Axit amin tổng hợp này có thể có mặt ở vị trí số 43 (vị trí so với pG-CSF thể đại thành thực như được nêu trong SEQ ID NO.3) như nêu trong SEQ ID NO.13. Axit amin tổng hợp này có thể là para-axetyl phenylalanin (pAF: para-acetyl phenylalanine). Biến X₄ có thể là methionin như nêu trong SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, và SEQ ID NO.12, hoặc X₄ có thể là norleuxin như nêu trong SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.10. Axit amin tổng hợp pAF có thể được liên kết cộng hóa trị với polyetylen glycol (polyethylene glycol-PEG). PEG có thể có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 20

kD đến khoảng 50 kD, hoặc khối lượng phân tử vào khoảng 30 kD. Tốt hơn nếu PEG là PEG mạch thẳng.

Sáng chế đề cập đến biến thể yếu tố kích thích tăng sinh bạch cầu hạt của lợn (pG-CSF) có trình tự:

MAPLSPASSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCATHKLC[pAF]PQEL
VLLGHSGLPQASLSSCSQALQLTGCLNQLHGGLVLYQGGLQALAGISPELAPA
LDILQLDVTDLATNIWLQMEDLRMAPASLPTQGTVPFTSAFQRRAGGVLVVSQ
LQSFLELAYRVLRYLAEP (SEQ ID NO.2), trong đó axit amin tổng hợp para-axetyl phenylalanin (pAF) có mặt ở vị trí số 43 được liên kết cộng hóa trị với PEG mạch thẳng có khối lượng phân tử bằng 30 kD.

Sáng chế đề cập đến được phẩm chứa biến thể pG-CSF bất kỳ theo sáng chế, và ít nhất một chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị nhiễm khuẩn ở lợn bao gồm bước sử dụng lượng điều trị hữu hiệu của biến thể pG-CSF bất kỳ theo sáng chế cho lợn cần điều trị. Nhiễm khuẩn có thể là hội chứng viêm vú, viêm tử cung và mất sữa (MMA). Lợn cần điều trị có thể là lợn nái ngay trước, trong hoặc sau khi sinh. Lượng điều trị hữu hiệu của biến thể pG-CSF có thể nằm trong khoảng từ 10 đến 100 µg/kg khối lượng cơ thể động vật, hoặc nằm trong khoảng từ 30 đến 50 µg/kg khối lượng cơ thể động vật, hoặc khoảng 40 µg/kg khối lượng cơ thể động vật. Bước sử dụng biến thể pG-CSF bất kỳ theo sáng chế có thể được thực hiện ít nhất một lần trước khi sinh 7 ngày hoặc ngắn hơn (tức là vào hoặc sau ngày 107 của thai kỳ), hoặc vào lúc sinh. Theo một số khía cạnh, phương pháp điều trị nhiễm khuẩn ở lợn có thể bao gồm bước sử dụng lần thứ hai biến thể pG-CSF bất kỳ theo sáng chế sau khi sinh trong vòng 14 ngày hoặc ngắn hơn (tức là, trong vòng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc trong vòng 14 ngày sau khi sinh).

Sáng chế mô tả phương pháp kích thích đáp ứng miễn dịch bẩm sinh ở lợn bao gồm bước sử dụng lượng điều trị hữu hiệu của biến thể pG-CSF bất kỳ theo sáng chế cho lợn cần điều trị. Lợn cần kích thích có thể là lợn nái ngay trước, trong hoặc sau khi sinh. Theo các khía cạnh khác, lợn cần kích thích có thể là lợn có hệ thống miễn dịch bị tổn thương hoặc suy yếu. Theo các khía cạnh khác, lợn cần kích thích có thể là lợn có hoặc có nguy cơ phát triển nhiễm bao gồm, ví dụ nhiễm khuẩn hoặc nhiễm virus. Theo một số khía cạnh, phương pháp này có thể kích thích sản xuất các xytokin (ví dụ, interferon

(IFN: interferon), yếu tố hoại tử khối u (TNF: tumor necrosis factor), yếu tố kích thích tăng sinh (CSF: colony stimulating factor), và/hoặc interleukin, và/hoặc kích hoạt hoặc tăng mức độ tế bào miễn dịch như tế bào tua (DC: dendritic cell), tế bào lympho (ví dụ, tế bào B, tế bào T, và tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK: natural killer)), và tủy bào (ví dụ, tế bào Mast, nguyên tủy bào (ví dụ, bạch cầu ưa bazơ, bạch cầu ưa eosin, bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân, và đại thực bào)). Theo một số phương án của các khía cạnh này, phương pháp có thể kích thích hoặc làm tăng cường chức năng kháng khuẩn của bạch cầu trung tính bằng cách, ví dụ, làm tăng chức năng kháng khuẩn của bạch cầu trung tính qua trung gian myeloperoxidaza-hydro peroxit-halogenua.

Trong phương pháp kích thích đáp ứng miễn dịch bẩm sinh, lượng điều trị hữu hiệu của biến thể pG-CSF có thể là nằm trong khoảng từ 10 đến 100 $\mu\text{g/kg}$ khối lượng cơ thể động vật, hoặc nằm trong khoảng từ 30 đến 50 $\mu\text{g/kg}$ khối lượng cơ thể động vật, hoặc khoảng 40 $\mu\text{g/kg}$ khối lượng cơ thể động vật. Bước sử dụng của biến thể pG-CSF bất kỳ theo sáng chế có thể được thực hiện ít nhất một lần vào trước khi sinh 7 ngày hoặc ngắn hơn (tức là vào hoặc sau ngày 107 của thai kỳ), hoặc vào lúc sinh. Theo một số khía cạnh, phương pháp điều trị nhiễm khuẩn ở lợn có thể bao gồm bước sử dụng lần thứ hai biến thể pG-CSF bất kỳ theo sáng chế sau khi sinh trong vòng 14 ngày hoặc ngắn hơn (tức là, trong vòng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc trong vòng 14 ngày sau khi sinh).

