



(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)



1-0048313

(51)⁷ A61K 39/00; C07K 14/475

(13) B

(21) 1-2017-01309

(22) 29/10/2015

(86) PCT/US2015/058111 29/10/2015

(87) WO2016/069921 06/05/2016

(30) 62/073,737 31/10/2014 US; 62/244,604 21/10/2015 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/09/2017 354A

(73) NGM Biopharmaceuticals, Inc. (US)

333 Oyster Point Boulevard, South San Francisco, California 94080, United States of America

(72) Wenyan SHEN (US); Darrin LINDHOUT (US); Raj HALDANKAR (US); Hugo MATERN (US).

(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) PHỨC CHỨA HETERODIME THỨ NHẤT VÀ HETERODIME THỨ HAI, VÀ
DƯỢC PHẨM CHỨA PHỨC NÀY ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH RỐI LOẠN CHUYỂN
HÓA

(21) 1-2017-01309

(57) Sáng chế mô tả phức polypeptit và dược phẩm chứa phức này để điều trị bệnh rối loạn chuyển hóa.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

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

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh béo phì chủ yếu là do việc hấp thu quá mức kết hợp với việc tiêu thụ năng lượng hạn chế và/hoặc ít tập thể dục. Bệnh béo phì làm tăng nguy cơ mắc các bệnh khác nhau, như bệnh đái tháo đường, chứng tăng huyết áp, chứng xơ vữa động mạch vành, bệnh động mạch vành, chứng ngưng thở khi ngủ, bệnh gút, bệnh thấp và bệnh viêm khớp. Hơn nữa, nguy cơ tử vong tương quan trực tiếp với mức độ béo phì, như, ví dụ, chỉ số khối cơ thể vượt quá 40 sẽ làm giảm tuổi thọ trung bình hơn 10 năm.

Các phương thức điều trị bằng thuốc hiện nay bao gồm các thuốc làm giảm mức độ ngon miệng nhằm vào các nhóm thụ thể (ví dụ, CB1, 5-HT_{2C}, và NPY); chất điều hòa mạch gây thèm ăn ở vùng dưới đồi và tác động của ghrelin ở mức phân tử; và chất ức chế hấp thu dinh dưỡng nhằm vào lipaza. Không may là, không thấy phương thức hiện có thể hiện là điều trị hiệu quả bệnh béo phì mà không gây tác dụng phụ, trong đó một số tác dụng phụ có thể rất nghiêm trọng.

Mức glucoza trong máu cao kích thích tế bào beta tụy tiết insulin. Kết quả là insulin kích thích glucoza đi vào cơ và tế bào mỡ, dẫn đến tích trữ glycogen và triglyxerit và tổng hợp protein. Sự hoạt hóa thụ thể insulin trên các kiểu tế bào khác nhau sẽ làm giảm mức glucoza trong tuần hoàn bằng cách làm tăng mức độ hấp thu và sử dụng glucoza, và bằng cách làm giảm hiệu suất tạo glucoza của gan. Sự gián đoạn trong hệ thống điều hòa này có thể gây ra bệnh tiểu đường và các hội chứng bệnh lý liên quan ảnh hưởng đến dân số ở mức tỷ lệ phần trăm cao và ngày càng gia tăng.

Các bệnh nhân mắc bệnh rối loạn chuyển hóa glucoza có thể mắc chứng tăng đường huyết, chứng tăng insulin huyết, và/hoặc sự không dung nạp glucoza. Ví dụ về bệnh rối loạn thường liên quan đến mức glucoza và/hoặc insulin bất thường là chứng kháng insulin, trong đó tế bào gan, mỡ, và cơ mất khả năng đáp ứng với mức insulin bình thường trong máu.

Do mức độ phổ biến và nghiêm trọng của bệnh béo phì, bệnh tiểu đường và các bệnh không liên quan đến chuyển hóa hoặc không chuyển hóa, các phương thức điều trị để điều chỉnh, ví dụ, mức độ thèm ăn, mức glucoza và/hoặc insulin và làm tăng đáp ứng sinh học với mức glucoza thay đổi ở bệnh nhân vẫn được quan tâm.

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

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất polypeptit GDF15 biến đổi để điều trị bệnh rối loạn chuyển hóa. Polypeptit GDF15 biến đổi có thể là ở dạng phức. Phức theo sáng chế có thể bao gồm hai polypeptit GDF15.

Trong một số trường hợp, phức theo sáng chế bao gồm polypeptit thứ nhất bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lỗi được xử lý; và polypeptit thứ hai bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lỗi được xử lý, trong đó polypeptit thứ nhất tạo đime với polypeptit thứ hai thông qua việc đặt vị trí cấu trúc lỗi của polypeptit thứ nhất vào trong cấu trúc lỗi của polypeptit thứ hai, và trong đó hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ nhất hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ hai được liên hợp với đầu tận cùng N của mutein GDF15 bao gồm ít nhất là một vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N.

Trong một số trường hợp, phức theo sáng chế bao gồm heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai, mỗi heterodime trong số heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai bao gồm polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai, polypeptit thứ nhất bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lỗi được xử lý; và polypeptit thứ hai bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lỗi được xử lý; trong đó polypeptit thứ nhất tạo đime với polypeptit thứ hai thông qua việc đặt vị trí cấu trúc lỗi của polypeptit thứ nhất vào trong cấu trúc lỗi của polypeptit thứ hai, trong đó hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ nhất hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ hai được liên hợp với đầu tận cùng N của mutein GDF15 bao gồm ít nhất là một vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N, và trong đó mutein GDF15 trong heterodime thứ nhất tạo đime với mutein GDF15 trong heterodime thứ hai bằng cách đó tạo ra phức bao gồm heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai.

Theo các phương án ví dụ, đầu tận cùng C của polypeptit thứ nhất có thể được liên hợp với đầu tận cùng N của mutein GDF15. Trong các trường hợp khác, đầu tận cùng C của polypeptit thứ hai có thể được liên hợp với đầu tận cùng N của mutein GDF15.

Sáng chế còn đề xuất polypeptit thứ nhất bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lỗi được xử lý, trong đó polypeptit thứ nhất tạo đime với polypeptit thứ hai bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lỗi được xử lý; và mutein GDF15 bao gồm ít nhất là một vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N, trong đó đầu tận cùng C của polypeptit thứ nhất được liên hợp với đầu tận cùng N của mutein GDF15. Polypeptit thứ nhất có thể có trong phức mà phức này có thể còn chứa polypeptit thứ hai.

Sáng chế còn bộc lộ polypeptit thứ nhất bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lỗi được xử lý, trong đó polypeptit thứ nhất tạo đime với polypeptit thứ hai bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lỗi được xử lý; và mutein GDF15 bao gồm ít nhất là một vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N, trong đó đầu tận cùng C của polypeptit thứ nhất được liên hợp với đầu tận cùng N của mutein GDF15. Polypeptit thứ nhất có thể có trong phức mà phức này có thể còn chứa polypeptit thứ hai.

Trong một số trường hợp, mutein GDF15 trong phức có thể bao gồm trình tự axit amin liên kề tương đồng ít nhất là 90% với trình tự axit amin của GDF15 kiểu đại (SEQ ID NO:1). Ví dụ, mutein GDF15 có thể bao gồm ít nhất là một thay thế tương ứng ở SEQ ID NO:1 mà tạo ra vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N, ví dụ, thay thế có thể là D5T hoặc D5S. Trong các trường hợp khác, thay thế có thể là R21N.

Trong trường hợp ví dụ, mutein GDF15 có thể bao gồm ít nhất là một trong các cặp thay thế tương ứng dưới đây ở SEQ ID NO:1 mà tạo ra vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N: R16N và H18T/S; S23N và E25T/S; L24N và D26T/S; S50N và F52T/S; F52N và A54T/S; Q51N và R53T/S; R53N và A55T/S; S64N và H66T/S; L65N và R67T/S; S82N và N84T/S; K91N và D93T/S; D93N và G95T/S; T94N và V96T/S; V96N và L98T/S; S97N và Q99T/S; và A106N và D108T/S.

Trong trường hợp ví dụ, mutein GDF15 có thể bao gồm ít nhất là một trong các cặp thay thế tương ứng dưới đây ở SEQ ID NO:1 mà tạo ra vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N: R16N và H18T; S23N và E25T; L24N và D26T; S50N và F52T; F52N và A54T; Q51N và R53T; R53N và A55T; S64N và H66T; L65N và R67T; S82N và N84T;

K91N và D93T; D93N và G95T; T94N và V96T; V96N và L98T; S97N và Q99T; và A106N và D108T.

Trong một số trường hợp, mutein GDF15 có thể bao gồm ít nhất là một trong các cặp thay thế tương ứng dưới đây ở SEQ ID NO:1 mà tạo ra vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N: R16N và H18S; S23N và E25S; L24N và D26S; S50N và F52S; F52N và A54S; Q51N và R53S; R53N và A55S; S64N và H66S; L65N và R67S; S82N và N84S; K91N và D93S; D93N và G95S; T94N và V96S; V96N và L98S; S97N và Q99S; và A106N và D108S.

Theo một số phương án nhất định, mutein GDF15 có thể bao gồm ít nhất là một trong các cặp thay thế tương ứng dưới đây ở SEQ ID NO:1: S23N và E25T/S; R53N và A55T/S; S64N và H66T/S; K91N và D93T/S; D93N và G95T/S; S97N và Q99T/S; và A106N và D108T/S.

Theo một số phương án nhất định, mutein GDF15 có thể bao gồm ít nhất là một trong các cặp thay thế tương ứng dưới đây ở SEQ ID NO:1: S23N và E25T; R53N và A55T; S64N và H66T; K91N và D93T; D93N và G95T; S97N và Q99T; và A106N và D108S.

Theo một số phương án nhất định, mutein GDF15 có thể bao gồm ít nhất là một trong các cặp thay thế tương ứng dưới đây ở SEQ ID NO:1: S23N và E25S; R53N và A55S; S64N và H66S; K91N và D93S; D93N và G95S; S97N và Q99S; và A106N và D108S.

Theo một số phương án nhất định, mutein GDF15 có thể bao gồm ít nhất là một trong các cặp thay thế tương ứng dưới đây ở SEQ ID NO:1: S64N và H66T/S; K91N và D93T/S; D93N và G95T/S; và S97N và Q99T/S. Ví dụ, mutein GDF15 có thể bao gồm ít nhất là một trong các cặp thay thế tương ứng dưới đây ở SEQ ID NO:1: S64N và H66T; K91N và D93T; D93N và G95T; và S97N và Q99T; hoặc S64N và H66S; K91N và D93S; D93N và G95S; và S97N và Q99S.

Theo các phương án khác, mutein GDF15 có thể bao gồm ít nhất là một trong các cặp thay thế tương ứng dưới đây ở SEQ ID NO:1: K91N và D93T hoặc D93S; và D93N và G95T hoặc G95S.

Theo các phương án khác, mutein GDF15 trong phức có thể bao gồm trình tự axit amin liền kề mà có thể có chiều dài ít nhất là 98 axit amin và có thể tương đồng ít nhất

là 90% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1, trong đó axit amin ở đầu C của mutein GDF15 tương ứng với Isoleuxin ở vị trí 112 ở SEQ ID NO:1.

Theo các phương án khác, trình tự axit amin liên kế có thể dài ít nhất là 98 axit amin và có thể tương đồng ít nhất là 95% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1, trong đó axit amin ở đầu C của mutein GDF15 tương ứng với Isoleuxin ở vị trí 112 ở SEQ ID NO:1.

Mutein GDF15 ví dụ có mặt trong phức được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm trình tự axit amin liên kế có chiều dài ít nhất là 98 axit amin, tương đồng ít nhất là 90% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1, và bị mất vài axit amin so với SEQ ID NO:1. Ví dụ, các polypeptit có thể có đoạn cắt cụt ở đầu N so với SEQ ID NO:1. Đoạn cắt cụt ở đầu N có thể là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 axit amin hoặc hơn so với SEQ ID NO:1, ví dụ, 1-14 axit amin, 2-14 axit amin, 3-14 axit amin, 2-3 axit amin, 3-5 axit amin, hoặc 4-6 axit amin.

Các phức ví dụ bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm mutein GDF15 bao gồm trình tự axit amin liên kế có chiều dài ít nhất là 98 axit amin và tương đồng ít nhất là 95% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1, trong đó axit amin ở đầu C của polypeptit tương ứng với Isoleuxin ở vị trí 112 ở SEQ ID NO:1.

Trong một số trường hợp, trình tự axit amin liên kế trong mutein GDF15 có chiều dài ít nhất là 98 axit amin và không chứa axit amin đầu tiên tương ứng với axit amin đầu tiên có ở đầu tận cùng N của SEQ ID NO:1, trong đó axit amin ở đầu C tương ứng với Isoleuxin ở vị trí 112 ở SEQ ID NO:1.

Trong một số trường hợp, trình tự axit amin liên kế trong mutein GDF15 có chiều dài ít nhất là 98 axit amin và không chứa hai axit amin đầu tiên tương ứng với hai axit amin đầu tiên có ở đầu tận cùng N của SEQ ID NO:1, trong đó axit amin ở đầu C tương ứng với Isoleuxin ở vị trí 112 ở SEQ ID NO:1.

Trong một số trường hợp, trình tự axit amin liên kế có chiều dài ít nhất là 98 axit amin và không chứa ba axit amin đầu tiên tương ứng với ba axit amin đầu tiên có ở đầu tận cùng N của SEQ ID NO:1, trong đó axit amin ở đầu C tương ứng với Isoleuxin ở vị trí 112 ở SEQ ID NO:1.

Trong một số trường hợp, trình tự axit amin liên kế có chiều dài ít nhất là 98 axit amin và không chứa sáu axit amin đầu tiên tương ứng với sáu axit amin đầu tiên có ở đầu

tận cùng N của SEQ ID NO:1, trong đó axit amin ở đầu C tương ứng với Isoleuxin ở vị trí 112 ở SEQ ID NO:1.

Trong một số trường hợp, trình tự axit amin liên kế có chiều dài ít nhất là 98 axit amin và không chứa mười bốn axit amin đầu tiên tương ứng với mười bốn axit amin đầu tiên có ở đầu tận cùng N của SEQ ID NO:1.

Trong một số trường hợp, đầu tận cùng C của polypeptit thứ nhất (ví dụ, Fc-núm) hoặc polypeptit thứ hai (ví dụ, Fc-lỗ) được liên hợp với đầu tận cùng N của mutein GDF15 qua trình tự liên kết. Trình tự liên kết ví dụ bao gồm trình tự $(G_4S)_n$, trong đó $n=1-10$, ví dụ, 1-5 hoặc 2-5, ví dụ 2, 3, 4, hoặc 5.

Trong một số trường hợp, IgG Fc bao gồm trình tự axit amin liên kế tương đồng ít nhất là 90% với trình tự axit amin ở SEQ ID NO:2 (trình tự IgG1 Fc của người). Cấu trúc lõi được xử lý có thể bao gồm ít nhất là một thay thế tương ứng trong trình tự IgG1 Fc của người, trong đó thay thế này là ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin 347, 366 và 394, theo cách đánh số của EU. Ví dụ, ít nhất là một thay thế được chọn từ nhóm bao gồm Q347W/Y, T366W/Y, và T394W/Y, theo cách đánh số của EU.

Trong một số trường hợp, cấu trúc lõi được xử lý bao gồm ít nhất là một thay thế tương ứng trong trình tự IgG1 Fc của người, trong đó thay thế này là ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin 366, 368, 394, 405, và 407, theo cách đánh số của EU. Ví dụ, ít nhất là một thay thế được chọn từ nhóm bao gồm T366S, L368A, T394S, F405T/V/A, và Y407T/V/A, theo cách đánh số của EU.

Trong một số trường hợp, cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế T366W/Y và cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế T366S, L368A, và Y407T/V/A, theo cách đánh số của EU.

Ví dụ, cấu trúc lõi bao gồm thay thế T366W/Y và cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế Y407T/V/A, theo cách đánh số của EU. Trong các trường hợp khác, cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế T366Y và cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế Y407T, theo cách đánh số của EU. Trong các ví dụ khác, cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế T366W và cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế Y407A, theo cách đánh số của EU. Trong các ví dụ khác nữa, cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế T394Y và cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế Y407T, theo cách đánh số của EU.

Theo một số phương án nhất định, mỗi trình tự IgG Fc của polypeptit thứ nhất và thứ hai có thể bao gồm một vùng bản lề tạo ra ít nhất là một liên kết disulphit giữa

polypeptit thứ nhất và thứ hai. Theo một số phương án nhất định, mỗi trình tự IgG Fc của polypeptit thứ nhất và thứ hai có thể bao gồm vùng bản lề, vùng CH2, và vùng CH3, trong đó các vùng bản lề tạo ra ít nhất là một liên kết disulphit giữa polypeptit thứ nhất và thứ hai.

Sáng chế còn đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit thứ nhất và thứ hai được mô tả trên. Phân tử axit nucleic này có thể được liên kết chức năng với yếu tố kiểm soát biểu hiện để biểu hiện phân tử axit nucleic mã hóa các polypeptit này *in vitro* hoặc *in vivo*. Vectơ chứa phân tử axit nucleic này cũng được đề xuất. Vectơ này có thể là vectơ virus. Trong một số trường hợp, axit nucleic đầu tiên mã hóa polypeptit thứ nhất và axit nucleic thứ hai mã hóa polypeptit thứ hai được đề xuất. Mỗi axit nucleic được liên kết chức năng với yếu tố kiểm soát biểu hiện để biểu hiện polypeptit thứ nhất và thứ hai lần lượt từ axit nucleic thứ nhất và thứ hai. Vectơ thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất và vectơ thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai cũng được bộc lộ. Như đã được lưu ý trong bản mô tả này, vectơ này có thể là vectơ virus.

Một số phương án bao gồm tế bào chủ biến nạp mà biểu hiện một hoặc nhiều polypeptit nêu trên. Ví dụ, tế bào chủ bao gồm axit nucleic thứ nhất và thứ hai được đề xuất. Tế bào chủ này biểu hiện polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai.

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

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm (ví dụ, dược phẩm) chứa một hoặc nhiều phức nêu trên để điều trị hoặc phòng bệnh rối loạn thể trọng ở đối tượng; để điều trị hoặc phòng bệnh rối loạn chuyển hóa glucoza ở đối tượng. Chế phẩm này có thể chứa phức với lượng có hiệu quả điều trị hoặc phòng bệnh rối loạn thể trọng ở đối tượng. Chế phẩm này có thể chứa phức với lượng có hiệu quả điều trị hoặc phòng bệnh rối loạn chuyển hóa glucoza ở đối tượng.

Các phương án mở rộng hơn nữa của sáng chế bao gồm kháng thể gắn kết đặc hiệu với một trong số polypeptit thứ nhất hoặc thứ hai nêu trên.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể nêu trên được bào chế với ít nhất là một tá dược, chất mang hoặc chất pha loãng được dụng. Các dược phẩm này có thể còn chứa ít nhất là một chất phòng bệnh hoặc điều trị bệnh hỗ trợ.