Sáng chế mô tả phương pháp làm giảm tỷ lệ tử vong của lợn con bao gồm bước lợn nái sử dụng lượng điều trị hữu hiệu của biến thể pG-CSF bất kỳ theo sáng chế ngay trước, trong hoặc sau khi sinh. Lượng điều trị hữu hiệu của biến thể pG-CSF có thể nằm trong khoảng từ 10 đến 100 $\mu\text{g/kg}$ khối lượng cơ thể động vật, hoặc nằm trong khoảng từ 30 đến 50 $\mu\text{g/kg}$ khối lượng cơ thể động vật, hoặc nằm trong khoảng 40 $\mu\text{g/kg}$ khối lượng cơ thể động vật. Bước sử dụng của biến thể pG-CSF bất kỳ theo sáng chế có thể được thực hiện ít nhất một lần trước khi sinh 7 ngày hoặc ngắn hơn (tức là vào hoặc sau ngày 107 của thai kỳ), hoặc vào lúc sinh. Theo một số khía cạnh, phương pháp làm giảm tỷ lệ tử vong của lợn con có thể bao gồm bước lợn nái ngay trước, trong hoặc sau khi sinh sử dụng lần thứ hai biến thể pG-CSF bất kỳ theo sáng chế trong vòng sau khi sinh 14 ngày hoặc ngắn hơn (tức là, trong vòng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc trong vòng 14 ngày sau khi sinh).

Sáng chế mô tả sử dụng biến thể pG-CSF bất kỳ theo sáng chế để bào chế thuốc cho tình trạng nhiễm khuẩn ở lợn. Nhiễm khuẩn này có thể là hội chứng MMA. Lợn có thể là lợn nái ngay trước, trong hoặc sau khi sinh. Sáng chế mô tả sử dụng biến thể pG-CSF bất kỳ theo sáng chế để bào chế thuốc làm giảm tỷ lệ tử vong của lợn con.

Sáng chế đề cập đến biến thể pG-CSF bất kỳ theo sáng chế sử dụng trong điều trị. Liệu pháp này có thể là việc điều trị hội chứng nhiễm khuẩn ở lợn. Nhiễm khuẩn này có thể là hội chứng MMA. Lợn có thể là lợn nái ngay trước, trong hoặc sau khi sinh. Liệu pháp này có thể làm giảm tỷ lệ tử vong của lợn con. Biến thể pG-CSF có thể được cho lợn nái ngay trước, trong hoặc sau khi sinh sử dụng lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 100 µg/kg khối lượng cơ thể động vật, hoặc ở lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 50 µg/kg khối lượng cơ thể động vật, hoặc khoảng 40 µg/kg khối lượng cơ thể động vật. Biến thể pG-CSF có thể được sử dụng ít nhất một lần trước khi sinh 7 ngày hoặc ngắn hơn (tức là vào hoặc sau ngày 107 của thai kỳ), hoặc vào lúc sinh. Bước sử dụng lần thứ hai có thể là cho lợn nái sau khi sinh 14 ngày hoặc ngắn hơn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “nhiễm khuẩn” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự phát triển của một hoặc nhiều loài vi khuẩn trên hoặc trong da, màng nhày niêm mạc, các tuyến, mắt, tai, đường tiết niệu, đường tiêu hóa, phổi, máu hoặc các cơ quan của động vật. Vi khuẩn này có thể là các loài được phân loại trong giống *Achromobacter*, *Actinobacillus*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Bordatella*, *Brucella*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Mycoplasma*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Sphaerophorus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, hoặc *Vibrio*.

Thuật ngữ “lợn” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lợn, đặc biệt là lợn nuôi (*Sus scrofa domesticus* hoặc *Sus domesticus*) và có thể bao gồm heo siêu nhỏ cũng như những giống được nuôi để sản xuất thịt. Từ “lợn”, “heo” hoặc “lợn” có nghĩa là bao gồm tất cả các giống lợn.

Lợn nái ngay trước, trong hoặc sau khi sinh được định nghĩa là lợn nái mang thai trong vòng các tuần cuối của thai kỳ đến vài tuần đầu tiên sau khi sinh. Sinh đẻ, hoặc đẻ con, thường xảy ra vào lúc khoảng ngày thứ 114 của thai kỳ. Lợn nái ngay trước, trong hoặc sau khi sinh có thể là lợn nái mang thai từ khoảng 100 ngày của thai kỳ cho đến

khoảng 14 ngày sau khi sinh. Lợn con là lợn từ khi sinh ra đến cai sữa vào khoảng 3 tuần tuổi.

Thuật ngữ “axit amin tổng hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ axit amin không phải là một trong số 20 axit amin phổ biến hoặc pyrolysin hoặc selenoxystein. Ví dụ về các axit amin tổng hợp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, para-axetyl phenylalanin (pAF: para-acetyl phenylalanine), axetylglucosaminy-L-serin, và N-axetylglucosaminy-L-threonin. Một số axit amin tổng hợp và kết hợp của chúng vào các polypeptit và biến đổi sau đó được mô tả trong WO2010/011735 và WO2005/074650.