Các phương án nhất định của sáng chế dự tính vật chứa vô khuẩn chứa một trong các được phẩm nêu trên và tùy chọn một hoặc nhiều thành phần bổ trợ. Ví dụ, nhưng không hạn chế, vật chứa vô khuẩn có thể là bơm tiêm. Theo các phương án mở rộng hơn, vật chứa vô khuẩn là một thành phần của kit; kit này có thể còn chứa, ví dụ, vật chứa vô khuẩn thứ hai chứa ít nhất là một chất phòng bệnh hoặc điều trị bệnh.

Cũng được bộc lộ trong bản mô tả này là phương pháp tạo ra polypeptit và các phức nêu trên. Phương pháp này có thể bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ biểu hiện các polypeptit này; và phân tách phức bao gồm các polypeptit đã được biểu hiện.

Sáng chế còn bộc lộ phương pháp điều trị hoặc phòng bệnh rối loạn chuyển hóa glucoza ở đối tượng (ví dụ, người) bằng cách sử dụng cho đối tượng này lượng có hiệu quả điều trị của phức nêu trên. Trong một số phương pháp, việc điều trị hoặc phòng bệnh làm giảm glucoza trong huyết tương ở đối tượng này, làm giảm insulin huyết tương ở đối tượng này, làm giảm thể trọng và/hoặc lượng hấp thu thức ăn, hoặc làm tăng mức dung nạp glucoza ở đối tượng này. Theo các phương án cụ thể, bệnh rối loạn chuyển hóa glucoza là bệnh đái tháo đường.

Phương pháp điều trị hoặc phòng bệnh rối loạn thể trọng ở đối tượng cũng được bộc lộ. Phương pháp này có thể bao gồm việc sử dụng cho đối tượng này phức theo sáng chế, trong đó phức này được sử dụng với lượng có hiệu quả trong điều trị hoặc phòng bệnh rối loạn thể trọng ở đối tượng này. Trong một số phương pháp, việc điều trị hoặc phòng bệnh làm giảm thể trọng và/hoặc lượng hấp thu thức ăn ở đối tượng này.

Theo một số phương án, đối tượng là béo phì và/hoặc mắc bệnh rối loạn thể trọng.

Mặc dù không giới hạn ở đường dùng hoặc chế độ liều cụ thể bất kỳ, theo một số phương án, cách dùng là tiêm ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, dưới da).

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ hình vẽ thể hiện phức homodime của heterodime của phân tử (Fc/Fc)-GDF15 nơi polypeptit Fc/Fc là cặp Fc núm-trong-lỗ (A-F) và việc kết hợp glycan liên kết tại N trên phân tử GDF15 (E, F) để làm tăng sự biểu hiện và ghép của phức homodime của các heterodime.

Fig.2A thể hiện tỷ lệ thu hồi từ quá trình biểu hiện tạm thời Expi 293F của phức (Fc/Fc)-GDF15 được xử lý. Tỷ lệ thu hồi là như sau: (0 = khối kết tụ/không biểu hiện, <25mg/L, 25mg/L-49,9mg/L, 50mg/L-74,9mg/L, 75mg/L-99,0mg/L, >100mg/L). Việc

thêm glycan liên kết tại N trên trình tự GDF15 trong (Fc/Fc)-GDF15 khiến tăng đáng kể tỷ lệ thu hồi tổng cộng sau khi tinh chế. Fig.2B thể hiện tỷ lệ thu hồi từ quá trình biểu hiện tạm thời Expi 293F của GDF15 kiểu đại và thể đột biến GDF15-glycosyl hóa (glycomutein) không được liên hợp với Fc.

Fig.3 thể hiện hiện tượng giảm thể trọng ở mô hình chuột béo phì do chế độ ăn (DIO - Diet-induced obese) khi phân phối dưới da phức (Fc/Fc)-GDF15 hàm lượng 0,4nmol/kg, một lần mỗi tuần trong 4 tuần, sau đó là giai đoạn phục hồi 14 ngày. Biến thể B13a/B13b có hiệu lực tăng đáng kể so với biến thể B9a/B9b và B11a/B11b.

Fig.4 thể hiện phần trăm giảm thể trọng ở mô hình chuột DIO khi phân phối dưới da phức (Fc/Fc)-GDF15 hàm lượng 0,4nmol/kg, một lần mỗi tuần trong 4 tuần, sau đó là giai đoạn phục hồi 14 ngày. Biến thể B13a/B13b có % thay đổi thể trọng đã trừ đi tác dụng của tá dược lỏng là cao hơn 20% sau 14 ngày phục hồi sau khi dùng thuốc.

Fig.5 thể hiện hiện tượng giảm thể trọng trong mô hình chuột DIO khi phân phối dưới da phức (Fc/Fc)-GDF15 hàm lượng 4,0nmol/kg, một lần mỗi tuần trong 4 tuần, sau đó là giai đoạn phục hồi 14 ngày.

Fig.6 thể hiện phần trăm giảm thể trọng trong mô hình chuột DIO khi phân phối dưới da phức (Fc/Fc)-GDF15 hàm lượng 4,0nmol/kg, một lần mỗi tuần trong 4 tuần, sau đó là giai đoạn phục hồi 14 ngày.

Fig.7 và 8 tóm tắt mức giảm thể trọng quan sát được (bao gồm SEM và giá trị p) của mỗi nhóm chuột DIO (n=6) đối với các nhóm liều 0,4nmol/kg và 4,0nmol/kg được thể hiện trên Fig.3 và 5. Đối với tất cả các nhóm, (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ và *** = $p < 0,001$) qua kiểm định t-test không cặp đôi.

Fig.9 tóm tắt kết quả phần trăm giảm thể trọng (bao gồm SEM và giá trị p) của mỗi nhóm chuột DIO (n=6) đối với các nhóm liều 0,4nmol/kg và 4,0nmol/kg được thể hiện trên Fig.4 và 6. Đối với tất cả các nhóm, (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ và *** = $p < 0,001$) qua kiểm định t-test không cặp đôi.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi mô tả rõ hơn các phương pháp và dược phẩm theo sáng chế, cần hiểu rằng bản mô tả này không bị giới hạn ở các phương án cụ thể được nêu trong bản mô tả

này, và cũng hiểu rằng thuật ngữ sử dụng trong bản mô tả này là chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không nhằm giới hạn sáng chế.

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

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

Các tài liệu công bố được bàn luận ở đây chỉ được nêu vì chúng được bộc lộ trước ngày nộp đơn sáng chế. Không được diễn giải bất kỳ tuyên bố nào ở đây là sự thừa nhận rằng sáng chế không được lùi ngày trước tài liệu công bố này vì là sáng chế trước. Ngoài ra, ngày của tài liệu công bố được nêu có thể khác ngày công bố thực mà có thể cần được xác nhận độc lập.

Định nghĩa

Thuật ngữ “polypeptit”, “peptit”, và “protein”, sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này, để chỉ dạng polyme của axit amin có chiều dài bất kỳ, có thể bao gồm các axit amin được mã hóa di truyền và không được mã hóa di truyền, axit amin biến đổi hóa học hoặc hóa sinh hoặc được tạo dẫn xuất, và polypeptit có khung polypeptit biến đổi. Thuật ngữ này bao gồm protein dung hợp, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, protein dung hợp

có trình tự axit amin khác nguồn gốc, protein dung hợp với trình tự dẫn đầu cùng loại hoặc khác nguồn gốc, có hoặc không có gốc metionin ở đầu tận cùng N; protein gắn nhãn miễn dịch; và các yếu tố tương tự. Theo các phương án cụ thể, thuật ngữ này để chỉ dạng polyme của axit amin có chiều dài bất kỳ bao gồm axit amin được mã hóa di truyền. Theo các phương án cụ thể, thuật ngữ này để chỉ dạng polyme của axit amin có chiều dài bất kỳ bao gồm axit amin đã được mã hóa di truyền dung hợp với trình tự axit amin khác nguồn gốc. Theo các phương án cụ thể, thuật ngữ này để chỉ một axit amin trong chiều dài gồm 98 đến 112 axit amin, tùy chọn được dung hợp với trình tự khác nguồn gốc. Theo các phương án cụ thể, khi thích hợp, khi đề cập đến protein và các phân tử được bộc lộ và nêu trong bản mô tả này, thuật ngữ “polypeptit”, “peptit”, và “protein” để chỉ các polypeptit được xác định trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “phức” như sử dụng trong bản mô tả này để chỉ phức protein bao gồm ít nhất là hai polypeptit, mỗi polypeptit có đầu tận cùng N và đầu tận cùng C. Ít nhất là hai polypeptit này có thể liên kết tại qua một hoặc cả hai tương tác cộng hóa trị và không cộng hóa trị (ví dụ, tĩnh điện, hiệu ứng π , lực van der Waals, và hiệu ứng kỵ nước). Ít nhất là hai polypeptit này có thể giống nhau, tức là, có trình tự axit amin giống nhau hoặc có thể khác nhau, tức là, không có trình tự axit amin giống nhau. Phức có hai polypeptit, trong đó cả hai polypeptit giống nhau, được gọi là homodime. Phức có hai polypeptit, trong đó các polypeptit khác nhau, được gọi là heterodime. Phức có ba polypeptit, trong đó các polypeptit giống nhau, được gọi là homotrime. Phức có ba polypeptit, trong đó ít nhất là một trong ba polypeptit là khác với (các) polypeptit khác, được gọi là heterotrime. Phức có bốn polypeptit, trong đó bốn polypeptit này giống nhau, được gọi là homotetrame. Phức có bốn polypeptit, trong đó ít nhất là một trong bốn polypeptit này khác với (các) polypeptit khác, được gọi là heterotetrame. Phức ví dụ có bốn polypeptit-hai phân tử polypeptit thứ nhất và hai phân tử polypeptit thứ hai, trong đó polypeptit thứ nhất tạo dime với polypeptit thứ hai để tạo ra heterodime và trong đó hai heterodime như vậy sẽ tạo dime để tạo ra phức có thể được gọi là phức homodime của hai heterodime.

Sáng chế đề xuất phức như được xác định trên, bao gồm nhưng không giới hạn ở heterodime có polypeptit thứ nhất liên kết với polypeptit thứ hai, trong đó polypeptit thứ nhất là Fc ‘núm’ và polypeptit thứ hai là Fc ‘lỗ’, và trong đó hoặc polypeptit thứ nhất hoặc polypeptit thứ hai được dung hợp với trình tự axit amin GDF15 (hoặc mutein GDF15, như, mutein GDF15 nêu trong bản mô tả này). Polypeptit thứ nhất và thứ hai có

thể liên kết về mặt vật lý với nhau qua tương tác không cộng hóa trị (ví dụ, hiệu ứng kỵ nước, như, tương tác kỵ nước giữa vùng núm và lỗ của Fc), liên kết cộng hóa trị (ví dụ, liên kết disulfid, như, một hoặc hai hoặc nhiều liên kết disulphit giữa vùng bản lề của Fc trong polypeptit thứ nhất và thứ hai), hoặc cả hai.

Sáng chế còn đề xuất phức bao gồm hai heterodime liên kết với nhau, mỗi heterodime có polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai, trong đó polypeptit thứ nhất là Fc ‘núm’ và polypeptit thứ hai là Fc ‘lỗ’, và trong đó hoặc polypeptit thứ nhất hoặc polypeptit thứ hai được dung hợp với trình tự axit amin GDF15 (hoặc mutein GDF15). Trong phức này, hai heterodime có thể được liên kết về mặt vật lý bằng tương tác không cộng hóa trị (ví dụ, hiệu ứng kỵ nước), liên kết cộng hóa trị (ví dụ, liên kết disulfid), hoặc cả hai. Polypeptit thứ nhất và thứ hai trong mỗi heterodime trong phức có thể liên kết về mặt vật lý với nhau bằng tương tác không cộng hóa trị (ví dụ, hiệu ứng kỵ nước), liên kết cộng hóa trị (ví dụ, liên kết disulfid), hoặc cả hai.

Sáng chế còn đề xuất phức bao gồm hai heterodime liên kết với nhau, mỗi heterodime có polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai, trong đó polypeptit thứ nhất là Fc ‘núm’ và polypeptit thứ hai là Fc ‘lỗ’, và trong đó hoặc polypeptit thứ nhất hoặc polypeptit thứ hai được dung hợp với trình tự axit amin GDF15 (hoặc mutein GDF15). Trong phức này, hai heterodime có thể được liên kết về mặt vật lý bằng tương tác không cộng hóa trị (ví dụ, hiệu ứng kỵ nước) hoặc tương tác cộng hóa trị (ví dụ, (các) liên kết disulfid) giữa polypeptit GDF15 và polypeptit thứ nhất và thứ hai trong mỗi heterodime có thể được liên kết về mặt vật lý với nhau bằng tương tác không cộng hóa trị (ví dụ, núm trong lỗ), liên kết cộng hóa trị (ví dụ, liên kết disulfid), hoặc cả hai.

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

Thuật ngữ “điều trị”, “việc điều trị”, “sự điều trị” và thuật ngữ tương tự để chỉ một quá trình tác động (như sử dụng một chất, ví dụ, polypeptit, phức, hoặc dược phẩm chứa polypeptit, phức) bắt đầu sau khi một bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh, hoặc triệu chứng của chúng, được chẩn đoán, quan sát, và hoạt động tương tự để cho loại bỏ, giảm, ức chế, giảm nhẹ, hoặc cải thiện, hoặc tạm thời hoặc lâu dài, ít nhất là một trong các nguyên nhân của bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh làm đau đối tượng, hoặc ít nhất là một triệu chứng liên quan đến bệnh, rối loạn, tình trạng bệnh làm đau đối tượng. Do đó, việc điều trị bao gồm ức chế (tức là, làm ngừng sự phát triển hoặc sự tiếp tục phát triển

bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh hoặc triệu chứng lâm sàng liên quan của nó) một bệnh chủ động (ví dụ, để cho làm giảm mức insulin và/hoặc glucoza trong dòng máu, làm tăng mức dung nạp glucoza để cho tối thiểu hóa sự thay đổi mức glucoza, và/hoặc để bảo vệ chống lại các bệnh do sự gián đoạn trong việc ổn định glucoza nội mô gây ra, làm giảm thể trọng, làm ngừng tăng thể trọng).

Thuật ngữ “cần được điều trị” như sử dụng trong bản mô tả này để chỉ quyết định đưa ra bởi bác sĩ hoặc nhân viên y tế khác rằng đối tượng cần được điều trị hoặc sẽ hưởng lợi ích từ việc điều trị này. Quyết định này được đưa ra dựa trên nhiều yếu tố trong phạm vi chuyên môn của bác sĩ hoặc nhân viên y tế.

Thuật ngữ “phòng bệnh”, “sự phòng bệnh”, “việc phòng bệnh” và thuật ngữ tương tự để chỉ một giai đoạn tác động (như sử dụng chất, ví dụ, polypeptit, phức, hoặc được phẩm chứa polypeptit, phức) bắt đầu theo cách (ví dụ, trước khi bắt đầu có bệnh, rối loạn, tình trạng bệnh hoặc triệu chứng của nó) để phòng, ngăn ngừa, ức chế hoặc làm giảm, hoặc tạm thời hoặc lâu dài, nguy cơ ở đối tượng sẽ mắc bệnh, rối loạn, tình trạng bệnh hoặc tương tự (như được xác định bởi, ví dụ, không còn triệu chứng lâm sàng) hoặc làm chậm sự khởi phát bệnh, thường trong trường hợp đối tượng có xu hướng mắc bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể. Trong một số trường hợp, thuật ngữ này còn nhằm để chỉ việc làm chậm quá trình tăng bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh hoặc ức chế quá trình tăng bệnh thành trạng thái có hại hoặc cách khác không mong muốn.

Thuật ngữ “cần phòng bệnh” như sử dụng trong bản mô tả này để chỉ quyết định đưa ra bởi bác sĩ hoặc nhân viên y tế khác mà đối tượng cần được phòng bệnh hoặc sẽ hưởng có từ việc chăm sóc phòng bệnh này. Quyết định này được đưa ra dựa trên nhiều yếu tố trong phạm vi chuyên môn của bác sĩ hoặc nhân viên y tế.

Thuật ngữ “lượng có hiệu quả điều trị” được dùng để chỉ việc sử dụng chất cho đối tượng, hoặc riêng rẽ hoặc ở dạng một phần của dược phẩm và hoặc ở dạng liều đơn hoặc ở dạng một phần của nhiều liều đơn, với lượng có khả năng gây ra hiệu quả tích cực, có thể phát hiện bất kỳ đến triệu chứng, khía cạnh, hoặc đặc điểm bất kỳ của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh khi sử dụng cho bệnh nhân. Lượng có hiệu quả điều trị có thể xác định bằng cách đo tác dụng sinh lý có liên quan. Ví dụ, trong trường hợp tình trạng bệnh tăng đường huyết, việc làm giảm hoặc hạ mức glucoza máu hoặc sự tăng thử nghiệm dung nạp glucoza có thể được sử dụng để xác định liệu lượng chất có hiệu quả để điều trị tình trạng bệnh tăng đường huyết hay không. Ví dụ, lượng có hiệu quả điều trị

là lượng đủ để làm giảm hoặc hạ mức bất kỳ (ví dụ, mức ban đầu) glucoza trong huyết tương khi đói (FPG- fasting plasma glucose), trong đó, ví dụ, lượng là đủ để giảm mức FPG cao hơn 200 mg/dl xuống thấp hơn 200 mg/dl, trong đó lượng là đủ để giảm mức FPG nằm trong khoảng từ 175 mg/dl đến 200 mg/dl xuống thấp hơn mức ban đầu, trong đó lượng là đủ để giảm mức FPG nằm trong khoảng từ 150 mg/dl và 175 mg/dl xuống thấp hơn mức ban đầu, trong đó lượng là đủ để giảm mức FPG nằm trong khoảng từ 125 mg/dl đến 150 mg/dl xuống thấp hơn mức ban đầu, và tương tự (ví dụ, giảm mức FPG xuống thấp hơn 125 mg/dl, xuống thấp hơn 120 mg/dl, xuống thấp hơn 115 mg/dl, xuống thấp hơn 110mg/dl, v.v.). Trong trường hợp mức HbA1c, lượng có hiệu quả là lượng đủ để làm giảm hoặc hạ mức này ở mức lớn hơn khoảng 10% đến 9%, ở mức lớn hơn khoảng 9% đến 8%, ở mức lớn hơn khoảng 8% đến 7%, ở mức lớn hơn khoảng 7% đến 6%, ở mức lớn hơn khoảng 6% đến 5%, và tương tự. Cụ thể hơn, sự giảm hoặc hạ mức HbA1c đến khoảng 0,1%, 0,25%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,5%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50%, hoặc hơn được đề cập bởi sáng chế. Lượng có hiệu quả điều trị có thể được điều chỉnh cùng với phác đồ liều và phân tích chẩn đoán tình trạng bệnh của đối tượng và các yếu tố tương tự.

Thuật ngữ “với lượng đủ để gây ra sự thay đổi” có nghĩa là có sự chênh lệch có thể phát hiện giữa mức của giá trị chỉ thị đo được trước khi (ví dụ, mức ban đầu) và sau khi sử dụng một liệu pháp cụ thể. Giá trị chỉ thị bao gồm thông số mục tiêu bất kỳ (ví dụ, mức glucoza hoặc insulin hoặc lượng hấp thu thức ăn hoặc thể trọng) hoặc thông số mục tiêu (ví dụ, cảm giác khỏe mạnh hoặc sự thèm ăn của đối tượng).

Thuật ngữ “mức dung nạp glucoza”, như sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ khả năng của đối tượng để kiểm soát mức glucoza trong huyết tương và/hoặc insulin trong huyết tương khi sự hấp thụ glucoza thay đổi. Ví dụ, mức dung nạp glucoza bao gồm khả năng của đối tượng làm giảm, trong vòng khoảng 120 phút, mức glucoza trong huyết tương trở lại mức được xác định trước khi đưa glucoza vào.

Thuật ngữ “bệnh tiểu đường” và “bệnh đái tháo đường” để chỉ bệnh tiến triển về sự chuyển hóa carbohydrat liên quan đến việc sản xuất hoặc sử dụng insulin không đủ, thường có đặc trưng là chứng tăng đường huyết và chứng glucoza niệu. Thuật ngữ “tiền-tiểu đường” và “tiền-đái tháo đường” để chỉ trạng thái trong đó đối tượng không có các đặc điểm, triệu chứng và các yếu tố tương tự đặc trưng quan sát thấy ở bệnh tiểu đường, nhưng có các đặc điểm, triệu chứng và các yếu tố tương tự mà, nếu không được điều trị,

có thể tiến triển thành bệnh tiểu đường. Sự có các tình trạng này có thể được xác định bằng cách sử dụng, ví dụ, hoặc thử nghiệm glucoza trong huyết tương khi đói (FPG) hoặc thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng (OGTT- oral glucose tolerance test). Cả hai thử nghiệm này thường yêu cầu đối tượng nhịn đói trong ít nhất là 8 giờ trước khi bắt đầu thử nghiệm. Trong thử nghiệm FPG, mức glucoza máu của đối tượng được đo sau khi kết thúc nhịn đói; thông thường, đối tượng nhịn đói qua đêm và mức glucoza trong máu được đo vào buổi sáng trước khi đối tượng dùng bữa ăn. Đối tượng khỏe mạnh thường sẽ có nồng độ FPG nằm trong khoảng từ 90 đến 100 mg/dl, đối tượng “tiền-tiểu đường” thường sẽ có nồng độ FPG nằm trong khoảng từ 100 đến khoảng 125 mg/dl, và đối tượng mắc “bệnh tiểu đường” thường sẽ có mức FPG trên khoảng 126 mg/dl. Trong OGTT, mức glucoza máu của đối tượng được đo sau khi nhịn đói và đo lại hai giờ sau khi uống thức uống nhiều glucoza. Hai giờ sau khi dùng thức uống nhiều glucoza, đối tượng khỏe mạnh thường có nồng độ glucoza trong máu thấp hơn khoảng 140 mg/dl, đối tượng tiền-đái tháo đường thường có nồng độ glucoza trong máu là khoảng 140 đến khoảng 199 mg/dl, và đối tượng mắc bệnh đái tháo đường thường có nồng độ glucoza trong máu là khoảng 200 mg/dl hoặc hơn. Trong khi các giá trị glucoza máu nêu trên gần với đối tượng người, mức glucoza trong máu bình thường, chứng tăng đường huyết trung bình và chứng tăng đường huyết rõ ràng được phân loại khác ở đối tượng chuột. Đối tượng chuột khỏe mạnh sau bốn giờ nhịn đói thường sẽ có nồng độ FPG nằm trong khoảng từ 100 đến khoảng 150mg/dl, đối tượng chuột có “tiền-tiểu đường” thường sẽ có nồng độ FPG nằm trong khoảng từ 175 đến khoảng 250 mg/dl và đối tượng chuột mắc “bệnh tiểu đường” thường sẽ có nồng độ FPG trên khoảng 250 mg/dl.

Thuật ngữ “chứng kháng insulin” như sử dụng trong bản mô tả này để chỉ tình trạng bệnh trong đó lượng insulin bình thường không thể tạo ra đáp ứng sinh lý hoặc đáp ứng phân tử bình thường. Trong một số trường hợp, lượng cao hơn sinh lý của insulin, hoặc được sản xuất nội sinh hoặc sử dụng ngoại sinh, có khả năng khắc phục chứng kháng insulin, toàn bộ hoặc một phần, và tạo ra đáp ứng sinh học.

Thuật ngữ “hội chứng chuyển hóa” để chỉ một nhóm đặc điểm có liên quan bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chứng tăng insulin huyết, sự dung nạp glucoza bất thường, bệnh béo phì, sự phân phối lại mỡ đến bộ phận cơ thể phía trên hoặc khoang bụng, chứng tăng huyết áp, sự rối loạn phân hủy fibrin, và rối loạn lipid máu có đặc trưng là triglyxerit cao, (HDL)-cholesterol thấp (high density lipoprotein-cholesterol – lipoprotein-

cholesterol tỷ trọng cao), và hạt LDL cao (small dense low density lipoprotein – lipoprotein tỷ trọng thấp đậm đặc nhỏ). Các đối tượng có hội chứng chuyển hóa là có nguy cơ phát triển bệnh tiểu đường typ 2 và/hoặc các rối loạn khác (ví dụ, chứng xơ vữa động mạch vành).

Thuật ngữ “bệnh rối loạn chuyển hóa glucoza” bao gồm bệnh rối loạn bất kỳ có đặc điểm là triệu chứng lâm sàng hoặc tổ hợp các triệu chứng lâm sàng liên quan đến mức glucoza tăng cao và/hoặc mức insulin tăng cao ở đối tượng so với cá thể khỏe mạnh. Mức tăng cao của glucoza và/hoặc insulin có thể xuất hiện trong các bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh sau: chứng tăng đường huyết, bệnh tiểu đường typ II, bệnh tiểu đường thai kỳ, bệnh tiểu đường typ I, chứng kháng insulin, suy giảm dung nạp glucoza, chứng tăng insulin huyết, suy giảm chuyển hóa glucoza, tiền-tiểu đường, các bệnh rối loạn chuyển hóa khác (như hội chứng chuyển hóa, còn được gọi là hội chứng X), và bệnh béo phì, cùng với các rối loạn khác. Các phức theo sáng chế, và chế phẩm chứa nó, có thể được sử dụng, ví dụ, để đạt được và/hoặc duy trì sự ổn định glucoza nội mô, ví dụ, làm giảm mức glucoza trong dòng máu và/hoặc làm giảm mức insulin đến khoảng thấy được ở đối tượng khỏe mạnh.

Thuật ngữ “chứng tăng đường huyết” được dùng trong bản mô tả này để chỉ tình trạng bệnh trong đó lượng tăng cao của glucoza tuần hoàn trong huyết tương của máu của đối tượng so với cá thể khỏe mạnh. Chứng tăng đường huyết có thể được chẩn đoán theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm đo mức glucoza trong máu khi đói như nêu trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “chứng tăng insulin huyết” được dùng trong bản mô tả này để chỉ tình trạng bệnh trong đó có mức tăng cao insulin trong tuần hoàn khi, đồng thời, mức glucoza trong máu hoặc tăng cao hoặc bình thường. Chứng tăng insulin huyết có thể là do chứng kháng insulin liên quan đến rối loạn lipid máu, như triglycerit cao, cholesterol cao, LDL cao và HDL thấp; mức axit uric cao; hội chứng buồng trứng đa u nang; bệnh tiểu đường typ II và bệnh béo phì. Chứng tăng insulin huyết có thể được chẩn đoán khi có mức insulin trong huyết tương cao hơn khoảng 2 $\mu\text{U/mL}$.

Thuật ngữ “bệnh rối loạn thể trọng” được dùng trong bản mô tả này để chỉ tình trạng bệnh liên quan đến việc dư thừa thể trọng và/hoặc tăng sự thèm ăn. Các thông số khác nhau được sử dụng để xác định đối tượng có quá cân so với cá thể khỏe mạnh đối chứng hay không, bao gồm tuổi, chiều cao, giới tính và tình trạng sức khỏe của đối tượng.

Ví dụ, đối tượng có thể được coi là quá cân hoặc béo phì bằng cách đo chỉ số BMI (Body Mass Index – chỉ số khối cơ thể) của đối tượng, chỉ số này được tính bằng cách chia trọng lượng của đối tượng theo kilogam cho bình phương chiều cao của đối tượng theo mét. Một người trưởng thành có chỉ số BMI nằm trong khoảng từ $\sim 18,5$ đến $\sim 24,9 \text{ kg/m}^2$ được coi là có trọng lượng bình thường; người trưởng thành có chỉ số BMI nằm trong khoảng từ ~ 25 đến $\sim 29,9 \text{ kg/m}^2$ có thể được coi là quá cân (tiền-béo phì); và người trưởng thành có chỉ số BMI là $\sim 30 \text{ kg/m}^2$ hoặc cao hơn có thể được coi là béo phì. Sự tăng cảm giác thèm ăn thường góp phần vào việc tăng quá mức thể trọng. Các tình trạng bệnh nghiêm trọng liên quan đến sự tăng cảm giác thèm ăn, bao gồm, ví dụ, hội chứng ăn đêm, có đặc trưng là biếng ăn vào buổi sáng và ăn nhiều vào buổi tối thường liên quan đến chứng mất ngủ, nhưng nó cũng có thể liên quan đến sự tổn thương vùng dưới đồi.

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

Thuật ngữ “chất điều biến” chỉ chung polypeptit theo sáng chế và chất hoạt hóa.

Thuật ngữ “điều biến”, “sự điều biến” và thuật ngữ tương tự chỉ khả năng của một chất (ví dụ, chất hoạt hóa) làm tăng chức năng hoặc hoạt tính của một hoặc nhiều polypeptit (hoặc phân tử axit nucleic mã hóa chúng), hoặc trực tiếp hoặc gián tiếp; hoặc

khả năng của một chất để tạo ra hiệu quả có thể so sánh với hiệu quả của một hoặc nhiều polypeptit.

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

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

Thuật ngữ “biến thể” được dùng trong bản mô tả này bao gồm biến thể xảy ra trong tự nhiên (ví dụ, gen trực giao và biến thể alen) và biến thể không xảy ra trong tự nhiên (ví dụ, biến đổi tái tổ hợp). Biến thể xảy ra trong tự nhiên bao gồm thể tương đồng, tức là, các axit nucleic và polypeptit khác nhau lần lượt trong trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin, từ loài này sang loài khác. Biến thể xảy ra trong tự nhiên bao gồm biến thể alen, tức là, các axit nucleic và polypeptit khác nhau trong trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin, tức là, từ cá thể này đến cá thể khác trong cùng một loài. Biến thể không xảy ra trong tự nhiên bao gồm các axit nucleic và polypeptit có sự thay đổi trong trình tự nucleotit hoặc axit amin, lần lượt, trong đó sự thay đổi trong trình tự này là nhân tạo, ví dụ, sự thay đổi được tạo ra trong phòng thí nghiệm hoặc phương tiện khác bằng sự can thiệp của con người (“bàn tay con người”).

Thuật ngữ “tự nhiên” hoặc “kiểu đại”, khi đề cập đến GDF15, để chỉ GDF15 hoạt động sinh học, có trong tự nhiên, bao gồm biến thể GDF15 hoạt động sinh học, có trong tự nhiên. Thuật ngữ này bao gồm trình tự thành thực GDF15 của người gồm 112 axit amin (SEQ ID NO:1).

Thuật ngữ “mutein” được dùng trong bản mô tả này để chỉ một cách rộng rãi các protein tái tổ hợp, tức là, polypeptit bao gồm sự thay đổi được đưa vào kiểu nhân tạo trong trình tự axit amin, ví dụ, sự thay đổi trong trình tự axit amin tạo ra trong phòng thí

nghiệm hoặc phương tiện khác bằng sự can thiệp của con người (“bàn tay con người”). Các polypeptit này thường mang một hoặc nhiều thay thế hoặc xóa bỏ và thường có nguồn gốc từ gen được tách dòng đã được đưa vào quy trình đột biến ngẫu nhiên hoặc trực tiếp tại điểm, hoặc từ gen tổng hợp hoàn toàn. “Mutein GDF15” theo sáng chế do đó bao gồm, ví dụ, thay thế và/hoặc xóa bỏ (ví dụ, đoạn cắt cụt ở đầu N gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, hoặc 14 axit amin hoặc hơn) so với polypeptit đối chứng, ví dụ, so với GDF15 thành thực tự nhiên/kiểu đại của người (SEQ ID NO:1).

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

Thuật ngữ “ADN”, “axit nucleic”, “phân tử axit nucleic”, “polynucleotit” và tương tự được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này để chỉ dạng polyme của nucleotit có chiều dài bất kỳ, hoặc deoxyribonucleotit hoặc ribonucleotit, hoặc cấu trúc tương tự của chúng. Ví dụ không hạn chế về polynucleotit bao gồm axit nucleic thẳng hoặc vòng, ARN thông tin (mARN), ARN bổ sung (cADN), polynucleotit tái tổ hợp, vectơ, mẫu dò, đoạn mồi và tương tự.

Thuật ngữ “mẫu dò” chỉ mảnh ADN hoặc ARN tương ứng với gen hoặc trình tự quan tâm, trong đó mảnh này đã được đánh dấu phóng xạ (ví dụ, bằng cách đưa vào ³²P

hoặc ^{35}S) hoặc đánh dấu bằng một số phân tử có thể phát hiện khác, như biotin, digoxigenin hoặc fluorescein. Khi duỗi ADN hoặc ARN có trình tự bổ sung sẽ lai, mẫu dò có thể được sử dụng, ví dụ, để đánh dấu mảng virus, khuẩn lạc hoặc vạch vi khuẩn trên gel chứa gen quan tâm. Mẫu dò có thể là ADN tách dòng hoặc có thể là sợi ADN tổng hợp; sợi ADN tổng hợp có thể được sử dụng để thu lấy cADN hoặc dòng vô tính của bộ gen từ protein phân tách, ví dụ, bằng cách giải trình tự một lượng nhỏ của một phần protein, suy ra trình tự axit nucleic mã hóa protein, tổng hợp oligonucleotit mang trình tự này, đánh dấu phóng xạ trình tự này và sử dụng nó làm mẫu dò để sàng lọc thư viện cADN hoặc thư viện bộ gen.

Thuật ngữ “khác nguồn gốc” chỉ hai thành phần được xác định theo cấu trúc có nguồn gốc từ các nguồn khác nhau. Ví dụ, trong trường hợp polypeptit, polypeptit “khác nguồn gốc” có thể bao gồm trình tự axit amin liên kết chức năng có nguồn gốc từ polypeptit khác (ví dụ, thành phần thứ nhất bao gồm polypeptit tái tổ hợp và thành phần thứ hai có nguồn gốc từ polypeptit GDF15 tự nhiên). Tương tự, trong trường hợp polynucleotit mã hóa polypeptit khả năng, polynucleotit “khác nguồn gốc” có thể bao gồm trình tự axit nucleic liên kết chức năng có thể có nguồn gốc từ các gen khác nhau (ví dụ, thành phần thứ nhất từ axit nucleic mã hóa polypeptit theo một phương án bậc lộ trong bản mô tả này và thành phần thứ hai từ axit nucleic mã hóa polypeptit mang). Axit nucleic “khác nguồn gốc” ví dụ khác bao gồm cấu trúc biểu hiện trong đó axit nucleic bao gồm trình tự mã hóa được liên kết chức năng với yếu tố điều hòa (ví dụ, trình tự khởi đầu) từ nguồn gen khác với nguồn gen của trình tự mã hóa (ví dụ, để gây biểu hiện trong tế bào chủ quan tâm, nó có thể có nguồn gen khác với trình tự khởi đầu, trình tự mã hóa hoặc cả hai). Ví dụ, trình tự khởi đầu T7 được liên kết chức năng với polynucleotit mã hóa GDF15 polypeptit hoặc khu vực của nó được coi là axit nucleic khác nguồn gốc. Trong trường hợp tế bào tái tổ hợp, “khác nguồn gốc” có thể để chỉ sự có mặt của một axit nucleic (hoặc sản phẩm gen, như polypeptit) có nguồn gốc gen khác với tế bào chủ mà nó có mặt trong đó.

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

hiện sự biểu hiện tác động đến sự phiên mã và/hoặc dịch mã của polynucleotit thứ hai. Trong trường hợp polypeptit, “liên kết chức năng” để chỉ liên kết chức năng giữa các trình tự axit amin (ví dụ, các khu vực khác nhau) để tạo ra hoạt tính được mô tả của polypeptit.

Như sử dụng trong bản mô tả này trong trường hợp cấu trúc polypeptit, “đầu tận cùng N” (hoặc “đầu tận cùng amin”) và “đầu tận cùng C” (hoặc “đầu tận cùng carboxyl”) lần lượt chỉ các đầu amin và carboxyl xa nhất của polypeptit, trong khi thuật ngữ “đầu N” và “đầu C” để chỉ vị trí tương đối trong trình tự axit amin của polypeptit lần lượt về phía đầu tận cùng N và đầu tận cùng C, và có thể bao gồm các gốc lần lượt ở đầu tận cùng N và đầu tận cùng C. “Ngay đầu N” hoặc “ngay đầu C” để chỉ vị trí của gốc axit amin đầu tiên so với gốc axit amin thứ hai trong đó các gốc axit amin thứ nhất và thứ hai gắn kết cộng hóa trị để tạo ra trình tự axit amin liên kề.

“Có nguồn gốc từ”, trong trường hợp trình tự axit amin hoặc polynucleotit (ví dụ, trình tự axit amin “có nguồn gốc từ” polypeptit GDF15), nhằm chỉ ra rằng polypeptit hoặc axit nucleic có trình tự có nguồn gốc từ trình tự của polypeptit hoặc axit nucleic đối chứng (ví dụ, GDF15polypeptit có trong tự nhiên hoặc axit nucleic mã hóa GDF15), và không có ý nghĩa để giới hạn ở nguồn gốc hoặc phương pháp tạo ra protein hoặc axit nucleic. Bằng các ví dụ, thuật ngữ “có nguồn gốc từ” bao gồm các gen trực giao hoặc biến thể của trình tự axit amin hoặc ADN đối chứng.

Trong trường hợp polypeptit, thuật ngữ “được phân lập” chỉ polypeptit quan tâm mà, nếu có trong tự nhiên, đang ở môi trường khác với môi trường trong đó nó có nguồn gốc tự nhiên. “Được phân lập” nhằm bao gồm các polypeptit ở các mẫu mà gần như được làm giàu polypeptit quan tâm và/hoặc trong đó polypeptit quan tâm được tinh chế một phần hoặc gần như tinh khiết. Khi polypeptit không có trong tự nhiên, “được phân lập” chỉ polypeptit đã được phân tách ra khỏi môi trường nơi nó được tạo ra theo phương pháp tổng hợp hoặc phương pháp tái tổ hợp.

Thuật ngữ “làm giàu” có nghĩa là một mẫu được xử lý theo cách phi tự nhiên (ví dụ, trong phòng thí nghiệm, ví dụ, bởi nhà khoa học hoặc dược sĩ lâm sàng) sao cho polypeptit quan tâm có mặt với nồng độ cao hơn (ví dụ, cao hơn ít nhất 3 lần, cao hơn ít nhất 4 lần, cao hơn ít nhất là 8 lần, cao hơn ít nhất 64 lần, hoặc hơn) so với nồng độ của polypeptit trong mẫu ban đầu, như mẫu sinh phẩm (ví dụ, mẫu trong đó polypeptit có

trong tự nhiên hoặc nó có trong đó sau khi sử dụng), hoặc b) nồng độ cao hơn môi trường trong đó tạo ra polypeptit (ví dụ, như trong tế bào vi khuẩn).