Thuật ngữ “điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ biện pháp kiềm chế, làm chậm, dừng, giảm, cải thiện hoặc đảo ngược tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của triệu chứng, rối loạn, tình trạng hoặc bệnh. Theo một số khía cạnh, bản mô tả này mô tả các phương pháp đặc hiệu để điều trị dự phòng triệu chứng, rối loạn, tình trạng hoặc bệnh không quan sát được hoặc phát hiện được ở động vật có thể có nguy cơ phát triển một hoặc nhiều triệu chứng, rối loạn, tình trạng hoặc bệnh. Theo một số khía cạnh, điều trị sẽ được áp dụng điều trị.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lượng biến thể pG-CSF đang được sử dụng sẽ có tác dụng mong muốn, như phòng ngừa, điều trị, hoặc làm giảm nhiễm khuẩn ở lợn. Khi lợn này là lợn nái ngay trước, trong hoặc sau khi sinh, việc điều trị nhiễm khuẩn ở lợn nái có thể cải thiện sự sống sót của lợn con. Lượng hữu hiệu có thể thay đổi theo các yếu tố như khối lượng của lợn nái.

Thuật ngữ “sử dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc tiêm lượng điều trị hữu hiệu hợp chất và các chế phẩm có chứa các hợp chất được bộc lộ trên đây. Theo các ví dụ không giới hạn, bước sử dụng có thể là tiêm bắp (i.m: intramuscular) hoặc dưới da (s.c.: subcutaneous).

Thuật ngữ “khoảng” sẽ được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và sẽ thay đổi ở một mức nào đó tùy thuộc vào hoàn cảnh được sử dụng. Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ “khoảng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các thay đổi $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, hoặc $\pm 1\%$ (tức là, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, hoặc $\pm 1\%$).

Biên thể pG-CSF theo sáng chế có thể dễ dàng được sản xuất trong nhiều loại tế bào bao gồm tế bào động vật có vú, tế bào vi khuẩn như *E. coli*, *Bacillus subtilis*, hoặc *Pseudomonas fluorescense*, và/hoặc trong tế bào nấm hoặc tế bào nấm men. Các tế bào chủ có thể được nuôi cấy bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Vật truyền chứa các trình tự polynucleotit quan tâm (ví dụ, các biên thể của pG-CSF và trình tự kiểm soát biểu hiện) có thể là được chuyển vào tế bào chủ bằng các phương pháp đã biết, mà thay đổi tùy thuộc vào loại vật chủ tế bào. Ví dụ, phương pháp biến nạp canxi clorua thường được sử dụng cho tế bào nhân sơ, trong khi đó phương pháp xử lý bằng canxi phosphat hoặc công nghệ điện di electroporation có thể được sử dụng cho các tế bào chủ nhân chuẩn khác. Các phương pháp tinh chế protein khác nhau có thể được sử dụng và các phương pháp như vậy là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả, ví dụ, trong Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) and Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Edition, Springer, NY (1994).

Biên thể pG-CSF được PEGyl hóa có thể được chế hóa theo các phương pháp đã biết để tạo ra chế phẩm dược hữu ích. Theo một số khía cạnh, chế phẩm này là sản phẩm được làm đông khô ổn định được hoàn nguyên bằng chất pha loãng thích hợp hoặc dung dịch nước có độ tinh khiết cao với chất mang, chất bảo quản, tá dược hoặc chất làm ổn định được dùng tùy ý (xem Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995).

Biên thể pG-CSF được PEGyl hóa có thể được chế hóa với dung dịch đậm được dụng, và độ pH được điều chỉnh để tạo ra độ ổn định chấp nhận được, và độ pH thích hợp cho bước sử dụng. Theo một số ví dụ không mang tính giới hạn, độ pH thích hợp cho bước sử dụng có thể nằm trong khoảng từ 5 đến khoảng 8 (tức là, khoảng 5, khoảng 6, khoảng 7, hoặc khoảng 8). Hơn nữa, chế phẩm pG-CSF được PEGyl hóa theo sáng chế có thể được cho vào đồ chứa như lọ nhỏ, viên thuốc đạn, dụng cụ chuyển vận dạng bút, bơm tiêm, ống sử dụng trong tĩnh mạch hoặc túi sử dụng trong tĩnh mạch.

Các ví dụ thử nghiệm sau đây là minh họa cho các biên thể pG-CSF, và bước sử dụng chúng trong điều trị nhiễm khuẩn ở lợn, như hội chứng MMA ở lợn nái ngay trước, trong hoặc sau khi sinh. Việc làm giảm tỷ lệ mắc nhiễm khuẩn ở lợn nái cũng làm giảm tỷ lệ tử vong của lợn con. Cần hiểu rằng các phương án và cách sử dụng khác sẽ trở nên