“Gần như tinh khiết” chỉ một thành phần (ví dụ, polypeptit, đime, tetrame, phức) chiếm hơn khoảng 50% tổng hàm lượng của chế phẩm, và đặc trưng cao hơn khoảng 60% tổng hàm lượng polypeptit. Đặc trưng hơn, “gần như tinh khiết” để chỉ chế phẩm trong đó ít nhất 75%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc nhiều hơn của tổng chế phẩm là thành phần quan tâm. Trong một số trường hợp, thành phần này sẽ chiếm cao hơn khoảng 90%, hoặc cao hơn khoảng 95% tổng hàm lượng của chế phẩm.

Thuật ngữ “kháng thể” (Ab) và “globulin miễn dịch” (Ig) để chỉ glycoprotein có đặc điểm cấu trúc giống nhau. Trong khi kháng thể thể hiện tính đặc hiệu gắn kết với kháng nguyên đặc hiệu, các globulin miễn dịch bao gồm cả kháng thể và phân tử giống kháng thể khác không có tính đặc hiệu kháng nguyên. Kháng thể được mô tả chi tiết sau đây.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” để chỉ kháng thể thu được từ nhóm các kháng thể gần như tương đồng, tức là, các kháng thể riêng biệt bao gồm nhóm giống nhau ngoại trừ có thể có các đột biến có thể xảy ra tự nhiên với lượng rất nhỏ. Kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao, trực tiếp nhằm vào một vị trí kháng nguyên. Ngược với chế phẩm kháng thể đa dòng, có thể bao gồm các kháng thể khác nhau trực tiếp kháng các yếu tố xác định khác nhau (epitop), mỗi kháng thể đơn dòng trực tiếp nhằm vào một yếu tố xác định trên kháng nguyên.

Trong trường hợp kháng thể, thuật ngữ “được phân lập” chỉ kháng thể đã được phân tách và/hoặc thu hồi từ các thành phần tạp chất trong môi trường tự nhiên của nó; thành phần tạp chất như vậy bao gồm nguyên liệu có thể gây cản trở cho việc sử dụng để chẩn đoán hoặc điều trị của kháng thể này, và có thể bao gồm enzym, hormon, và các chất tan có protein hoặc không có protein.

Thuật ngữ “thay thế bảo tồn” để chỉ việc thay thế các gốc axit amin trong nhóm sau: 1) L, I, M, V, F; 2) R, K; 3) F, Y, H, W, R; 4) G, A, T, S; 5) Q, N; và 6) D, E. Thay thế axit amin bảo tồn có thể giữ hoạt tính của protein bằng cách thay thế (các) axit amin trong protein bằng một axit amin có mạch bên có tính axit, tính bazơ, điện tích, độ phân cực hoặc kích thước của mạch bên tương tự. Định hướng cho thay thế, cài xen, hoặc xóa bỏ có thể dựa trên sự sắp thẳng hàng trình tự axit amin của các protein biến thể hoặc protein từ các loài khác nhau.

Yếu tố biệt hóa tăng trưởng 15 (GDF15 - Growth Differentiation Factor 15)

GDF15, còn được gọi là MIC-1 (macrophage inhibitory cytokine-1 – xytokin ức chế đại thực bào 1), PDF (prostate differentiation factor - yếu tố biệt hóa tuyến tiền liệt), PLAB (placental bone morphogenetic protein - protein tạo xương nhau), NAG-1 (gen hoạt hóa thuốc chống viêm không steroid (NSAID)), TGF-PL, và PTGFB, là một thành phần của siêu họ yếu tố tăng trưởng chuyển dạng β (TGF- β - transforming growth factor β). GDF15, được tổng hợp ở dạng tiền protein nội bào cỡ 62kDa sau đó được phân cắt bằng proteaza giống furin, được tiết ra ở dạng protein liên kết disulfit kích thước 25kDa. (Xem, ví dụ, Fairlie et al., J. Leukoc. Biol 65:2-5 (1999)). mARN GDF15 được phát hiện thấy trong các mô khác nhau, bao gồm gan, thận, tụy, kết tràng và nhau thai, và sự biểu hiện GDF15 ở gan có thể được điều hòa tăng đáng kể khi có tổn thương các cơ quan như gan, thận, tim và phổi.

Tiền GDF15 là một polypeptit kích thước 308 axit amin (NCBI Ref. Seq.NP_004855.2) chứa peptit tín hiệu gồm 29 axit amin, vùng tiền chức năng gồm 167 axit amin, và khu vực thành thực chứa 112 axit amin được cắt ra từ vùng tiền chức năng bởi proteaza giống furin. Polypeptit GDF15 gồm 308-axit amin được gọi là polypeptit GDF15 “chiều dài đầy đủ”; polypeptit GDF15 gồm 112-axit amin (axit amin 197-308 của GDF15 “chiều dài đầy đủ”) là một polypeptit GDF15 “thành thực” (SEQ ID NO:1). Trừ khi được nêu rõ khác, thuật ngữ “GDF15” để chỉ trình tự 112 axit amin thành thực của người. Ngoài ra, các đánh số viện dẫn đến các gốc GDF15 cụ thể là để chỉ trình tự 112 axit amin thành thực (tức là, gốc 1 là Ala (A), và gốc 112 là Ile (I); xem SEQ ID NO:1). Chú ý, trong khi trình tự axit amin của tiền GDF15 dự đoán ba vị trí cắt, tạo ra ba dạng giả định của GDF15 “thành thực” của người (tức là, 110, 112 và 115 axit amin), trình tự 112 axit amin thành thực được chấp nhận là đúng.

Phạm vi của sáng chế bao gồm các gen trực giao của GDF15, và các dạng biến đổi của chúng, từ các loài động vật có vú khác, và việc sử dụng chúng, bao gồm chuột (NP_035949), tinh tinh (XP_524157), đười ươi (XP_002828972), khỉ rezut (EHH29815), gấu trúc khổng lồ (XP_002912774), vượn (XP_003275874), chuột lang (XP_003465238), chồn sương (AER98997), bò (NP_001193227), lợn (NP_001167527), chó (XP_541938) và thú mỏ vịt (*Ornithorhynchus anatinus*; AFV61279). Dạng thành

thực của GDF15 của người có mức tương đồng axit amin khoảng 67% với gen trực giao của chuột.

Để thuận tiện, các phân tử GDF15 biến đổi của người, biến thể GDF15 (ví dụ, mutein), và mutein GDF15 biến đổi mô tả từ đây về sau được gọi chung là “(các) polypeptit”. Nên chú ý rằng khi đề cập bất kỳ đến “của người” liên quan với polypeptit và phân tử axit nucleic theo sáng chế không có nghĩa giới hạn về cách thu được polypeptit hoặc axit nucleic hoặc nguồn gốc của chúng, mà chỉ trình tự có thể tương ứng với trình tự của polypeptit hoặc phân tử axit nucleic của người có trong tự nhiên. Theo các phương án cụ thể, phân tử GDF15 biến đổi của người là các đime được glycosyl hóa tại N. Ngoài các polypeptit của người và phân tử axit nucleic mã hóa chúng, sáng chế đề xuất polypeptit liên quan đến GDF15 và phân tử axit nucleic tương ứng từ loài khác.

A. Polypeptit có đặc điểm vật lý mong muốn

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

Để thuận tiện và rõ ràng, trình tự axit amin của SEQ ID NO:1 được sử dụng làm trình tự đối chiếu cho polypeptit nêu trong bản mô tả này. Do đó, vị trí các gốc axit amin được đánh số trong bản mô tả này có viện dẫn đến SEQ ID NO:1. Trình tự của SEQ ID NO:1 được nêu sau đây:

ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTY
DDLLAKDCHCI

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

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

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

Theo một số phương án nhất định, polypeptit có thể bao gồm một hoặc nhiều xóa bỏ so với SEQ ID NO:1 mà tạo ra vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N ở vị trí bị mất. Ví dụ, trình tự NGDHCPLGPGRCCRLHT (SEQ ID NO:119) ở SEQ ID NO:1 có thể thay đổi bằng cách loại bỏ axit amin D đến H (gạch chân) bằng cách đó tạo ra vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N: NGT.

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

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

Theo một số phương án nhất định, polypeptit có thể bao gồm trình tự axit amin liên kề tương đồng ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1, trong đó trình tự axit amin liên kề có thay thế D5T/S hoặc R21N.

Theo một số phương án nhất định, polypeptit có thể bao gồm trình tự axit amin liên kề tương đồng ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%

so với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1, trong đó trình tự axit amin liền kề có ít nhất là một trong các cặp thay thế so với axit amin tương ứng ở SEQ ID NO:1 như sau:

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

Ví dụ, thay thế theo mục i) nêu trên có nghĩa là polypeptit có threonin (T) hoặc serin(S) ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 18 ở SEQ ID NO:1, trong đó ở SEQ ID NO:1, histidin (H) có mặt ở vị trí axit amin 18. Tương tự, thay thế của D ở vị trí 5 là với T hoặc S có thể được ký hiệu là D5T/S. Vị trí của axit amin tương ứng trong polypeptit so với SEQ ID NO:1 có thể được xác định bằng cách sắp thẳng hàng các trình tự axit amin.

Theo một số phương án nhất định, polypeptit có thể bao gồm hai thay thế (một cặp thay thế) tạo ra một trình tự liên ứng N-glycosyl hóa ở một vị trí mà tại đó không quan sát thấy trình tự liên ứng glycosyl hóa tại N ở SEQ ID NO:1. Ví dụ về các thay thế như vậy bao gồm R16N và H18T/S; K91N và D93T/S; T94N và V96T/S; và thay thế khác được nêu trên. R16N và H18T/S có nghĩa là polypeptit có N ở vị trí tương ứng với vị trí 16 của SEQ ID NO:1, trong đó ở SEQ ID NO:1, R có mặt và polypeptit có hoặc T hoặc S ở vị trí tương ứng với vị trí 18 ở SEQ ID NO:1, trong đó H có mặt. Do trình tự

RXH (ở vị trí 16-18) ở SEQ ID NO:1 không chứa gốc bất kỳ cho trình tự liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N, cặp thay thế sẽ tạo ra trình tự liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N.

Theo các phương án khác, một thay thế có thể là đủ để tạo ra trình tự liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N, ví dụ, do trình tự NGD (ở vị trí 3-5) có ở SEQ ID NO:1, việc thay thế một axit amin D bằng T hoặc S sẽ lần lượt tạo ra trình tự NGT hoặc NGS, cả hai đều là trình tự liên ứng N-glycosyl hóa.

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

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

Sáng chế còn đề xuất polypeptit là các mảnh hoạt tính (ví dụ, trình tự con) chứa các polypeptit được mô tả trên. Chiều dài của các mảnh hoặc trình tự con hoạt tính có thể là 40 axit amin đến 111 axit amin, ví dụ, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 106, 109, hoặc tối đa là 111 axit amin.

Polypeptit có mức tương đồng trình tự được xác định so với trình tự đối chứng trên chiều dài xác định gồm các axit amin liên kế (ví dụ, “cửa sổ so sánh”). Phương pháp sắp thẳng hàng trình tự để so sánh đã biết trong lĩnh vực này. Sự sắp thẳng hàng tối ưu các trình tự để so sánh có thể được thực hiện, ví dụ, bằng thuật toán mức tương đồng cục bộ của Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), bằng thuật toán sắp thẳng hàng tương đồng của Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), bằng cách tra cứu phương pháp tương đồng của Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), bằng hệ thống xử lý được máy tính hóa của các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA trong gói phần mềm Wisconsin Genetics, Madison,

Wis.), hoặc bằng cách sắp thẳng hàng thủ công và kiểm tra bằng mắt thường (xem, ví dụ, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., bản phụ lục năm 1995)).

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

Các mảnh ví dụ của polypeptit bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm polypeptit có vài xóa bỏ so với SEQ ID NO:1. Ví dụ, polypeptit có thể có đoạn cắt cụt ở đầu N và/hoặc đoạn cắt cụt ở đầu C so với SEQ ID NO:1. Các đoạn cắt cụt có thể có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 axit amin hoặc hơn so với polypeptit đối chứng, ví dụ, SEQ ID NO:1. Theo một số phương án nhất định, polypeptit quan tâm có thể bao gồm một hoặc nhiều thay thế mà nó tạo ra trình tự liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N, như trình tự được bộc lộ trong bản mô tả này, và đoạn cắt cụt ở đầu N và/hoặc đoạn cắt cụt ở đầu C so với SEQ ID NO:1.

Theo một số phương án nhất định, polypeptit có thể dài ít nhất là 98 axit amin và có mức tương đồng trình tự axit amin ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với đoạn duỗi thẳng tương ứng gồm 98 axit amin ở SEQ ID NO:1. Polypeptit này có thể không có từ 2 đến 14 axit amin đầu tiên (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, hoặc 14 axit amin) có ở đầu tận cùng N của SEQ ID NO:1, trong khi vẫn giữ axit amin có ở đầu tận cùng C của SEQ ID NO:1. Nói cách khác, các xóa bỏ tương ứng với các axit amin đầu tận cùng N của SEQ ID NO:1.

Theo một số phương án nhất định, mutein GDF15 có thể dài ít nhất 106 axit amin và có mức tương đồng trình tự axit amin ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với đoạn duỗi thẳng tương ứng gồm 106 axit amin ở SEQ ID NO:1. Mutein GDF15 có thể không có sáu axit amin đầu tiên có ở đầu tận cùng N của SEQ ID NO:1.

Theo một số phương án nhất định, polypeptit có thể dài ít nhất 109 axit amin và có mức tương đồng trình tự axit amin ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với đoạn duỗi thẳng tương ứng gồm 109 axit amin ở SEQ ID NO:1. Mutein GDF15 có thể không có ba axit amin đầu tiên có ở đầu tận cùng N của SEQ ID NO:1.

Polypeptit ví dụ theo sáng chế có thể bao gồm bị mất hai axit amin đầu N ($\Delta N2$) so với WT hGDF15 và có thể dung nạp với trình tự Fc ở đầu tận cùng N. Tuy nhiên, khi đề cập đến vị trí của thay thế, số gốc chỉ ra số tương ứng với vị trí trong hGDF15 WT thành thực (WT; SEQ ID NO:1). Do đó, axit amin N ở đầu tận cùng N của polypeptit không có hai axit amin đầu tiên ở đầu tận cùng N có thể được gọi là gốc 3 mặc dù nó là axit amin thứ nhất trong trình tự axit amin của mutein polypeptit GDF15 và trước đó là trình tự axit amin khác nguồn gốc (ví dụ, Fc).

Như chú ý ở trên, các mảnh polypeptit có thể bao gồm một hoặc nhiều thay thế mà tạo ra trình tự liên ứng N-glycosyl hóa so với trình tự SEQ ID NO:1, như, một, hai, hoặc nhiều thay thế được bộc lộ trong bản mô tả này.

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

Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất các dạng biến đổi của GDF15 thành thực của người và mutein GDF15 (như polypeptit được mô tả ở trên) bằng cách liên hợp với albumin. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất việc biến đổi polypeptit bằng cách N-glycosyl hóa hoặc O-glycosyl hóa. Các đặc điểm của albumin và thể dung hợp polypeptit của nó (ví dụ, protein dung hợp), và polypeptit glycosyl hóa được mô tả rõ hơn sau đây.

Polypeptit dung hợp Fc-GDF15 và phức của nó

Theo phương án ví dụ, polypeptit GDF15 bộc lộ trong bản mô tả này có thể là ở dạng polypeptit dung hợp bao gồm polypeptit Fc hoặc mảnh của nó dung hợp với trình tự axit amin của một hoặc nhiều polypeptit nêu trong bản mô tả này (ví dụ, phân tử GDF15 của người, phân tử GDF15 biến đổi của người, mutein GDF15, và mutein GDF15

biến đổi). Như nêu trong bản mô tả này, polypeptit GDF15 có thể là polypeptit kiểu đại hoặc mutein, ví dụ, mutein glycosyl hóa. Như sử dụng trong bản mô tả này, “mutein glycosyl hóa” hoặc “glycomutein” hoặc “biến thể glycosyl hóa” hoặc “biến thể-glyco” trong trường hợp polypeptit, ví dụ, polypeptit GDF15 để chỉ polypeptit chứa một hoặc nhiều vị trí liên ứng glycosyl hóa ở vị trí trong trình tự axit amin tại vị trí này polypeptit đối chứng (kiểu đại) không chứa vị trí liên ứng glycosyl hóa. Trong một số trường hợp, polypeptit dung hợp có thể bao gồm trình tự Fc dung hợp với đầu tận cùng N của GDF15 glycomutein bộc lộ trong bản mô tả này.

Trình tự polypeptit Fc bất kỳ nêu trong bản mô tả này hoặc đã biết trong lĩnh vực này có thể là một thành phần của protein dung hợp theo sáng chế. Các thành phần của protein dung hợp này có thể tùy chọn liên kết cộng hóa trị qua trình tự liên kết, như các trình tự liên kết nêu trong bản mô tả này. Theo một số phương án của sáng chế, protein dung hợp bao gồm trình tự polypeptit Fc là gốc đầu N và polypeptit nêu trong bản mô tả này là gốc đầu C.

Trong một số trường hợp, phần Fc của polypeptit dung hợp Fc-GDF15 bộc lộ trong bản mô tả này có thể là Fc có trình tự IgG Fc của người (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4) hoặc biến thể của nó. Trình tự axit amin của IgG1 Fc của người được nêu là SEQ ID NO:2:

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:2)

Vùng bản lề được in nghiêng, khu vực CH2 được gạch chân và khu vực CH3 được gạch chân kép. Việc đánh số vị trí của axit amin trong trình tự Fc là theo cách đánh số EU (Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)). Do đó, gốc axit glutamic “E” ở vị trí 1 ở SEQ ID NO:2 được đánh số là 216; khu vực CH2 bắt đầu tại alanin (A) được đánh số là 231; khu vực CH3 bắt đầu tại glyxin (G) được đánh số 341, theo cách đánh số EU.

Phần Fc của polypeptit dung hợp Fc-GDF15 bộc lộ trong bản mô tả này có thể là Fc có trình tự axit amin liên kề tương đồng ít nhất là 90% với SEQ ID NO:2, ví dụ, ít nhất là 93%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc hơn với SEQ ID NO:2.

Theo một số phương án nhất định, phần Fc có thể là mảnh Fc bao gồm khu vực CH3 hoặc trình tự axit amin liên kề tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với khu vực CH3 ở SEQ ID NO:2. Theo một số phương án nhất định, phần Fc có thể là mảnh Fc bao gồm khu vực CH2 và khu vực CH3 hoặc trình tự axit amin liên kề tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với khu vực CH2 và CH3 ở SEQ ID NO:2. Theo một số phương án nhất định, phần Fc có thể là mảnh Fc gồm một phần vùng bản lề, khu vực CH2, và khu vực CH3 hoặc trình tự axit amin liên kề tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với vùng bản lề, khu vực CH2, và khu vực CH3 ở SEQ ID NO:2. Theo một số phương án nhất định, phần Fc có thể có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:2.

Trong một số trường hợp, phần Fc của polypeptit dung hợp Fc-GDF15 có thể bao gồm cấu trúc lõi được xử lý mà cấu trúc lõi này có thể kết hợp với polypeptit Fc khác bao gồm cấu trúc lõm được xử lý. Trong các trường hợp khác, phần Fc của polypeptit dung hợp Fc-GDF15 có thể bao gồm cấu trúc lõm được xử lý mà cấu trúc lõm này có thể kết hợp với polypeptit Fc khác bao gồm cấu trúc lõi được xử lý. Trình tự Fc ví dụ có cấu trúc lõi và/hoặc cấu trúc lõm được xử lý được mô tả trong US 8,216,805. Trong một số trường hợp, cấu trúc lõi và cấu trúc lõm có thể được xử lý thành khu vực CH3 của polypeptit Fc. Trong một số trường hợp, phần Fc kết hợp với polypeptit dung hợp Fc-GDF15 theo sáng chế, là không được liên hợp với polypeptit GDF15. Do đó, phần Fc tạo đime với polypeptit dung hợp Fc-GDF15 tạo ra heterodime, có một phân tử GDF15 trên mỗi heterodime.

“Cấu trúc lõi” hoặc “núm” có thể được xử lý bằng cách thay thế các mạch bên axit amin nhỏ trong khu vực CH3 của polypeptit thứ nhất bằng các mạch bên lớn hơn (ví dụ tyrosin hoặc tryptophan). Các “cấu trúc lõm” hoặc “lỗ” bù là có kích thước giống hoặc tương tự với cấu trúc lõi tùy chọn được tạo ra trong khu vực CH3 của polypeptit thứ hai bằng cách thay thế các mạch bên axit amin lớn bằng mạch bên nhỏ hơn (ví dụ alanin hoặc threonin).

“Polypeptit thứ nhất” có thể là polypeptit bất kỳ kết hợp với polypeptit thứ hai. Polypeptit thứ nhất và thứ hai gặp nhau ở “bề mặt tiếp xúc” (định nghĩa sau đây). Ngoài bề mặt tiếp xúc này, polypeptit thứ nhất có thể bao gồm một hoặc nhiều khu vực bổ sung,

như khu vực CH₂ hoặc vùng bản lề. Trong một số trường hợp, polypeptit thứ nhất bao gồm khu vực CH₃ có thể tạo ra bề mặt tiếp xúc của polypeptit thứ nhất.

“Polypeptit thứ hai” có thể là polypeptit bất kỳ kết hợp với polypeptit thứ nhất qua một “bề mặt tiếp xúc”. Ngoài bề mặt tiếp xúc này, polypeptit thứ hai có thể bao gồm một hoặc nhiều khu vực bổ sung, như khu vực CH₂ hoặc vùng bản lề. Trong một số trường hợp, polypeptit thứ hai bao gồm khu vực CH₃ có thể tạo ra bề mặt tiếp xúc của polypeptit thứ hai.

“Bề mặt tiếp xúc” bao gồm các gốc axit amin “tiếp xúc” (hoặc các nhóm không phải axit amin khác như nhóm carbohydrat, NADH, biotin, FAD hoặc nhóm hem) trong polypeptit thứ nhất, chúng tương tác với một hoặc nhiều gốc axit amin “tiếp xúc” (hoặc các nhóm không phải axit amin khác) trong bề mặt tiếp xúc của polypeptit thứ hai. Trong một số trường hợp, bề mặt tiếp xúc này có thể là khu vực của globulin miễn dịch như khu vực cố định (hoặc mảnh của nó). Trong một số trường hợp, bề mặt tiếp xúc bao gồm khu vực CH₃ của globulin miễn dịch có nguồn gốc từ kháng thể IgG, ví dụ, kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 của người.

“Cấu trúc lõi” để chỉ ít nhất là một mạch bên axit amin nhô ra khỏi bề mặt tiếp xúc của polypeptit thứ nhất và do đó có thể đặt vị trí vào trong cấu trúc lõm bù trong bề mặt tiếp xúc liền kề (tức là bề mặt tiếp xúc của polypeptit thứ hai) để ổn định heterodime, và ví dụ bằng cách đó ưu tiên sự hình thành heterodime so với sự hình thành homodime. Cấu trúc lõi có thể tồn tại trong bề mặt tiếp xúc ban đầu hoặc có thể được tiến hành tổng hợp (ví dụ bằng cách thay đổi axit nucleic mã hóa bề mặt tiếp xúc). Cấu trúc lõi có thể được tiến hành tổng hợp (ví dụ bằng cách thay đổi axit nucleic mã hóa bề mặt tiếp xúc) ví dụ, bằng các phương pháp tái tổ hợp.

“Cấu trúc lõm” để chỉ ít nhất là một mạch bên axit amin thụt vào so với bề mặt tiếp xúc của polypeptit thứ hai và do đó khớp với cấu trúc lõi tương ứng trên bề mặt tiếp xúc liền kề của polypeptit thứ nhất. Cấu trúc lõm có thể tồn tại trong bề mặt tiếp xúc ban đầu hoặc có thể được tiến hành tổng hợp (ví dụ bằng cách thay đổi axit nucleic mã hóa bề mặt tiếp xúc). Ví dụ, axit nucleic mã hóa bề mặt tiếp xúc của polypeptit thứ hai được biến đổi để mã hóa cấu trúc lõm.

Cấu trúc lõi cũng được gọi là ‘núm’ và cấu trúc lõm cũng được gọi là ‘lỗ’. Cấu trúc lõi và cấu trúc lõm ví dụ được bộc lộ trong US8,216,805 và bao gồm thay thế ở các vị trí axit amin sau: 347, 366, 368, 394, 405, và 407. Việc đánh số vị trí axit amin là theo

cách đánh số EU. Cấu trúc lõi được xử lý có thể bao gồm ít nhất là một thay thế tương ứng trong trình tự IgG1 Fc của người, trong đó sự thay thế là ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin 347, 366 và 394. Ví dụ, ít nhất là một thay thế được chọn từ nhóm bao gồm Q347W/Y, T366W/Y, và T394W/Y. Trong một số trường hợp, cấu trúc lõi được xử lý bao gồm ít nhất là một thay thế tương ứng trong trình tự IgG1 Fc của người, trong đó thay thế là ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin 366, 368, 394, 405, và 407. Ví dụ, ít nhất là một thay thế được chọn từ nhóm bao gồm T366S, L368A, T394S, F405T/V/A, và Y407T/V/A.

Trong một số trường hợp, cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế T366W/Y và cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế T366S, L368A, và Y407T/V/A.

Ví dụ, cấu trúc lõi có thể bao gồm axit amin thay thế T366W/Y và cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế Y407T/V/A. Trong các trường hợp khác, cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế T366Y và cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế Y407T. Trong các ví dụ khác, cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế T366W và cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế Y407A. Trong các ví dụ khác nữa, cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế T394Y và cấu trúc lõi có thể bao gồm thay thế Y407T.

Theo một số phương án nhất định, phần Fc của polypeptit GDF15 trong polypeptit dung hợp có thể bao gồm các đột biến bổ sung sẽ cải thiện đặc tính của polypeptit dung hợp. Như vậy, trình tự Fc trong polypeptit thứ nhất và thứ hai nêu trong bản mô tả này, có thể bao gồm các đột biến bổ sung. Ví dụ, trình tự của phần Fc có thể bao gồm (các) đột biến mà triệt tiêu (ví dụ, làm giảm hoặc loại bỏ) chức năng hiệu ứng của IgG cách mà chức năng này khác có thể là một đặc điểm của phần Fc. Trong một số trường hợp, trình tự của phần Fc có thể bao gồm (các) đột biến triệt tiêu chức năng hiệu ứng như hiện tượng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC - complement-dependent cytotoxicity), hiện tượng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC - antibody-dependent cellular cytotoxicity) và thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP - antibody-dependent cell phagocytosis).

Bốn isotyp IgG của người gắn kết thụ thể Fcγ hoạt hóa (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa), thụ thể FcγRIIb ức chế, và thành phần thứ nhất của bổ thể (C1q) với các ái lực khác nhau, gây ra các chức năng hiệu ứng rất khác nhau. Do đó, các đột biến trong vùng gắn kết có thể có tác động đáng kể lên chức năng hiệu ứng.

Sự gắn kết của IgG với các FcγR hoặc C1q phụ thuộc vào các gốc nằm trong vùng bản lề và khu vực CH2. Hai vùng của khu vực CH2 là có tính quyết định cho sự gắn kết FcγR và C1q, và có trình tự duy nhất trong IgG2 và IgG4. Sự thay thế axit amin vào trong các gốc trong IgG1 hoặc IgG2 của người ở vị trí 233-236 và gốc IgG4 ở vị trí 327, 330 và 331 đã được thể hiện là làm giảm hoạt tính ADCC và CDC (Armour KL. et al., 1999. Eur J Immunol. 29(8):2613-24; Shields RL et al., 2001, J Biol Chem. 276(9):6591-604). Hơn nữa, Idusogie et al. đã chứng minh rằng thay thế alanin ở các vị trí khác nhau, bao gồm K322, làm giảm đáng kể sự hoạt hóa bổ thể (Idusogie EE. et al., 2000. J Immunol. 164(8):4178-84). Tương tự, các đột biến trong khu vực CH2 của IgG2A chuột đã thể hiện là làm giảm sự gắn kết với FcγRI, và C1q (Steurer W. et al., 1995. J Immunol. 155(3):1165- 74). Theo một số phương án nhất định, polypeptit Fc có thể bao gồm đột biến trong khu vực CH2 triệt tiêu chức năng hiệu ứng của (các) IgG. Các đột biến ví dụ trong vùng CH2 bao gồm: APELLGGP (SEQ ID NO:96)→ APALLGGP (SEQ ID NO:98); APELGGP (SEQ ID NO:96)→ APELAGGP (SEQ ID NO:99); và APELLGGP (SEQ ID NO:96)→ APALAGGP (SEQ ID NO:97).

Theo một số phương án, polypeptit Fc được liên hợp với GDF15 glycomutein bao gồm một phần hoặc toàn bộ trình tự bản lề kiểu đại (thường ở đầu tận cùng N của nó). Theo một số phương án, polypeptit Fc không bao gồm trình tự bản lề chức năng hoặc kiểu đại. Trong một số trường hợp, trình tự Fc có thể bao gồm một trong các trình tự bản lề sau đây: EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:100); KSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:101); SCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:102); CDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:103); DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:104); KTHTCPPCP (SEQ ID NO:105); THTCPPCP (SEQ ID NO:106); hoặc CPPCP (SEQ ID NO:107); hoặc biến thể của nó được thay thế một hoặc nhiều axit amin (ví dụ, thay thế 1-6 axit amin, ví dụ, thay thế 1-5, 1-4, 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 axit amin). Trong một số trường hợp, trình tự Fc có thể bao gồm vùng bản lề tạo ra liên kết cộng hóa trị (ví dụ, một hoặc nhiều liên kết disulphit) với vùng bản lề của Fc khác. Do đó, theo một số phương án nhất định, polypeptit thứ nhất và thứ hai trong các phức bậc lộ trong bản mô tả này có thể được kết hợp qua tương tác cộng hóa trị giữa các vùng bản lề của polypeptit thứ nhất và thứ hai. Tương tác cộng hóa trị có thể bao gồm một hoặc hai liên kết disulphit nội phân tử.

Được bộc lộ chi tiết trong bản mô tả này, polypeptit thứ nhất bao gồm trình tự Fc núp hoặc lõ được liên hợp với GDF15 glycomutein được đề xuất. Polypeptit như vậy có

thể là phức với polypeptit Fc thứ hai mà polypeptit thứ nhất có thể kết hợp vật lý với nó bằng cách đặt núp vào trong lỗ của trình tự Fc.

Trong một số trường hợp, sáng chế bộc lộ phức của polypeptit Fc thứ nhất và polypeptit Fc thứ hai. Một trong polypeptit thứ nhất hoặc thứ hai có thể là polypeptit dung hợp của Fc và GDF15. Như đã được lưu ý trong bản mô tả này, polypeptit GDF15 có thể bao gồm (các) đột biến glycosyl hóa dẫn đến sự glycosyl hóa polypeptit GDF15. Polypeptit GDF15 đã glycosyl hóa cũng có thể được gọi là GDF15-glycan hoặc GDF15-glycomutein. GDF15-glycan hoặc GDF15-glycomutein có thể là như bộc lộ trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, GDF15-glycan hoặc GDF15-glycomutein dung hợp với polypeptit Fc-núp hoặc Fc-lỗ nêu trong bản mô tả này có thể là polypeptit bao gồm trình tự axit amin liền kề có mức tương đồng ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1, trong đó trình tự axit amin liền kề có thay thế D5T; D5S; hoặc R21N so với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1. Theo một số phương án nhất định, GDF15-glycan hoặc GDF15-glycomutein dung hợp với polypeptit Fc-núp hoặc Fc-lỗ có thể là polypeptit có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1, trong đó trình tự axit amin bao gồm một hoặc nhiều cặp thay thế sau so với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1:

- xvii. R16N và H18T hoặc R16N và H18S;
- xviii. S23N và E25T hoặc S23N và E25S;
- xix. S50N và F52T hoặc S50N và F52S;
- xx. F52N và A54T hoặc F52N và A54S;
- xxi. R53N và A55T hoặc R53N và A55S;
- xxii. S64N và H66T hoặc S64N và H66S;
- xxiii. K91N và D93T hoặc K91N và D93S;
- xxiv. D93N và G95T hoặc D93N và G95S;
- xxv. T94N và V96T hoặc T94N và V96S;
- xxvi. V96N và L98T hoặc V96N và L98S;
- xxvii. S97N và Q99T hoặc S97N và Q99S; và
- xxviii. A106N và D108T hoặc A106N và D108S

Trong một số trường hợp, phức có thể bao gồm polypeptit thứ nhất và thứ hai. Polypeptit thứ nhất có thể bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc có thể bao gồm trình

tự CH3 bao gồm ít nhất là một cấu trúc lõi được xử lý; và polypeptit thứ hai bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lõi được xử lý, trong đó polypeptit thứ nhất tạo đime với polypeptit thứ hai thông qua việc đặt vị trí cấu trúc lõi của polypeptit thứ nhất vào trong cấu trúc lõi của polypeptit thứ hai, và trong đó hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ nhất hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ hai được liên hợp với đầu tận cùng N của mutein GDF15 bao gồm ít nhất là một vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N. Theo đó, phức bao gồm heterodime của polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai. Do hoặc là polypeptit thứ nhất hoặc là polypeptit thứ hai được dung hợp với mutein GDF15 bộc lộ trong bản mô tả này, có một phân tử GDF15 trong mỗi heterodime. Trong một số trường hợp, mutein GDF15 có thể là mutein GDF15 nêu trong bản mô tả này.

Như bản luận trong bản mô tả này, polypeptit thứ nhất và thứ hai có thể tương tác để tạo ra heterodime thông qua tương tác cộng hóa trị và/hoặc tương tác không cộng hóa trị, như, tương tác kỵ nước, liên kết disulfit, hoặc cả hai.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế bộc lộ phức bao gồm heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai. Mỗi trong số heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai có thể bao gồm polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai, trong đó polypeptit thứ nhất có thể bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này có thể bao gồm trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lõi được xử lý; polypeptit thứ hai có thể bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này có thể bao gồm trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lõi được xử lý; trong đó polypeptit thứ nhất tạo đime với polypeptit thứ hai thông qua việc đặt vị trí cấu trúc lõi của polypeptit thứ nhất vào trong cấu trúc lõi của polypeptit thứ hai, trong đó hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ nhất hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ hai được liên hợp với đầu tận cùng N của mutein GDF15 bao gồm ít nhất là một vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N, trong đó mutein GDF15 trong heterodime thứ nhất tạo đime với mutein GDF15 trong heterodime thứ hai bằng cách đó tạo ra phức bao gồm heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai. Trong phức theo sáng chế, phức này bao gồm heterodime thứ nhất kết hợp vật lý với heterodime thứ hai, có hai phân tử GDF15 trong mỗi phức heterodime-heterodime.

Như đã được lưu ý trong bản mô tả này, polypeptit thứ nhất và thứ hai có thể tương tác để tạo ra heterodime thông qua tương tác cộng hóa trị và/hoặc không cộng hóa trị, như, tương tác kỵ nước, liên kết disulfit, hoặc cả hai và các đime heterodime thứ nhất và

thứ hai có thể tương tác để tạo ra phức dime-dime bằng tương tác cộng hóa trị và/hoặc không cộng hóa trị, như, tương tác kỵ nước, liên kết disulfit, hoặc cả hai.

Trong một số trường hợp, các mutein GDF15 có trong mỗi heterodime nêu trong bản mô tả này, ví dụ, trong phức của hai heterodime, có thể giống nhau về trình tự hoặc khác nhau. Trong một số trường hợp, mutein GDF15 trong phức của hai heterodime, có thể giống nhau về trình tự.

Ví dụ, các trình tự Fc để dung hợp với mutein GDF15 và là thành phần gắn kết với protein dung hợp Fc-GDF15 được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án nhất định, trình tự Fc có trong các phức theo sáng chế có thể tương tự hoặc giống nhau về trình tự mà không giống trình tự 'núm' và 'lỗ' được xử lý.

Trong một số trường hợp, polypeptit thứ nhất và thứ hai có thể tương tác để tạo ra các phức bộc lộ trong bản mô tả này như nêu sau đây là Cặp I đến VIII. Trong các trình tự nêu sau đây, trình tự Fc của globin miễn dịch G1 của người (hIgG1) ở trước trình tự liên kết (được gạch chân), sau đó là trình tự mutein GDF15 (in đậm).

CÁP I:

Polypeptit thứ nhất: hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₂-ΔN2-GDF15 (N3-I112)
(D5T)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSNGTHCPLGPGRCCRLHTVRASL
EDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV
PAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:3)

Polypeptit thứ hai: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:4)

Polypeptit thứ nhất: hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN2-GDF15 (N3-I112)

**DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSNGTHCPL
GPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMH
AQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDC
HCI (SEQ ID NO:5)**

Polypeptit thứ hai: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:6)

CẤP III:

Polypeptit thứ nhất: hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(R21N)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**GDHCPLG**
PGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHA
QIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLAKDC
HCI (SEQ ID NO:7)

Polypeptit thứ hai: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:8)

CẤP IV:

Polypeptit thứ nhất: hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(S23N/E25T)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGDHCPLG
PGRCCRLHTVRANLTDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHA
QIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDC
HCI (SEQ ID NO:9)

Polypeptit thứ hai: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:10)

CẤP V:

Polypeptit thứ nhất: hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(F52N/A54T)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGDHCPLG
 PGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQNRTANMHA
 QIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDC
 HCI (SEQ ID NO:11)

Polypeptit thứ hai: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:12)

CẤP VI:

Polypeptit thứ nhất: hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(R53N/A55T)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGDHCPLG
 PGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFNATNMHA
 QIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDC
 HCI (SEQ ID NO:13)

Polypeptit thứ hai: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS

DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

CẤP VII:

Polypeptit thứ nhất: hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)
(K91N/D93T)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGDHCPLG
PGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHA
QIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQNNTTGVSLQTYDDLLAKDCH
CI (SEQ ID NO:15)

Polypeptit thứ hai: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:16)

CẤP VIII:

Polypeptit thứ nhất: hIgG1-Fc(AA)(T366W)- (G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-
I112)(D93N/G95T)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGDHCPLG
PGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHA

QIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTNTTVSLQTYDDLLAKDCH
CI(SEQ ID NO:17)

Polypeptit thứ hai: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:18)

Trong một số trường hợp, polypeptit thứ nhất và thứ hai có thể tương tác để tạo ra các phức bậc lộ trong bản mô tả này có thể có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 80% với trình tự axit amin của polypeptit thứ nhất và thứ hai, lần lượt, như được bậc lộ ở trên trong các cặp từ cặp I đến VIII. Ví dụ, mức tương đồng trình tự có thể ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 99%, hoặc nhiều hơn.