rõ ràng đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ minh họa cụ thể này hoặc các phương án được ưu tiên này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Các biến thể khác nhau của ADN bổ sung yếu tố kích thích tăng sinh bạch cầu hạt ở lợn (pG-CSF) (Mã truy cập Ngân hàng gen U68481.1) được tạo ra bằng cách đưa ra một bộ ba mã hóa kết thúc TAG ở các vị trí được chọn bằng phương pháp gây đột biến PCR định hướng tại vị trí. Ngoài ra, phần ADN bổ sung mã hóa chuỗi tín hiệu được thay thế bằng một bộ ba mã hóa methionin (tức là ATG). Ví dụ, ADN bổ sung mã hóa pG-CSF trưởng thành thể đại với trình tự tín hiệu bị biến đổi có thể là:

```

1 atggccctc tcagccctgc cagctccctg cccagagct tcctgctcaa gtgcttagag
61 caagtgagga aaatccaggc tgatggcgcc gagctgcagg agaggctgtg tgccacccac
121 aagctgtgcc acccccagga gctggtgctg ctcgggcact ctctgggcct ccccaggct
181 tccctgagca gctgctccag ccaggccctg cagctgactg gctgcctgaa ccaactgcat
241 ggcggcctcg tcctctacca gggcctcctg caggccctgg cgggcatctc cccagagctg
301 gccccgccc tggacatact gcagctggat gtcaccgact tagccaccaa catctggctg
361 cagatggaag acctgaggat ggccccggcc tcgcttccca cccagggcac cgtgccgacc
421 ttcacctcgg ccttcacgag ccgggcagga ggggtcctgg ttgtctccca gctgcagagc
481 ttcttgagac tggcgtagcg tgtcctgcgc tacctcgccg agccctga

```

(SEQ ID NO.5). Biến thể này sẽ mã hóa polypeptit sau:

```

1 MAPLSPASSL PQSFLLKCLE QVRKIQADGA ELQERLCATH KLCHPQELVL LGHSLGLPQA
61 SLSSCSSQAL QLTGCLNQLH GGLVLYQGLL QALAGISPEL APALDILQLD VTDLATNIWL
121 QMEDLRMAPA SLPTQGTVPF FTSAFQRRAG GVLVVSQLOS FLELAYRVLR YLAEP

```

(SEQ ID NO.1). Nếu muốn sử dụng bộ ba mã hóa kết thúc TAG để thay thế gốc H43, trình tự ADN bổ sung có thể là:

```

1 atggccctc tcagccctgc cagctccctg cccagagct tcctgctcaa gtgcttagag
61 caagtgagga aaatccaggc tgatggcgcc gagctgcagg agaggctgtg tgccacccac
121 aagctgtgct agccccagga gctggtgctg ctcgggcact ctctgggcct ccccaggct
181 tccctgagca gctgctccag ccaggccctg cagctgactg gctgcctgaa ccaactgcat
241 ggcggcctcg tcctctacca gggcctcctg caggccctgg cgggcatctc cccagagctg
301 gccccgccc tggacatact gcagctggat gtcaccgact tagccaccaa catctggctg
361 cagatggaag acctgaggat ggccccggcc tcgcttccca cccagggcac cgtgccgacc
421 ttcacctcgg ccttcacgag ccgggcagga ggggtcctgg ttgtctccca gctgcagagc
481 ttcttgagac tggcgtagcg tgtcctgcgc tacctcgccg agccctga

```

(SEQ ID NO.6). Polypeptit thu được sẽ là:

```
1 MAPLSPASSL PQSFLLKCLE QVRKIQADGA ELQERLCATH KLCxPQELVL LGHSLGLPQA
61 SLSSCSSQAL QLTGCLNQLH GGLVLYQGLL QALAGISPEL APALDILQLD VTDLATNIWL
121 QMEDLRMAPA SLPTQGTVPF FTSAFQRRAG GVLVVSQLOS FLELAYRVLR YLAEP
```

(SEQ ID NO.2), trong đó “x” biểu thị gốc H43 được thay thế bằng axit amin tổng hợp, như được mô tả sau đây.

Các plasmid mã hóa các biến thể được biến nạp vào tế bào *E. coli* chứa các thành phần hệ thống mã di truyền mở rộng để kết hợp axit amin tổng hợp para-axetyl phenylalanin (pAF). Các tế bào đã được biến nạp được cho phát triển trong môi trường bổ sung pAF và được cảm ứng để biểu hiện pG-CSF với pAF được kết hợp vào các vị trí được chỉ định. Hệ thống biểu hiện này đã được mô tả, ví dụ, trong WO 2010/011735 (được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), và đã được biết rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Biểu hiện của các biến thể ADN bổ sung đã được biến đổi được tạo ra bằng arabinoza, các tế bào được thu hoạch và các biến thể vị trí pAF pG-CSF mục tiêu được phân lập và tinh chế bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC: reverse phase high-pressure liquid chromatography). Aminooxy-PEG mạch thẳng có khối lượng phân tử bằng 30 kD đã được kích hoạt được liên hợp đặc hiệu tại vị trí với PAF đã được kết hợp này. Các thể liên hợp PEG-pG-CSF được tinh chế từ các biến thể PEG dư thừa và các biến thể pG-CSF không liên hợp bằng sắc ký.

Ví dụ 2

Hoạt tính sinh học *in vitro* của các biến thể PG-CSF được gắn polyetylen glycol (PEG-pG-CSF: PEGylated pG-CSF) được đo bằng khả năng của các biến thể tạo ra sự tăng sinh của các tế bào M-NSF-60 (ATCC CRL-1838). Nồng độ của các biến thể có thể ảnh hưởng đến 50% mức tăng sinh tối đa (EC₅₀) được xác định bằng cách so sánh với đường cong tiêu chuẩn được tạo ra với pG-CSF thể dại (WT: wild type). Dựa trên các kết quả biểu hiện như được trình bày trong Ví dụ 1 và các thử nghiệm sinh học được mô tả ở đây, các biến thể PEG-pG-CSF được chọn để nghiên cứu thêm.