Theo một số phương án nhất định, phức có thể bao gồm polypeptit thứ nhất có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:3; và polypeptit thứ hai có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, trong đó polypeptit thứ nhất và thứ hai được liên kết cộng hóa trị qua ít nhất là một liên kết disulphit nội phân tử. Sáng chế còn đề xuất phức bao gồm heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai, mỗi trong số heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai bao gồm polypeptit thứ nhất có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:3; và polypeptit thứ hai có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:4.

Theo một số phương án nhất định, phức có thể bao gồm polypeptit thứ nhất có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:5; và polypeptit thứ hai có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:6, trong đó polypeptit thứ nhất và thứ hai được liên kết cộng hóa trị qua ít nhất là một liên kết disulphit nội phân tử. Sáng chế còn đề xuất phức bao gồm heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai, mỗi trong số heterodime thứ nhất và

heterodime thứ hai bao gồm polypeptit thứ nhất có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:5; và polypeptit thứ hai có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:6.

Theo một số phương án nhất định, phức có thể bao gồm polypeptit thứ nhất có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:7; và polypeptit thứ hai có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, trong đó polypeptit thứ nhất và thứ hai được liên kết cộng hóa trị qua ít nhất là một liên kết disulphit nội phân tử. Sáng chế còn đề xuất phức bao gồm heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai, mỗi trong số heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai bao gồm polypeptit thứ nhất có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:7; và polypeptit thứ hai có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:8.

Theo các phương án cụ thể, các phức bộc lộ trong bản mô tả này có thể bao gồm hai heterodime, mỗi heterodime bao gồm:

(a) hIgG1-polypeptit Fc bao gồm núm (Fc-núm) và có trình tự:

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:127); và

(b) hIgG1-polypeptit Fc bao gồm lỗ (Fc-lỗ) và có trình tự:

DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS

DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:4),

trong đó hoặc là Fc-núm (a) hoặc Fc-lỗ (b) được dung hợp ở đầu tận cùng C với đầu tận cùng N của GDF15 glycomutein. Trình tự của GDF15 glycomutein có thể như sau:

ARNGTHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTY
DDLAKDCHCI (SEQ ID NO:128; GDF15 (A1-I112) D5T); hoặc

NGTHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPS
QFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDD
LLAKDCHCI (SEQ ID NO:129; ΔN2-GDF15 (N3-I112) D5T); hoặc

GTHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ
FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDL
LAKDCHCI (SEQ ID NO:130; ΔN3-GDF15 (G4-I112) D5T); hoặc

GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ
FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDL
LAKDCHCI (SEQ ID NO:131; ΔN3-GDF15 (G4-I112) R21N); hoặc

GDHCPLGPGRCCRLHTVRANLTDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ
FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDL
LAKDCHCI (SEQ ID NO:132; ΔN3-GDF15 (G4-I112) (S23N/E25T)); hoặc

GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ
NRTANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDL
LAKDCHCI (SEQ ID NO:133; ΔN3-GDF15 (G4-I112)(F52N/A54T)); hoặc

GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ
FNATNMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDL
LAKDCHCI (SEQ ID NO:134; ΔN3-GDF15 (G4-I112)(R53N/A55T)); hoặc

GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ
FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSLQTYDDL
LAKDCHCI (SEQ ID NO:135; ΔN3-GDF15 (G4-I112) (K91N/D93T)); hoặc

GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ
FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTNTTVSLQTYDDL
LAKDCHCI (SEQ ID NO:136; ΔN3-GDF15 (G4-I112)(D93N/G95T)).

Trong một số ví dụ nhất định, trình tự axit amin của Fc-núm có thể tương đồng ít nhất là 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:127. Trong một số ví dụ nhất định, trình tự axit amin của Fc-lỗ có thể tương đồng ít nhất là 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:4. Trong một số ví dụ nhất định, trình tự axit amin của mutein GDF15 có thể tương đồng ít nhất là 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc hơn với trình tự axit amin của một trong các SEQ ID NO bất kỳ: 128-136.

Fc-núm hoặc Fc-lỗ có thể được nối với GDF15 glycomutein qua trình tự liên kết $(G_4S)_n$, trong đó $n=1-10$, như, 2, 3, 4, hoặc 5.

Trong một số ví dụ nhất định, các phức theo sáng chế có thể có tỷ lệ thu hồi ít nhất là 50 mg/L, ví dụ ít nhất cao hơn 55 mg/L, 60 mg/L, 65 mg/L, 70 mg/L, 75 mg/L, 80 mg/L, 85 mg/L, 90 mg/L, 95 mg/L, 100 mg/L, 110 mg/L, 120 mg/L, 130 mg/L, 140 mg/L, 150 mg/L, 160 mg/L, 170 mg/L, 180 mg/L, 190 mg/L, 200 mg/L, hoặc hơn. Trong một số trường hợp, các phức theo sáng chế có thể có tỷ lệ thu hồi ít nhất là 50 mg/L-300 mg/L, như 60 mg/L-300 mg/L, 75 mg/L-300 mg/L, 75 mg/L-250 mg/L, 75 mg/L-200 mg/L, 75 mg/L-175 mg/L, 75 mg/L-150 mg/L, 100 mg/L-300 mg/L, 100 mg/L-250 mg/L, 100 mg/L-200 mg/L, 100 mg/L-150 mg/L, 100 mg/L-125 mg/L, 110 mg/L-300 mg/L, hoặc 150 mg/L-300 mg/L. Tỷ lệ thu hồi của phức để chỉ lượng của phức dime-dime được gắn hoàn chỉnh thu được từ môi trường nuôi cấy trong đó nuôi cấy tế bào chủ biểu hiện polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo ra hai dime có trong mỗi phức được gắn hoàn chỉnh.

Sáng chế còn đề xuất thành phần dung hợp của polypeptit Fc, và protein dung hợp chứa chúng, trong đó phân dung hợp của polypeptit Fc được biến đổi để là một thành phần của cặp Fc tích điện. "Thành phần của cặp Fc tích điện" để chỉ (i) trình tự Fc "có điện tích âm" (tùy chọn không có vùng bản lề) và bao gồm đột biến cặp tích điện hoặc (ii) trình tự Fc "có điện tích dương" (tùy chọn không có vùng bản lề) và bao gồm đột biến cặp tích điện. "Có điện tích dương" và "có điện tích âm" sử dụng trong bản mô tả này là để cập thuận tiện để mô tả bản chất của các đột biến cặp tích điện trong trình tự Fc, và không phải để chỉ là toàn bộ cấu trúc hoặc trình tự cần thiết có điện tích âm hoặc dương. Trình tự axit amin Fc tích điện thích hợp để sử dụng trong cấu trúc polypeptit (ví dụ,

GDF15 glycomutein, GDF15 glycomutein biến đổi) theo sáng chế được mô tả trong, ví dụ WO 2013/113008.

Ví dụ về Fc điện tích dương ("Fc(+)") bao gồm Fc bao gồm đột biến axit aspartatic-thành-lysine (E356K) và đột biến axit glutamic-thành-lysine (D399K) của trình tự Fc không có vùng bản lề. Ví dụ về Fc điện tích âm ("Fc(-)") bao gồm Fc bao gồm hai đột biến lysine-thành-aspartat (K392D, K409D) trong trình tự Fc không có vùng bản lề. Lysine ở đầu C (K477) tùy chọn cũng có thể được loại bỏ. Khi protein dung hợp Fc(+)Polypeptit (ví dụ, protein dung hợp Fc(+)mucin GDF15) và protein dung hợp Fc(-)Polypeptit (ví dụ, protein dung hợp Fc(-)mucin GDF15) được ủ cùng nhau, các gốc aspartat kết hợp với các gốc lysine thông qua lực tĩnh điện, thúc đẩy sự tạo ra các heterodime Fc giữa trình tự Fc(+) và Fc(-) của protein dung hợp polypeptit GDF15.

Sáng chế còn đề xuất các cấu trúc được thiết kế kiểu "bán" hoặc cấu trúc "bán Fc", bao gồm hai trình tự Fc được nối song song bởi trình tự liên kết được nối mà nó nối đầu tận cùng N của trình tự Fc thứ nhất với đầu tận cùng C của trình tự Fc thứ hai. Theo một số phương án, monome bao gồm trình tự polypeptit (ví dụ, GDF15 thành thực biến đổi hoặc GDF15 glycomutein) được liên kết với trình tự Fc thứ nhất bởi trình tự liên kết thứ nhất sẽ nối đầu tận cùng N của trình tự GDF15 với đầu tận cùng C của trình tự Fc thứ nhất, trong đó trình tự Fc thứ nhất được liên kết với trình tự Fc thứ hai bằng trình tự liên kết thứ hai sẽ nối đầu tận cùng N của trình tự Fc thứ nhất với đầu tận cùng C của trình tự Fc thứ hai. Trình tự Fc thứ nhất và thứ hai cũng được kết hợp bởi các vùng bản lề của Fc. Hai monome như vậy kết hợp để tạo ra dimer trong đó các monome được liên kết qua liên kết disulfid giữa các chuỗi giữa hai trình tự polypeptit. Ví dụ về polypeptit bán Fc thích hợp để sử dụng với mucin GDF15 theo sáng chế, xem WO 2013/113008.

Sáng chế còn đề xuất protein dung hợp có polypeptit Fc đa phân tử, hoặc mảnh của nó, bao gồm một phần của cặp Fc tích điện (ví dụ, Fc đa phân tử).

Các phức theo sáng chế có đặc tính cải thiện như độ hòa tan tăng, độ kết vón giảm, và/hoặc thời gian bán thải trong huyết thanh tăng. Trong một số trường hợp, độ hòa tan của các phức thường tăng lên so với GDF15 tái tổ hợp của người không được liên hợp và GDF15 kiểu đại liên hợp với Fc (núm hoặc lỗ). Theo một số phương án nhất định, phức này có độ hòa tan ít nhất là 1mg/mL trong (PBS - nước muối đệm phosphat) ở độ pH = 7,0. Theo các phương án khác, phức có độ hòa tan ít nhất là 2mg/mL, ít nhất 3mg/mL, ít nhất 4mg/mL, hoặc ít nhất 5mg/mL. Theo các phương án khác, phức có độ

hòa tan ít nhất là 6mg/mL trong nước muối đệm phosphat (PBS) ở độ pH=7,0, ít nhất là 7mg/mL, ít nhất là 8mg/mL, ít nhất là 9mg/mL, hoặc ít nhất 10mg/mL. Theo các phương án cụ thể, phức có độ hòa tan cao hơn 10mg/mL.

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

Glycosyl hóa có thể tác động mạnh đến đặc điểm vật lý của protein và cũng có thể là quan trọng với sự độ ổn định protein, sự tiết, và sự định vị dưới mức tế bào. Thực vậy, sự glycosyl hóa polypeptit mutein GDF15 nêu trong bản mô tả này gây sự cải thiện có ích lợi cho đặc điểm vật lý của chúng. Bằng các ví dụ, nhưng không hạn chế, độ hòa tan của mutein GDF15 có thể được tăng bởi sự glycosyl hóa, và độ tăng này có thể lớn (xem Ví dụ). Sự tăng độ hòa tan của các mutein GDF15 biến đổi có thể, ví dụ, có khả năng tạo ra các chế phẩm thích hợp hơn để sử dụng làm thuốc hơn các mutein GDF15/GDF15 không được glycosyl hóa. Polypeptit mutein GDF15/GDF15 glycosyl hóa cũng biểu hiện độ ổn định gia tăng. Hơn nữa, polypeptit có thể cải thiện một hoặc nhiều đặc điểm được động học, như thời gian bán thải.

Việc bổ sung vị trí glycosyl hóa có thể được tiến hành bằng cách thay đổi trình tự axit amin nêu trên. Sự thay đổi với polypeptit có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách bổ sung, hoặc thay thế, một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin (với vị trí glycosyl hóa liên kết tại O) hoặc gốc asparagin (đối với vị trí glycosyl hóa liên kết tại N). Các cấu trúc của oligosaccarit liên kết tại N và liên kết tại O và các gốc đường tìm thấy trong mỗi kiểu có thể khác nhau. Một kiểu đường thường thấy trên cả hai cấu trúc là axit N-acetylneuraminic (sau đây gọi là axit sialic). Axit sialic thường là gốc tận cùng của cả oligosaccarit liên kết tại N và liên kết tại O và, bởi vì điện tích âm của nó, có thể mang

lại đặc tính axit cho glycoprotein này. Một phương án cụ thể theo sáng chế bao gồm phương pháp tạo ra và sử dụng biến thể N-glycosyl hóa nêu trên.

Các phương pháp khác để làm tăng số gốc carbohydrat trên polypeptit là bằng phản ứng kết hợp hóa học hoặc bằng enzym glycosit với polypeptit.

Tế bào CHO (Chinese Hamster Ovary – buồng trứng chuột đồng Trung quốc) thiếu hụt DHFR (dihydrofolat reductaza) là tế bào chủ thường được sử dụng để sản xuất glycoprotein tái tổ hợp. Các tế bào này không biểu hiện enzym beta-galactosit alpha-2,6-sialyltransferaza và do đó không bổ sung axit sialic trong mối liên kết alpha-2,6 vào oligosaccarit liên kết tại N của glycoprotein được tạo ra trong các tế bào này.

Theo các phương án cụ thể, mutein GDF15 gồm ít nhất là một vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N được glycosyl hóa. Do đó, theo các phương án cụ thể, mutein GDF15 trong các phức bậc lộ trong bản mô tả này có thể được glycosyl hóa ở vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N ở trong mutein GDF15. Trong một số trường hợp, trong khi phức bậc lộ trong bản mô tả này có thể bao gồm GDF15 glycosyl hóa, như, GDF15 glycosyl hóa được sinh ra trong quá trình biểu hiện từ dòng tế bào, phức này có thể được xử lý sau khi sinh ra để loại gốc carbohydrat. Việc loại gốc carbohydrat sau khi sinh ra có thể loại gần như tất cả các nhóm carbohydrat gắn với mutein GDF15 (và trình tự Fc) trong quá trình biểu hiện trong tế bào chủ nhân điển hình.

Do đó, sáng chế đề xuất thể liên hợp của một hoặc nhiều thành phần hỗ trợ hoặc các phân tử ở đầu tận cùng N và/hoặc đầu tận cùng C của trình tự polypeptit, như protein khác (ví dụ, protein có trình tự axit amin khác nguồn gốc với protein của đối tượng), hoặc phân tử mang. Do đó, trình tự polypeptit ví dụ có thể được đề xuất ở dạng thể liên hợp với thành phần hoặc phân tử khác.

Polypeptit cũng có thể được liên hợp với các đại phân tử, chuyển hóa chậm như protein; polysaccarit, như sepharoza, agaroza, xenluloza, hạt xenluloza; polyme của axit amin như axit polyglutamic, polylysin; copolyme của axit amin; hạt virus không hoạt động; độc tố vi khuẩn bất hoạt như biến độc tố từ bệnh bạch cầu, uốn ván, dịch tả, phân tử độc tố bạch cầu; vi khuẩn bất hoạt; và tế bào đuôi gai. Các dạng liên hợp như vậy, nếu muốn, có thể sử dụng để tạo ra kháng thể kháng polypeptit theo sáng chế. Trong một số

trường hợp, GDF15 trong các phức nêu trong bản mô tả này có thể là polypeptit được liên hợp với đại phân tử lớn, chuyển hóa chậm.

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

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

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

Trình tự liên kết linh động ví dụ bao gồm polyme của glyxin (G_n), polyme của glyxin-alanin, polyme alanin-serin, polyme glyxin-serin (ví dụ, $(G_mS_o)_n$, $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:120), $(G_mS_oG_m)_n$, $(G_mS_oG_mS_oG_m)_n$ (SEQ ID NO:121), $(GSGGS_m)_n$ (SEQ ID NO:122), $(GSGS_mG)_n$ (SEQ ID NO:123) và $(GGGS_m)_n$ (SEQ ID NO:124), và hỗn hợp của chúng, trong đó m, n, và o mỗi giá trị độc lập được chọn từ số nguyên ít nhất là từ 1 đến 20, ví dụ, 1-18, 2-16, 3-14, 4-12, 5-10, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10), và trình tự liên kết linh động khác. Polyme glyxin và glyxin-serin không được tạo cấu trúc một cách

tương đối, và do đó có thể sử dụng làm liên kết trung gian giữa các thành phần. Trình tự liên kết linh động ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở GGSG (SEQ ID NO:21), GGSGG (SEQ ID NO:22), GSGSG (SEQ ID NO:23), GSGGG (SEQ ID NO:24), GGGSG (SEQ ID NO:25), và GSSSG (SEQ ID NO:26).

Trình tự liên kết linh động bổ sung bao gồm polyme của glyxin (G)_n hoặc polyme của glyxin-serin (ví dụ, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO:120), (GGGS)_n (SEQ ID NO:125) và (GGGGS)_n (SEQ ID NO:126), trong đó n=1 đến 50, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50). Trình tự liên kết linh động ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở GGGG (SEQ ID NO:19), GGGGS (SEQ ID NO:20), GGSG (SEQ ID NO:21), GGSGG (SEQ ID NO:22), GSGSG (SEQ ID NO:23), GSGGG (SEQ ID NO:24), GGGSG (SEQ ID NO:25), và GSSSG (SEQ ID NO:26). Đa phân tử (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, hoặc 30-50) của các trình tự liên kết có thể được liên kết cùng nhau để tạo ra trình tự liên kết linh động có thể được sử dụng để liên hợp trình tự axit amin khác nguồn gốc với polypeptit bộc lộ trong bản mô tả này. Như nêu trong bản mô tả này, trình tự axit amin khác nguồn gốc có thể là trình tự tín hiệu và/hoặc thành phần dung hợp, như, albumin, trình tự Fc, và yếu tố tương tự.

Ví dụ về trình tự liên kết bao gồm, ví dụ, (GGGGS)_n (SEQ ID NO:126), trong đó n là số nguyên từ 1 đến khoảng 10 (ví dụ, n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10); GGGSG-GGSIEGR (SEQ ID NO:48); GGGGG (SEQ ID NO:27); EGGGS (SEQ ID NO:28).

Trong một số trường hợp, trình tự liên kết có thể là trình tự liên kết có thể phân cắt, ví dụ, trình tự liên kết có thể phân cắt bằng enzym. Trong các trường hợp khác, trình tự liên kết có thể là trình tự liên kết không thể phân cắt, ví dụ, trình tự liên kết không thể phân cắt bằng enzym trong điều kiện sinh lý bình thường *in vivo*.