Hoạt động *in vivo* của các biến thể PEG-pG-CSF thử nghiệm được chọn được thử nghiệm trong một mô hình động vật gặm nhấm. Chuột Sprague Dawley (3 chuột/nhóm)

được điều trị bằng biến thể PEG-pG-CSF ở lượng 0,25mg/kg khối lượng cơ thể. Các mẫu máu được lấy ở 0 (trước khi sử dụng dược chất), 1, 3, 6, 24, 48, 56, 72, 96, 144, 192 và 264 giờ để phân tích dược động học (PK: pharmacokinetic) và các mẫu được lấy ở 24, 48, 72 và 96 giờ cho công thức máu toàn bộ (phân tích CBC: complete blood count). Phép đo chính trong phân tích CBC là số lượng bạch cầu trung tính có mặt. Một biến thể H43 kích thích mức độ tăng sinh bạch cầu trung tính cao hơn các biến thể khác được thử nghiệm. Tất cả các biến thể có đặc tính dược động học tương tự nhau.

Ví dụ 3

PEG-pG-CSF H43pAF được chuẩn bị như sau. Như trong Ví dụ 1, biểu hiện của các biến thể ADN bổ sung đã được biến đổi được cảm ứng bằng arabinose, các tế bào được thu hoạch và biến thể vị trí pG-CSF H43pAF được phân lập, làm biến tính và cuộn gập lại và tinh chế bằng phương pháp sắc ký lỏng trao đổi cation, bằng cách sử dụng (CEX) Impres (GE Health Lifesciences). Tóm lại, biến thể pG-CSF H43pAF không được pegyl hóa được nạp vào cột với nồng độ 1-5mg/ml nhựa. Cột được rửa với năm thể tích cột (CV: column volume) 30 mM natri axetat ở pH 4,5. Việc rửa giải biến thể pG-CSF H43pAF bằng một dải đệm rửa giải tuyến tính (30 mM natri axetat, NaCl 0,5 M, Ph 4.5), bằng cách rửa với dung dịch đệm rửa giải 0-100% trên 20 CV.

Dựa trên phân tích khối phổ (MS: mass spectroscopy) của pG-CSF H43pAF, các peptit được phân lập bao gồm một đỉnh chính được đại diện bởi SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO. một số tạp chất khác nhau. Các tạp chất bao gồm việc mất methion đầu tận N (ID SEQ NO: 4), mất cả methionin và alanin đầu tận N (SEQ ID NO.8) và thay thế norleuxin cho methionin đầu tận N (SEQ ID NO : 7). Norleuxin được biết đến là kết hợp sai thay vì axit amin methionin trong lên men mật độ cao với *E. coli*. Sự kết hợp của norleuxinx được giảm đi bằng cách sử dụng một hoặc nhiều bước sau: cho các dung dịch lên men bằng methionin; lên men với môi trường phức tạp thay vì môi trường xác định (môi trường phức tạp có một hoặc nhiều thành phần không xác định trong đó bao gồm nhưng giới hạn ở glyxerol, muối, axit amin, vitamin, chiết xuất nấm men, dịch thủy phân thực vật và động vật, pepton và trypton); và/hoặc hạ thấp nhiệt độ của hỗn hợp phản ứng lên men sau khi cảm ứng.

Biến thể pG-CSF H43pAF được lấy từ vốn sắc ký trao đổi cation sau khi sử dụng sắc ký Capto SP Impres và dung dịch đệm được trao đổi thành natri axetat 30mM,

sucroza 4%, pH 4,0 bằng cách sử dụng caxet lọcdòng chảy tiếp tuyến 10kDa MWCO. Biến thể pG-CSF H43pAF sau đó được cô đặc đến khoảng 8,0mg/ml bằng bộ lọc ly tâm Amicon Ultra theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi được cô đặc, PEG mạch thẳng 30K (PEG có thể được mua thương mại từ NOF America Corporation hoặc EMD Merck, chẳng hạn) được thêm vào theo tỷ lệ mol 6: 1 của PEG so với biến thể H43pAF CSF. Hỗn hợp biến thể PEG / pG-CSF sau đó được ủ ở nhiệt độ khoảng 28°C trong thời gian ít nhất 21 giờ. Phương pháp này cho kết quả > 98% biến thể pG-CSF được liên hợp với polyetylen glycol. Sau đó biến thể được gắn polyetylen glycol có thể được tinh chế bằng CEX như trên. Khi được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học tế bào M-NSF-60 (Ví dụ 2), biến thể PEG-pG-CSF H43pAF có EC₅₀ ít nhất 0,40 ng/ml, thể hiện các đặc tính gắn kết và hiệu lực tốt.

Các mẫu được đông lạnh và tan băng trong năm chu kỳ bằng cách làm đông lạnh ở nhiệt độ 0°C trong các ống 1,5 ml và tan băng trong bể nước ở nhiệt độ phòng. Không có tác động đáng kể nào được quan sát đối với profin protein khối lượng phân tử cao (HMW: high molecular weight) trong năm chu kỳ làm đông-tan băng, điều này chứng tỏ tính ổn định của biến thể trong dung dịch.

Hai biến thể pG-CSF H43pAF bổ sung được tạo ra để cố gắng cải thiện hiệu suất cuộn gập và khả năng bền nhiệt của biến thể ở 50°C. Xystein 17 được đổi thành alanin (C17A) hoặc serin (C17S, các SEQ ID NO.9-12). Những đột biến này không cải thiện hiệu suất cuộn gập, nhưng C17A đã giảm tính bền nhiệt. PEG-pG-CSF H43pAF/C17S có EC₅₀ được cải thiện đôi chút là 0,26 ng/ml.