Ví dụ, trình tự liên kết có thể phân cắt theo kiểu phân giải protein có thể bao gồm vị trí phân cắt metalloproteinaza chất nền (MMP –matrix metalloproteinase), ví dụ, vị trí phân cắt của MMP được chọn từ collagenaza-1, -2, và -3 (MMP-1, -8, và -13), gelatinaza A và B (MMP-2 và -9), stromelysin 1, 2, và 3 (MMP-3, -10, và -11), matrilysin (MMP-7), và metalloproteinaza màng (MT1-MMP và MT2-MMP). Trình tự phân cắt của MMP-9 là Pro-X-X-Hy (trong đó, X là gốc tùy ý; Hy, gốc kỵ nước) (SEQ ID NO:29), ví dụ, Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr) (SEQ ID NO:30), ví dụ, Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser (SEQ ID NO:31) hoặc Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr (SEQ ID NO:32). Ví dụ khác về vị trí phân cắt của proteaza là vị trí phân cắt chất hoạt hóa plasminogen, ví dụ, uPA hoặc vị trí phân cắt

chất hoạt hóa plasminogen mô (tPA-tissue plasminogen activator). Ví dụ cụ thể về trình tự phân cắt của uPA và tPA bao gồm các trình tự chứa Val-Gly-Arg. Ví dụ khác là vị trí phân cắt thrombin, ví dụ, CGLVPAGSGP (SEQ ID NO:33). Trình tự liên kết thích hợp bổ sung chứa vị trí phân cắt proteaza bao gồm các trình tự liên kết bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit amin sau: 1) SLLKSRMVPNFN (SEQ ID NO:34) hoặc SLLIARRMPNFN (SEQ ID NO:35), được phân cắt bởi cathepsin B; SKLVQASASGVN (SEQ ID NO:36) hoặc SSYLKASDAPDN (SEQ ID NO:37), được phân cắt bởi proteaza virut Epstein-Barr; RPKPQQFFGLMN (SEQ ID NO:38) được phân cắt bởi MMP-3 (stromelysin); SLRPLALWRSFN (SEQ ID NO:39) được phân cắt bởi MMP-7 (matrilysin); SPQGIAGQRNFN (SEQ ID NO:40) được phân cắt bởi MMP-9; DVDERDVRGFASFL (SEQ ID NO:41) được phân cắt bởi MMP giống thermolysin; SLPLGLWAPNFN (SEQ ID NO:42) được phân cắt bởi metalloproteinaza chất nền 2 (MMP-2); SLLIFRSWANFN (SEQ ID NO:43) được phân cắt bởi cathepsin L; SGVVIATVIVIT (SEQ ID NO:44) được phân cắt bởi cathepsin D; SLGPQGIWGQFN (SEQ ID NO:45) được phân cắt bởi metalloproteinaza chất nền 1 (MMP-1); KKSPGRVVGGSV (SEQ ID NO:46) được phân cắt bởi chất hoạt hóa plasminogen kiểu urokinaza; PQGLLGAPGILG (SEQ ID NO:47) được phân cắt bởi matrixmetalloproteinaza màng kiểu 1 (MT-MMP); HGPEGLRVGFYESDVMGRGHA-RLVHVEEPHT (SEQ ID NO:94) được phân cắt bởi stromelysin 3 (hoặc MMP-11), thermolysin, collagenaza nguyên bào sợi và stromelysin-1; GPQGLAGQRGIV (SEQ ID NO:49) được phân cắt bởi metalloproteinaza 13 nền (collagenaza-3); GGSGQRGRKALE (SEQ ID NO:50) được phân cắt bởi chất hoạt hóa plasminogen kiểu mô (tPA); SLSALLSSDIFN (SEQ ID NO:51) được phân cắt bởi kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt người; SLPRFKIIGGFN (SEQ ID NO:52) được phân cắt bởi kallikrein (hK3); SLLGIAPGNFN (SEQ ID NO:53) được phân cắt bởi elastaza bạch cầu trung tính; và FFKNIVTPRTPP (SEQ ID NO:54) được phân cắt bởi calpain proteaza (bạch cầu trung tính hoạt hóa canxi).

Ngoài trình tự axit amin và trình tự axit nucleic cụ thể được nêu trong bản mô tả này, sáng chế còn đề xuất polypeptit và axit nucleic có trình tự tương đồng ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 95% với các axit amin và axit nucleic này. Thuật ngữ “tương đồng” hoặc phần trăm “tương đồng,” trong trường hợp hai hoặc nhiều trình tự polynucleotit, hoặc hai hoặc nhiều trình tự axit amin, để chỉ hai hoặc nhiều trình

tự hoặc trình tự con là giống nhau hoặc có phần trăm xác định các gốc axit amin hoặc nucleotit giống nhau (ví dụ, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 95% tương đồng trên một vùng xác định), khi so sánh và sắp thẳng hàng để tương ứng tối đa trên một vùng được đánh dấu. Sáng chế đặc biệt đề xuất polypeptit thứ nhất và thứ hai có trong phức, polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai này có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin của polypeptit thứ nhất và thứ hai, lần lượt, của cặp polypeptit thứ nhất và thứ hai được nêu trong bản mô tả này.

Phương pháp tổng hợp polypeptit

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

A. Tổng hợp hóa học

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

B. Phương pháp sản xuất tái tổ hợp

Khi polypeptit được sản xuất bằng kỹ thuật tái tổ hợp, polypeptit có thể được sản xuất ở dạng protein nội bào hoặc ở dạng protein được tiết ra, sử dụng cấu trúc thích hợp bất kỳ và tế bào chủ thích hợp bất kỳ, có thể là tế bào nhân không điển hình hoặc nhân điển hình, lần lượt như tế bào chủ vi khuẩn (ví dụ, *E. coli*) hoặc tế bào chủ nấm men. Ví dụ khác về tế bào nhân điển hình có thể được sử dụng làm tế bào chủ bao gồm tế bào côn trùng, tế bào động vật có vú, và/hoặc tế bào thực vật. Khi sử dụng tế bào chủ động vật có vú, chúng có thể bao gồm tế bào của người (ví dụ, tế bào HeLa, 293, H9 và Jurkat); tế bào chuột (ví dụ, tế bào NIH3T3, L, và tế bào C127); tế bào động vật linh trưởng (ví dụ, Cos 1, Cos 7 và CV1) và tế bào chuột đồng (ví dụ, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO)). Theo các phương án cụ thể, polypeptit và phức chứa polypeptit được tạo

ra trong tế bào CHO. Theo các phương án khác, polypeptit và phức chứa polypeptit được tạo ra trong tế bào nấm men và theo các phương án cụ thể có thể là tế bào nấm men được xử lý gen để tạo ra glycoprotein với các N-glycan giống của động vật có vú.

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

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

Cấu trúc biểu hiện thường có vị trí giới hạn thích hợp nằm gần trình tự khởi đầu để cài đoạn trình tự axit nucleic mã hóa protein quan tâm. Gen đánh dấu chọn lọc hoạt động trong thể chủ biểu hiện có thể có mặt để lựa chọn thuận lợi các tế bào mang vector này. Hơn nữa, cấu trúc biểu hiện có thể bao gồm yếu tố bổ sung. Ví dụ, vector biểu hiện có thể có một hoặc hai hệ sao chép, do đó cho phép nó được duy trì trong cơ thể sinh vật, ví dụ, trong tế bào động vật có vú hoặc côn trùng để biểu hiện và trong thể chủ có nhân không điển hình để tách dòng và khuếch đại. Ngoài ra, cấu trúc biểu hiện có thể chứa gen đánh dấu chọn lọc cho phép lựa chọn tế bào chủ đã biến nạp. Gen chọn lọc đã được biết rõ trong lĩnh vực này và sẽ thay đổi theo tế bào chủ được sử dụng.

Việc phân lập và tinh chế protein có thể được thực hiện theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, protein có thể được phân lập từ dịch phân giải của tế bào được biến đổi gen để biểu hiện protein một cách cơ định và/hoặc nhờ cảm ứng; từ môi trường nuôi cấy trong đó tế bào chủ được phát triển; hoặc từ hỗn hợp của phản ứng tổng hợp, bằng cách tinh chế ái lực, kỹ thuật này có thể bao gồm cho tiếp xúc mẫu (dịch phân giải tế bào, môi trường nuôi cấy, hoặc hỗn hợp phản ứng) với chất gắn nhãn gắn kết đặc hiệu với protein này, rửa để loại nguyên liệu không gắn kết đặc hiệu, và rửa giải protein gắn kết đặc hiệu. Protein phân lập có thể được tinh chế tiếp theo phương pháp thẩm tách và phương pháp khác thường được sử dụng trong phương pháp tinh chế protein. Theo một phương án, protein có thể được phân lập bằng cách áp dụng phương pháp sắc ký chelat kim loại. Protein có thể chứa các biến đổi để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân lập. Theo một số phương án nhất định, các phức theo sáng chế có thể được tách dựa trên kích thước.

Theo một số phương án nhất định, phức bao gồm polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai, polypeptit thứ nhất bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lõi được xử lý; polypeptit thứ hai bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lỗm được xử lý; trong đó polypeptit thứ nhất tạo dime với polypeptit thứ hai thông qua việc đặt vị trí cấu trúc lõi của polypeptit thứ nhất vào trong cấu trúc lỗm của polypeptit thứ hai, trong đó hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ nhất hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ hai được liên hợp với đầu tận cùng N của mutein GDF15 bao gồm ít nhất là một vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N có thể được phân lập ra khỏi môi trường nơi mà tế bào chủ biểu hiện polypeptit thứ nhất và thứ hai được nuôi cấy.

Theo một số phương án nhất định, phức bao gồm heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai, mỗi trong số heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai bao gồm polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai, polypeptit thứ nhất bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lõi được xử lý; polypeptit thứ hai bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lỗm được xử lý; trong đó polypeptit thứ nhất tạo dime với polypeptit thứ hai thông qua việc đặt vị trí cấu trúc lõi của polypeptit thứ nhất vào trong cấu trúc lỗm của polypeptit thứ hai, trong đó hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ nhất hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ hai được liên hợp với đầu tận cùng N của mutein GDF15 bao

gồm ít nhất là một vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N, trong đó mutein GDF15 trong heterodime thứ nhất tạo dime với mutein GDF15 trong heterodime thứ hai bằng cách đó tạo ra phức bao gồm heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai có thể được phân lập ra khỏi môi trường nơi mà tế bào chủ biểu hiện polypeptit thứ nhất và thứ hai được nuôi cấy.

Như đã được lưu ý trong bản mô tả này, axit nucleic thứ nhất và axit nucleic thứ hai có thể có trong vector đơn hoặc các vector riêng biệt trong một tế bào chủ riêng biệt hoặc hai tế bào chủ khác nhau. Trong một số trường hợp, polypeptit thứ nhất và thứ hai theo sáng chế có thể được mã hóa lần lượt bởi axit nucleic thứ nhất và thứ hai có thể có biểu hiện trong cùng tế bào. Trong các phương án mà axit nucleic thứ nhất và thứ hai có trong các tế bào khác nhau, các tế bào này có thể được dung hợp tại một số thời điểm trong quá trình sản sinh.

Các phức có thể được điều chế ở dạng gần như tinh khiết hoặc dạng phân lập (ví dụ, không có polypeptit khác). Các phức có thể có trong chế phẩm mà chế phẩm này được làm giàu phức so với các thành phần khác có thể có (ví dụ, polypeptit khác hoặc phức khác (ví dụ homodime, homotetrame) hoặc thành phần tế bào chủ khác). Ví dụ, phức tinh khiết (ví dụ, phức heterodime-heterodime) có thể được tạo ra sao cho phức có trong chế phẩm gần như không có các protein biểu hiện khác, ví dụ, các protein biểu hiện khác chiếm ít hơn 90%, ít hơn 60%, ít hơn 50%, ít hơn 40%, ít hơn 30%, ít hơn 20%, ít hơn 10%, ít hơn 5%, hoặc ít hơn 1%, trong chế phẩm.

Kháng thể

Sáng chế đề xuất kháng thể, bao gồm kháng thể phân lập mà gắn kết đặc hiệu polypeptit hoặc protein dung hợp theo sáng chế. Thuật ngữ “kháng thể” bao gồm kháng thể đơn dòng nguyên vẹn, kháng thể đa dòng, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép) được tạo ra từ ít nhất là hai kháng thể nguyên vẹn, và mảnh gắn kết kháng thể bao gồm Fab và F(ab)₂, với điều kiện là chúng biểu hiện hoạt tính sinh học mong muốn. Đơn vị cấu trúc của toàn bộ kháng thể cơ bản bao gồm tetrame, và mỗi tetrame cấu tạo gồm hai cặp giống nhau của chuỗi polypeptit, mỗi cặp có một chuỗi “nhẹ” (khoảng 25 kDa) và một chuỗi “nặng” (khoảng 50-70 kDa). Đoạn đầu amin của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi khoảng 100 đến 110 axit amin hoặc hơn có vai trò chính để nhận dạng kháng nguyên. Ngược lại, phần đầu carboxy của mỗi chuỗi xác định một vùng

cố định có vai trò chính trong chức năng hiệu ứng. Chuỗi nhẹ của người được phân nhóm là kappa và lambda, trong khi đó chuỗi nặng của người được phân nhóm là mu, delta, gamma, alpha, hoặc epsilon, và xác định các isotyp của kháng thể lần lượt là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE. Các mảnh gắn kết được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN, hoặc bằng cách phân cắt bằng enzym hoặc theo cách hóa học đối với kháng thể nguyên vẹn. Các mảnh gắn kết bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, và kháng thể chuỗi đơn.

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

Một kháng thể nguyên vẹn có hai vị trí gắn kết và, trừ khi trong kháng thể có hai nhóm chức hoặc đặc hiệu kép, hai vị trí gắn kết này là giống nhau. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc hai nhóm chức là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ khác nhau và hai vị trí gắn kết khác nhau. Kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng nhiều phương pháp bao gồm dung hợp tế bào lai hoặc liên kết mảnh Fab'.

Như đã nêu trên, các mảnh gắn kết có thể được tạo ra bằng cách phân cắt bằng enzym hoặc theo cách hóa học kháng thể nguyên vẹn. Việc phân cắt kháng thể bằng enzym papain tạo ra hai mảnh gắn kết kháng nguyên giống nhau, còn được gọi là mảnh “Fab”, và một mảnh “Fc” không có hoạt tính gắn kết kháng nguyên. Việc phân cắt kháng thể bằng enzym pepsin tạo ra mảnh F(ab')₂ trong đó hai nhánh của phân tử kháng thể vẫn được liên kết và bao gồm hai vị trí gắn kết kháng nguyên. Mảnh F(ab')₂ có khả năng liên kết chéo kháng nguyên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “Fab” chỉ một mảnh của kháng thể bao gồm vùng VH và VL cũng như khu vực cố định của chuỗi nhẹ và khu vực CH1 của chuỗi nặng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “Fv” chỉ mảnh nhỏ nhất của kháng thể vẫn giữ được cả vị trí nhận dạng kháng nguyên và vị trí gắn kết kháng nguyên. Trong dạng Fv hai-chuỗi, vùng này bao gồm dime của một khu vực biến đổi của một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ theo cách kết hợp không cộng hóa trị. Trong dạng Fv sợi-đơn, một khu vực biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được liên kết cộng hóa trị bằng peptit trình tự liên kết linh động sao cho chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể kết hợp trong cấu trúc “dime” tương tự như trong dạng Fv hai-sợi. Trong cấu hình này, ba CDR của mỗi khu vực biến đổi tương tác để xác định một vị trí gắn kết kháng nguyên trên bề mặt của dime VH-VL. Trong khi sáu CDR, cùng nhau, mang lại tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên cho kháng thể, thì thậm chí một khu vực biến đổi (hoặc một nửa của Fv chỉ có ba CDR đặc hiệu với kháng nguyên) cũng có khả năng nhận dạng và gắn kết kháng nguyên.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng xác định bổ thể” hoặc “CDR” chỉ các phần của thụ thể miễn dịch tạo sự tiếp xúc với phối tử đặc hiệu và xác định tính đặc hiệu của nó.

Thuật ngữ “vùng siêu biến đổi” chỉ các gốc axit amin của một kháng thể có vai trò trong việc gắn kết kháng nguyên. Vùng siêu biến đổi thường bao gồm các gốc axit amin từ CDR và/hoặc các gốc từ “cấu trúc vòng siêu biến đổi”.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “epitop” chỉ vị trí gắn kết của kháng thể trên protein kháng nguyên. Yếu tố xác định của epitop thường bao gồm các nhóm bề mặt hoạt động hóa học của phân tử như axit amin hoặc mạch bên đường, cũng như cấu trúc ba chiều cụ thể và đặc điểm điện tích. Kháng thể được cho là gắn kết kháng nguyên khi hằng số phân ly $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, hoặc $\leq 10 \text{ nM}$. Hằng số cân bằng (“ K_D ”) tăng có nghĩa là ái lực kém hơn giữa epitop và kháng thể, trong khi đó hằng số cân bằng giảm có nghĩa là ái lực cao hơn giữa epitop và kháng thể. Một kháng thể có giá trị K_D “không cao hơn” một giá trị nhất định có nghĩa là kháng thể này sẽ gắn kết với epitop với giá trị K_D đã nêu hoặc mạnh hơn. Trong khi giá trị K_D mô tả đặc tính gắn kết của epitop và kháng thể, thì “hiệu lực” mô tả mức hiệu lực của chính kháng thể theo một chức

năng của kháng thể này. Không cần thiết có sự tương quan giữa hằng số cân bằng và hiệu lực; do đó, ví dụ, giá trị K_D tương đối thấp không tự động có nghĩa là hiệu lực cao.

Thuật ngữ “gắn kết chọn lọc” khi đề cập đến kháng thể không có nghĩa là kháng thể chỉ gắn kết với một chất riêng lẻ, mà còn là giá trị K_D của kháng thể với chất thứ nhất là thấp hơn giá trị K_D của kháng thể với chất thứ hai. Kháng thể mà chỉ gắn kết với một epitop sẽ chỉ gắn kết với riêng epitop này.

Khi sử dụng cho người, kháng thể chứa vùng cố định và/hoặc biến đổi của loài gặm nhấm (tức là, chuột nhắt hoặc chuột cống) đôi khi liên quan đến, ví dụ, độ thanh thải nhanh từ cơ thể hoặc việc sinh ra đáp ứng miễn dịch bởi cơ thể chống lại kháng thể. Để tránh việc sử dụng kháng thể có nguồn gốc từ loài gặm nhấm, kháng thể hoàn toàn của người có thể được tạo ra bằng cách đưa chức năng kháng thể của người vào loài gặm nhấm để cho loài gặm nhấm tạo ra kháng thể hoàn toàn của người. Trừ khi được nêu rõ trong bản mô tả này, kháng thể “của người” và “hoàn toàn của người” có thể sử dụng thay thế cho nhau. Thuật ngữ “hoàn toàn của người” có thể hữu dụng khi phân biệt kháng thể chỉ có một phần của người so với các kháng thể hoàn toàn của người, hoặc đầy đủ. Người có hiểu biết trung bình sẽ biết rõ các phương pháp để tạo ra kháng thể hoàn toàn của người.