Ví dụ 4

Biến thể PEG-pG-CSF H43pAF được cho sử dụng lợn nái để đặc tả sự thay đổi của bạch cầu trung tính trong máu. Sáu lợn nái 1,5 - 5 tuổi và khối lượng cơ thể trung bình 269,7 kg được cho sử dụng biến thể PEG-pG-CSF H43pAF với liều 40 µg/kg bằng cách tiêm bắp ở bên cổ. Biến thể PEG-pG-CSF H43pAF được tạo huyền phù trong 30mM natri xitrat, 250mM arginin, pH 6,0 ở nồng độ 8.2mg/ml. Các lợn này không nhận được bất kỳ loại thuốc đồng thời nào sau khi bắt đầu điều trị. Không quan sát được biểu hiện bất lợi nào.

Máu được lấy vào ngày 0 trước khi sử dụng được chất và vào các ngày 2, 7, 10, 14, 17 và 21 sau khi sử dụng được chất. Số lượng bạch cầu trung tính được xác định cho

mỗi lợn nái và một giá trị trung bình cho việc điều trị được xác định cho mỗi ngày. Điều trị bằng một liều duy nhất của biến thể PEG-pG-CSF H43pAF dẫn đến sự gia tăng có thể đo được về số lượng bạch cầu trung tính trong máu trong khoảng thời gian ba tuần (Bảng 1). Liều bổ sung được cho là sẽ kích thích duy trì mức độ bạch cầu trung tính cao hơn.

Bảng 1. Ảnh hưởng của biến thể PEG-pG-CSF H43pAF đến số lượng bạch cầu trung tính trong máu trung bình hàng ngày.

	Ngày						
	0	2	7	10	14	17	21
Bạch cầu trung tính (1000/ μ L)	4,65	43,68	25,08	30,1	18,53	15,14	9,83

Ví dụ 5

Biến thể PEG-pG-CSF H43pAF được sử dụng cho lợn nái ngay trước, trong hoặc sau khi sinh để đặc tả tác động đến hội chứng viêm vú, viêm tử cung, và mất sữa (MMA) và sự sống sót của lợn con.

Lợn nái ở 95 - 100 ngày thai kỳ được đặt vào các chuồng đẻ và thực hành chăn nuôi hợp vệ sinh được thực hiện cho đến ngày 107 của thai kỳ cho mỗi lợn nái. Vào ngày 107, máu được thu thập và sau đó lợn nái (25 con mỗi nhóm) được xử lý bằng 40 μ g/kg biến thể PEG-pG-CSF H43pAF như ở Ví dụ 4 hoặc bằng dung dịch natri clorua làm đối chứng âm tính. Lợn nái sau đó được nuôi trong điều kiện mất vệ sinh để kích thích sự phát triển của MMA. Các điều kiện mất vệ sinh bao gồm đặt một tấm thảm trên sàn nhà của thùng đựng rác để cho tấm đệm và chất thải tích lũy. Ngoài ra, hỗn hợp nước, phân và mùn cưa thông (2: 1: 1) được sử dụng để làm nhiễm bẩn các thùng. Không cung cấp thuốc kích đẻ hoặc corticosteroid cho lợn nái. Theo dõi lâm sàng và nhiệt độ trực tràng được thu thập trên mỗi lợn nái một lần mỗi ngày vào buổi sáng bắt đầu từ ngày 107 của thai kỳ và tiếp tục cho đến khi chẩn đoán MMA tại thời điểm lợn nái đã thu thập tất cả các mẫu và sau đó được đưa ra khỏi nghiên cứu, được điều trị và đưa điều kiện vệ sinh trong thùng trở lại. Các mẫu được thu thập bao gồm máu, nhiệt độ trực tràng và gạc của các tuyến bị nhiễm bệnh.

Việc sinh đẻ thường xảy ra vào ngày thứ 114 của thai kỳ. Lợn con được cân và gắn thẻ trong vòng 12 giờ sau khi sinh. Theo dõi lâm sàng của lợn con được thực hiện hai lần mỗi ngày và khối lượng cũng được đo vào ngày 3, 7 và 21 sau khi sinh.

Sử dụng định nghĩa về mỗi giao thức của bệnh, nhận thấy có sự khác biệt nhỏ giữa hai nhóm. Tuy nhiên, khi dịch tiết âm hộ được loại bỏ khỏi định nghĩa về bệnh, tỷ lệ mắc bệnh đã giảm hơn 50% ở nhóm được điều trị bằng PEG-pG-CSF. Nhóm được điều trị cũng có số lượng lợn con cai sữa nhiều hơn so với nhóm đối chứng (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của PEG-pG-CSF đến tỷ lệ mắc MMA và tỷ lệ sống của lợn con.

Biến	Đối chứng	PEG-pG-CSF	Giá trị P
Lợn nái (số lượng/nhóm)			
MMA	36% (9/25)	32% (8/35)	1,0000
MMA không bao gồm xả âm hộ	28% (7/25)	12% (3/25)	0,2890
Lợn con (Sai số chuẩn của trung bình)			
Số sinh/lứa	13,3 (0,78)	13,1 (0,72)	0,8567
Số cai sữa/lứa	8,3 (0,61)	9,4 (0,61)	0,2056
Tỷ lệ sống	65,3 (4,5)	72,4 (4,3)	0,2590
Khoảng tỷ lệ sống sót/lứa	0 - 100%	38 - 100%	n/a
Khối lượng khi cai sữa	5,9 (0,21)	5,7 (0,19)	0,5944

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm điều trị hội chứng viêm vú, viêm tử cung, và mất sữa, chứa biến thể yếu tố kích thích tăng sinh bạch cầu hạt của lợn (pG-CSF) được cấu thành từ trình tự axit amin:

X₁PLSPASSLPQSFLKX₂LEQVRKIQADGAELQERLCATHKLC(pAF)PQEL
VLLGHSLGLPQASLSSCSSQALQLTGCLNQLHGGLVLYQGGLLQALAGISPELAPA
LDILQLDVTDLATNIWLQX₃EDLRX₃APASLPTQGTVPFTTSAFQRRAGGVLVVSQ
LQSFLELAYRVLRYLAEP (SEQ ID NO.13), và ít nhất một chất mang, chất pha loãng,
hoặc tá dược được dụng;

trong đó X₁ được chọn từ nhóm bao gồm methionin alanin, norleuxin alanin, chỉ alanin, và không có axit amin);

trong đó X₂ là xystein hoặc serin;

trong đó X₃ là methionin hoặc norleuxin; và

trong đó axit amin tổng hợp para-axetyl phenylalanin có mặt ở vị trí số 43 được liên kết cộng hóa trị với polyetylen glycol.

2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó polyetylen glycol có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 20 kD đến khoảng 50 kD.

3. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó polyetylen glycol có khối lượng phân tử khoảng 30 kD.

4. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó polyetylen glycol là polyetylen glycol mạch thẳng.

5. Dược phẩm điều trị hội chứng viêm vú, viêm tử cung, và mất sữa, chứa biến thể yếu tố kích thích tăng sinh bạch cầu hạt của lợn (pG-CSF) được cấu thành từ trình tự axit amin:

MAPLSPASSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCATHKLC(pAF)PQEL
VLLGHSLGLPQASLSSCSSQALQLTGCLNQLHGGLVLYQGGLLQALAGISPEL
APALDILQLDVTDLATNIWLQMEDLRMAPASLPTQGTVPFTTSAFQRRAG
GVLVVSQ LQSFLELAYRVLRYLAEP (SEQ ID NO.2), và ít nhất một chất
mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng,

trong đó axit amin tổng hợp para-axetyl phenylalanin có mặt ở vị trí số 43 được liên kết cộng hóa trị với polyetylen glycol mạch thẳng có khối lượng phân tử bằng 30 kD.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

```

<110> ELANCO US INC.
      AMBRX, INC.
<120> DUỐC PHẨM CHỨA BIẾN THỂ YẾU TỔ KÍCH THÍCH TĂNG SINH BẠCH CẦU HẠT CỦA LỢN
<130> X21439 WO
<150> US 62/570,877
<151> 2017-10-11
<160> 13
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 175
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 1
Met Ala Pro Leu Ser Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1          5          10          15
Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
          20          25          30
Gln Glu Arg Leu Cys Ala Thr His Lys Leu Cys His Pro Gln Glu Leu
          35          40          45
Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Leu Pro Gln Ala Ser Leu Ser Ser
          50          55          60
Cys Ser Ser Gln Ala Leu Gln Leu Thr Gly Cys Leu Asn Gln Leu His
65          70          75          80
Gly Gly Leu Val Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
          85          90          95
Ser Pro Glu Leu Ala Pro Ala Leu Asp Ile Leu Gln Leu Asp Val Thr
          100         105         110
Asp Leu Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Arg Met Ala
          115         120         125
Pro Ala Ser Leu Pro Thr Gln Gly Thr Val Pro Thr Phe Thr Ser Ala
          130         135         140
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Val Ser Gln Leu Gln Ser
145         150         155         160
Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Val Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
          165         170         175

<210> 2
<211> 175
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (44)..(44)
<223> Xaa = pAF
<400> 2
Met Ala Pro Leu Ser Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1          5          10          15
Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
          20          25          30
Gln Glu Arg Leu Cys Ala Thr His Lys Leu Cys Xaa Pro Gln Glu Leu
          35          40          45
Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Leu Pro Gln Ala Ser Leu Ser Ser
          50          55          60
Cys Ser Ser Gln Ala Leu Gln Leu Thr Gly Cys Leu Asn Gln Leu His
65          70          75          80
Gly Gly Leu Val Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
          85          90          95
Ser Pro Glu Leu Ala Pro Ala Leu Asp Ile Leu Gln Leu Asp Val Thr
          100         105         110
Asp Leu Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Arg Met Ala
          115         120         125
Pro Ala Ser Leu Pro Thr Gln Gly Thr Val Pro Thr Phe Thr Ser Ala
          130         135         140
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Val Ser Gln Leu Gln Ser
145         150         155         160
Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Val Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
          165         170         175

<210> 3
<211> 174
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Tự nhiên
<400> 3

```

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

<210> 4
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (43)..(43)
 <223> Xaa = pAF
 <400> 4

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

<210> 5
 <211> 528
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> ADN bổ sung (nhân tạo) mã hóa SEQ ID NO.1&3
 <400> 5

atggcccctc tcagccctgc cagctccctg ccccagagct tcctgctcaa gtgcttagag 60
 caagtgagga aaatccaggc tgatggcgcc gagctgcagg agaggctgtg tgccaccac 120
 aagctgtgcc acccccagga gctgggtgctg ctctgggcact ctctgggcct ccccaggct 180
 tcctgagca gctgctccag ccaggccctg cagctgactg gctgcctgaa ccaactgcat 240
 ggcggcctcg tcctctacca ggcctcctg caggccctgg cgggcatctc cccagagctg 300
 gcccccgcgc tggacatact gcagctggat gtcaccgact tagccaccaa catctggctg 360
 cagatggaag acctgaggat ggcgccggcc tcgcttccca cccagggcac cgtgccgacc 420
 ttacactcgg ccttcacgag ccgggcagga ggggtcctgg ttgtctccca gctgcagagc 480
 ttctggagc tggcgctaccg tgtctgcgc tacctgcgc agcctga 528

<210> 6
 <211> 528
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> ADN bổ sung (nhân tạo) mã hóa SEQ ID NO.2&4
 <400> 6

atggcccctc tcagccctgc cagctccctg ccccagagct tcctgctcaa gtgcttagag

60

```

caagtgaagga aaatccaggc tgaatggcgc gagctgcagg agaggctgtg tgccaccac 120
aagctgtgct agccccagga gctggtgctg ctctgggcact ctctgggcct cccccaggct 180
tccttgagca gctgtctccag ccaggccctg cagctgactg gctgcctgaa ccaactgcat 240
ggcggcctcg tctcttacca gggcctcctg caggccctgg cgggcatctc cccagagctg 300
gccccgcgcc tggacatact gcagctggat gtcaccgact tagccacca catctggctg 360
cagatggaag acctgaggat ggccccggcc tcgcttccca cccagggcac cgtgccgacc 420
ttcacctcgg ccttccagcg ccgggcagga ggggtcctgg ttgtctcca gctgcagagc 480
ttcctggagc tggcgctaccg tgtcctgcgc tacctcgccg agccctga 528

```

```

<210> 7
<211> 175
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = norleuxin hoặc methionin
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (44)..(44)
<223> Xaa = pAF
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (122)..(122)
<223> Xaa = norleuxin hoặc methionin
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (127)..(127)
<223> Xaa = norleuxin hoặc methionin
<400> 7

```

```

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

```

```

<210> 8
<211> 173
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (42)..(42)
<223> Xaa = pAF
<400> 8

```

```

Pro Leu Ser Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys
1          5          10          15
Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu Gln Glu
          20          25          30
Arg Leu Cys Ala Thr His Lys Leu Cys Xaa Pro Gln Glu Leu Val Leu
          35          40          45
Leu Gly His Ser Leu Gly Leu Pro Gln Ala Ser Leu Ser Ser Cys Ser
          50          55          60
Ser Gln Ala Leu Gln Leu Thr Gly Cys Leu Asn Gln Leu His Gly Gly
65          70          75          80
Leu Val Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro
          85          90          95
Glu Leu Ala Pro Ala Leu Asp Ile Leu Gln Leu Asp Val Thr Asp Leu
          100          105          110

```

Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Arg Met Ala Pro Ala
 115 120 125
 Ser Leu Pro Thr Gln Gly Thr Val Pro Thr Phe Thr Ser Ala Phe Gln
 130 135 140
 Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Val Ser Gln Leu Gln Ser Phe Leu
 145 150 155 160
 Glu Leu Ala Tyr Arg Val Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
 165 170

<210> 9
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (44)..(44)
 <223> Xaa = pAF
 <400> 9

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

<210> 10
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = norleuxin hoặc methionin
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (44)..(44)
 <223> Xaa = pAF
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (122)..(122)
 <223> Xaa = norleuxin hoặc methionin
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (127)..(127)
 <223> Xaa = norleuxin hoặc methionin
 <400> 10

Xaa Ala Pro Leu Ser Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Lys Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
 20 25 30
 Gln Glu Arg Leu Cys Ala Thr His Lys Leu Cys Xaa Pro Gln Glu Leu
 35 40 45
 Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Leu Pro Gln Ala Ser Leu Ser Ser
 50 55 60
 Cys Ser Ser Gln Ala Leu Gln Leu Thr Gly Cys Leu Asn Gln Leu His
 65 70 75 80
 Gly Gly Leu Val Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
 85 90 95
 Ser Pro Glu Leu Ala Pro Ala Leu Asp Ile Leu Gln Leu Asp Val Thr
 100 105 110
 Asp Leu Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Xaa Glu Asp Leu Arg Xaa Ala

```

      115      120      125
Pro Ala Ser Leu Pro Thr Gln Gly Thr Val Pro Thr Phe Thr Ser Ala
      130      135      140
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Val Ser Gln Leu Gln Ser
      145      150      155      160
Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Val Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
      165      170      175

```

```

<210> 11
<211> 174
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (43)..(43)
<223> Xaa = pAF
<400> 11

```

```

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

```

```

<210> 12
<211> 173
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (42)..(42)
<223> Xaa = pAF
<400> 12

```

```

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

```

```

<210> 13
<211> 174
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (1)..(1)
<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (17)..(17)
<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (43)..(43)
<223> Xaa = pAF
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (121)..(121)
<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (126)..(126)
<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<400> 13
Xaa Pro Leu Ser Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
1          5          10          15
Xaa Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu Gln
20          25          30
Glu Arg Leu Cys Ala Thr His Lys Leu Cys Xaa Pro Gln Glu Leu Val
35          40          45
Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Leu Pro Gln Ala Ser Leu Ser Ser Cys
50          55          60
Ser Ser Gln Ala Leu Gln Leu Thr Gly Cys Leu Asn Gln Leu His Gly
65          70          75          80
Gly Leu Val Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile Ser
85          90          95
Pro Glu Leu Ala Pro Ala Leu Asp Ile Leu Gln Leu Asp Val Thr Asp
100         105         110
Leu Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Xaa Glu Asp Leu Arg Xaa Ala Pro
115         120         125
Ala Ser Leu Pro Thr Gln Gly Thr Val Pro Thr Phe Thr Ser Ala Phe
130         135         140
Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Val Ser Gln Leu Gln Ser Phe
145         150         155         160
Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Val Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
165         170

```