Để nhằm vào các đáp ứng kháng thể kháng chuột của người có thể có, kháng thể khảm hoặc mặt khác được làm tương thích với người có thể được sử dụng. Kháng thể khảm có vùng cố định của người và vùng biến đổi của chuột, và, do vậy, đáp ứng kháng kháng thể khảm của người có thể quan sát thấy ở một số bệnh nhân. Do đó, thuận lợi nếu cung cấp kháng thể hoàn toàn của người kháng enzym đa phân tử để tránh đáp ứng kháng kháng thể chuột của người hoặc đáp ứng kháng kháng thể khảm của người có thể.

Kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người có thể được điều chế, ví dụ, bằng cách tạo ra dòng tế bào lai bằng các kỹ thuật đã biết với người có hiểu biết trung bình. Các phương pháp điều chế khác liên quan đến việc sử dụng các trình tự mã hóa kháng thể cụ thể để biến nạp tế bào chủ động vật có vú thích hợp, như tế bào CHO. Việc biến nạp có thể là theo phương pháp đã biết bất kỳ để đưa polynucleotit vào trong tế bào chủ, bao gồm, ví dụ, gói polynucleotit trong virus (hoặc vào trong vector virus) và tải nạp tế bào chủ bằng virus (hoặc vector) hoặc bằng các quy trình chuyển nạp đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp để đưa polynucleotit khác nguồn gốc vào trong tế bào động vật có vú đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm phương pháp chuyển nạp qua trung

gian dextran, kết tủa canxi phosphat, chuyển nạp qua trung gian polybren, dung hợp tế bào trần, xung điện, bao nang (các) polynucleotit trong liposom, và vi tiêm trực tiếp ADN vào nhân. Dòng tế bào động vật có vú có sẵn dùng làm tế bào chủ để biểu hiện là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào CHO, tế bào HeLa, và tế bào caxinôm tế bào gan người.

Kháng thể có thể được sử dụng để phát hiện polypeptit theo sáng chế. Ví dụ, kháng thể có thể được sử dụng làm chất chẩn đoán bằng cách phát hiện mức của một hoặc nhiều polypeptit theo sáng chế ở đối tượng, và hoặc so sánh mức phát hiện được với mức đối chứng chuẩn hoặc với mức ban đầu ở đối tượng đã được xác định trước đó (ví dụ, trước khi mắc bệnh bất kỳ).

Ứng dụng điều trị và phòng bệnh

Sáng chế bộc lộ phương pháp điều trị hoặc phòng bệnh rối loạn chuyển hóa và liên quan đến chuyển hóa, như, bệnh béo phì và bệnh rối loạn thể trọng khác, chứng tăng đường huyết, chứng tăng insulin huyết, sự không dung nạp glucoza, và bệnh rối loạn chuyển hóa glucoza, bằng cách sử dụng phức theo sáng chế, hoặc chế phẩm chứa nó, như nêu trong bản mô tả này. Phương pháp này cũng có hiệu quả có lợi đối với một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh bằng cách, ví dụ, làm giảm mức độ nặng hoặc tần suất của một triệu chứng.

Để xác định một đối tượng có phải là đối tượng để điều trị hoặc phòng bệnh rối loạn thể trọng (ví dụ, bệnh béo phì) hay không theo phương pháp đã nêu trong bản mô tả này, các thông số như, nhưng không giới hạn ở, nguyên nhân bệnh và mức độ tình trạng của đối tượng (ví dụ, mức quá cân của đối tượng so với cá thể khỏe mạnh chuẩn) sẽ được đánh giá. Ví dụ, người trưởng thành có chỉ số BMI nằm trong khoảng từ ~25 đến ~29,9 kg/m² có thể được coi là quá cân (tiền béo phì), trong khi người trưởng thành có chỉ số BMI ~30 kg/m² hoặc cao hơn có thể coi là béo phì. Như đã bàn luận trong bản mô tả này, phức theo sáng chế có thể có hiệu quả ức chế sự thèm ăn, ví dụ, làm giảm sự thèm ăn dẫn đến làm giảm thể trọng.

Để xác định liệu đối tượng có thể là đối tượng để điều trị hoặc phòng chứng tăng đường huyết, chứng tăng insulin huyết, sự không dung nạp glucoza, và/hoặc rối loạn glucoza hay không theo phương pháp nêu trong bản mô tả này, các phương pháp chẩn đoán khác nhau đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Phương pháp như vậy

bao gồm các phương pháp đã được nêu trong bản mô tả này (ví dụ, định lượng glucoza trong huyết tương khi đói (FPG) và thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng (oGTT)).

Các phức nêu trong bản mô tả này khi được sử dụng cho đối tượng để điều trị hoặc phòng bệnh rối loạn chuyển hóa và liên quan đến chuyển hóa, như, bệnh béo phì và bệnh rối loạn thể trọng khác, chứng tăng đường huyết, chứng tăng insulin huyết, sự không dung nạp glucoza, bệnh rối loạn chuyển hóa glucoza có thể dẫn đến giảm mức glucoza trong máu, giảm thể trọng, và/hoặc giảm lượng hấp thu thức ăn.

Theo một số phương án nhất định, các phức được dự tính trong bản mô tả này có thể làm giảm mức glucoza trong máu, thể trọng, và/hoặc lượng hấp thu thức ăn ở mức ít nhất 5% so với khi không sử dụng phức này. Ví dụ, các phức được dự tính trong bản mô tả này có thể làm giảm mức glucoza trong máu, thể trọng, và/hoặc lượng hấp thu thức ăn ở mức ít nhất là 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% so với trước khi bắt đầu điều trị hoặc phòng bệnh.

Theo một số phương án nhất định, phức theo sáng chế sử dụng để điều trị bệnh rối loạn chuyển hóa có thể là phức bao gồm hai phân tử heterodime trong mỗi phức, trong đó mỗi heterodime là giống nhau, và bao gồm polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai, trong đó polypeptit thứ nhất bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này có thể bao gồm trình tự CH3 bao gồm ít nhất là một cấu trúc lõi được xử lý; polypeptit thứ hai bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lõi được xử lý; trong đó polypeptit thứ nhất tạo dimer với polypeptit thứ hai thông qua việc đặt vị trí cấu trúc lõi của polypeptit thứ nhất vào trong cấu trúc lõi của polypeptit thứ hai để tạo ra heterodime, trong đó hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ nhất hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ hai trong mỗi heterodime được liên hợp với đầu tận cùng N của mutein GDF15 bao gồm ít nhất là một vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết tại N, trong đó mutein GDF15 trong heterodime tạo dimer với mutein GDF15 trong heterodime khác bằng cách đó tạo ra phức bao gồm hai heterodime.

Theo phương án khác nữa, phức theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh rối loạn chuyển hóa có thể là phức bao gồm hai phân tử heterodime (heterodime kết hợp với heterodime) trong mỗi phức, trong đó mỗi heterodime là giống nhau, và mỗi heterodime bao gồm polypeptit thứ nhất có trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này có thể bao gồm trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lõi được xử lý, trong đó đầu tận cùng C của polypeptit

thứ nhất được dung hợp với đầu tận cùng N của GDF15 glycomutuin; và polypeptit thứ hai bao gồm trình tự IgG Fc, trình tự IgG Fc này chứa trình tự CH3 có ít nhất là một cấu trúc lỗm được xử lý; trong đó polypeptit thứ nhất tạo đime với polypeptit thứ hai thông qua việc đặt vị trí cấu trúc lỗm của polypeptit thứ nhất vào trong cấu trúc lỗm của polypeptit thứ hai để tạo ra heterodime, trong đó mutein GDF15 trong heterodime tạo đime với mutein GDF15 trong heterodime khác bằng cách đó tạo ra phức bao gồm hai heterodime.

Dược phẩm

Các phức theo sáng chế có thể là ở dạng chế phẩm thích hợp để dùng cho đối tượng. Thông thường, các chế phẩm như vậy là “dược phẩm” gồm một hoặc nhiều các phức và một hoặc nhiều chất pha loãng, chất mang hoặc tá dược được dung hoặc được chấp nhận về mặt sinh lý. Theo một số phương án nhất định, phức này có mặt với lượng có hiệu quả điều trị trong dược phẩm. Dược phẩm có thể được dùng trong phương pháp theo sáng chế; do đó, ví dụ, dược phẩm có thể được dùng *ex vivo* hoặc *in vivo* cho đối tượng để thực hiện phương pháp điều trị và phòng bệnh và ứng dụng nêu trong bản mô tả này. Như đã được lưu ý trong bản mô tả này, phức có thể được hoặc có thể không được glycosyl hóa. Ví dụ, các phức có thể được glycosyl hóa khi tạo ra trong tế bào chủ nhân điển hình và có thể đưa vào quy trình để loại gốc carbohydrat trước khi được tạo thành dược phẩm. Bước loại gốc carbohydrat có thể làm giảm đáng kể mức glycosyl hóa của polypeptit trong phức hoặc loại bỏ hoàn toàn lượng glycosyl hóa của polypeptit trong các phức.

Theo các phương án cụ thể, sáng chế bộc lộ phương pháp điều trị chứng rối loạn chuyển hóa glucoza hoặc rối loạn thể trọng bằng cách sử dụng phức, phức N-glycosyl hóa, hoặc chế phẩm chứa nó. Theo phương án cụ thể, các phương pháp theo sáng chế làm giảm lượng hấp thu thức ăn hoặc giảm thể trọng bằng cách sử dụng phức, phức N-glycosyl hóa, hoặc chế phẩm chứa nó. Sáng chế còn bộc lộ việc sử dụng các trình tự, phức, phức N-glycosyl hóa, hoặc chế phẩm chứa nó nêu trên để sản xuất thuốc để sử dụng trong điều trị tình trạng bệnh được chọn từ bệnh rối loạn chuyển hóa và liên quan đến chuyển hóa, như, bệnh béo phì và bệnh rối loạn thể trọng khác, chứng tăng đường huyết, chứng tăng insulin huyết, sự không dung nạp glucoza, và bệnh rối loạn chuyển hóa glucoza. Sáng chế còn bộc lộ việc sử dụng trình tự, phức, phức N-glycosyl hóa, hoặc

chế phẩm chứa nó nêu trên để sản xuất thuốc để sử dụng trong điều trị chứng rối loạn chuyển hóa glucoza hoặc bệnh rối loạn thể trọng. Sáng chế còn bộc lộ việc sử dụng các trình tự, phức, phức N-glycosyl hóa, hoặc chế phẩm chứa nó nêu trên để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc làm giảm lượng hấp thu thức ăn hoặc thể trọng.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm, ví dụ, dược phẩm chứa trình tự, phức, và phức N-glycosyl hóa bộc lộ trong bản mô tả này để điều trị hoặc phòng tình trạng bệnh được chọn từ bệnh rối loạn chuyển hóa và liên quan đến chuyển hóa, như, bệnh béo phì và bệnh rối loạn thể trọng khác, chứng tăng đường huyết, chứng tăng insulin huyết, sự không dung nạp glucoza, và bệnh rối loạn chuyển hóa glucoza. Sáng chế còn đề xuất chế phẩm (ví dụ, dược phẩm) chứa các trình tự, phức, hoặc phức N-glycosyl hóa nêu trên để điều trị rối loạn chuyển hóa glucoza hoặc bệnh rối loạn thể trọng. Sáng chế còn đề xuất chế phẩm (ví dụ, dược phẩm) chứa các trình tự, phức, hoặc phức N-glycosyl hóa nêu trên để làm giảm lượng hấp thu thức ăn hoặc thể trọng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế để phù hợp với phương pháp hoặc đường dùng dự tính; đường dùng ví dụ như nêu trong bản mô tả này. Hơn nữa, dược phẩm có thể được dùng kết hợp với chất hoặc hợp chất có tác dụng điều trị khác (ví dụ, chất hạ mức glucoza) như nêu trong bản mô tả này để điều trị hoặc phòng bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh như dự tính bởi sáng chế.

Dược phẩm đặc trưng bao gồm lượng có hiệu quả điều trị của ít nhất là một trong các phức dự tính bởi sáng chế và một hoặc nhiều tác nhân bào chế được dụng và được chấp nhận về mặt sinh lý. Chất pha loãng, chất mang hoặc tá dược được dụng hoặc được chấp nhận về mặt sinh lý bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất chống oxy hóa (ví dụ, axit ascorbic và natri bisulfat), chất bảo quản (ví dụ, rượu benzylic, metyl paraben, etyl hoặc n-propyl, p-hydroxybenzoat), chất nhũ hóa, chất tạo hỗn dịch, chất gây phân tán, dung môi, tá dược độn, chất tạo khối, chất tẩy rửa, chất đệm, tá dược lỏng, chất pha loãng, và/hoặc chất phụ trợ. Ví dụ, tá dược lỏng thích hợp có thể là dung dịch nước muối sinh lý hoặc nước muối đệm xitrat, có thể bổ sung các nguyên liệu khác thường có trong dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa. Nước muối đệm trung tính hoặc nước muối phối hợp với albumin huyết thanh là các tá dược lỏng ví dụ khác. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng nhận biết nhiều chất đệm có thể được sử dụng trong dược phẩm và dạng liều. Chất đệm đặc trưng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axit yếu, bazơ yếu, hoặc hỗn hợp của chúng. Theo một ví dụ, thành phần đệm có thể là nguyên liệu tan

được trong nước như axit phosphoric, axit tartric, axit lactic, axit succinic, axit citric, axit axetic, axit ascorbic, axit aspartic, axit glutamic, và muối của chúng. Chất đệm được chấp nhận bao gồm, ví dụ, đệm Tris, N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(axit 2-etansulfonic) (HEPES), axit 2-(N-morpholino)etansulfonic (MES), muối natri của axit 2-(N-morpholino)etansulfonic (MES), axit 3-(N-morpholino)propansulfonic (MOPS), và axit N-tris[Hydroxymetyl]metyl-3-aminopropansulfonic (TAPS).

Sau khi được phẩm đã được bào chế, nó có thể được bảo quản trong các ống vô khuẩn ở dạng dung dịch, hỗn dịch, gel, nhũ tương, chất rắn, hoặc bột khử nước hoặc đông khô. Các dạng chế phẩm như vậy có thể được bảo quản hoặc ở dạng sử dụng được luôn, dạng đông khô cần phải hoàn nguyên trước khi sử dụng, dạng lỏng cần phải pha loãng trước khi sử dụng, hoặc dạng có thể chấp nhận khác. Theo một số phương án, dược phẩm được cung cấp trong một vật chứa dùng một lần (ví dụ, lọ dùng một lần, ống tiêm, bơm tiêm, hoặc dụng cụ tiêm tự động (tương tự như, ví dụ, EpiPen®)), trong khi đó vật chứa dùng nhiều lần (ví dụ, lọ dùng nhiều lần) được đề xuất theo các phương án khác. Thiết bị phân phối thuốc bất kỳ có thể được sử dụng để phân phối các phức, bao gồm dụng cụ cấy (ví dụ, bơm cấy thuốc) và hệ ống thông; cả hai đều đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Thuốc tiêm dự trữ, thường được sử dụng dưới da hoặc trong cơ, cũng có thể được sử dụng để giải phóng các phức theo sáng chế trong một giai đoạn thời gian xác định. Thuốc tiêm dự trữ thường là trên nền chất rắn hoặc dầu và thường bao gồm ít nhất là một thành phần bào chế được nêu trên. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực đã quen với các dược phẩm có thể và sử dụng thuốc tiêm dự trữ.

Dược phẩm có thể ở dạng hỗn dịch trong nước hoặc trong dầu vô khuẩn để tiêm. Hỗn dịch này có thể được bào chế theo kỹ thuật đã biết sử dụng các chất phân phối hoặc tạo ẩm thích hợp và chất tạo hỗn dịch nêu trong bản mô tả này. Chế phẩm vô khuẩn để tiêm cũng có thể là dung dịch hoặc hỗn dịch vô khuẩn để tiêm trong chất pha loãng hoặc dung môi không được dùng được ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, như dung dịch trong 1,3-butan diol. Chất pha loãng, dung môi và môi trường phân tán chấp nhận được có thể được sử dụng bao gồm nước, dung dịch Ringer, dung dịch natri clorua đẳng trương, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) hoặc nước muối đệm phosphat (PBS), etanol, rượu polyhydric (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol lỏng), và hỗn hợp thích hợp của chúng. Ngoài ra, các dầu không bay hơi, vô khuẩn thường được sử dụng làm dung môi hoặc môi trường hỗn dịch. Với mục đích này, dầu không bay hơi không kích

ứng bất kỳ có thể được sử dụng bao gồm mono- hoặc diglyxerit tổng hợp. Hơn nữa, axit béo như axit oleic hữu dụng trong việc bào chế thuốc tiêm. Sự hấp thụ kéo dài của các chế phẩm tiêm cụ thể có thể đạt được bằng cách đưa chất làm chậm sự hấp thu (ví dụ, nhôm monostearat hoặc gelatin).

Dược phẩm chứa các hoạt chất (ví dụ, phức theo sáng chế) có thể ở dạng thích hợp để sử dụng qua đường miệng, ví dụ, ở dạng viên nén, viên nang, viên ngậm dẹp, viên ngậm hình thoi, hỗn dịch nước hoặc dầu, thuốc bột hoặc thuốc hạt phân tán được, nhũ tương, viên nang cứng hoặc mềm, hoặc sirô, dung dịch, vi hạt hoặc cốm ngọt. Dược phẩm dự tính để sử dụng qua đường miệng có thể được bào chế theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để sản xuất dược phẩm, và chế phẩm như vậy có thể chứa một hoặc nhiều chất như, ví dụ, chất làm ngọt, chất điều vị, chất tạo màu và chất bảo quản nhằm tạo ra dược phẩm đẹp mắt và trông ngon miệng. Viên nén, viên nang và dạng tương tự chứa hoạt chất kết hợp với tá dược được dùng không độc thích hợp để bào chế viên nén. Các tá dược này có thể, ví dụ, là chất pha loãng, như canxi cacbonat, natri cacbonat, lactoza, canxi phosphat hoặc natri phosphat; chất tạo hạt và gây rã, ví dụ, tinh bột ngô, hoặc axit alginic; chất kết dính, ví dụ tinh bột, gelatin hoặc acacia, và chất làm trơn, ví dụ magie stearat, axit stearic hoặc talc.

Viên nén, viên nang và dạng tương tự thích hợp để dùng qua đường miệng có thể không được bao hoặc được bao bằng kỹ thuật đã biết để làm chậm tốc độ rã và hấp thụ trong đường dạ dày và bằng cách đó có tác dụng duy trì. Ví dụ, nguyên liệu làm chậm như glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl distearat có thể được sử dụng. Chúng cũng có thể được bao bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này để tạo ra viên nén dược phẩm thẩm thấu để giải phóng kiểm soát. Các chất hỗ trợ bao gồm hạt phân rã sinh học hoặc tương thích sinh học hoặc chất polyme như polyeste, axit polyamin, hydrogel, polyvinyl pyrrolidon, polyanhydrit, axit polyglycolic, etylen-vinylaxetat, metylxenluloza, carboxymetylxenluloza, protamin sulfat, hoặc copolyme lactit/glycolit, copolyme polylactit/glycolit, hoặc copolyme etylenvinylaxetat để kiểm soát sự phân phối chế phẩm được sử dụng. Ví dụ, tác nhân dùng qua đường miệng có thể được giữ trong vi nang bào chế bằng các kỹ thuật ngưng tụ hoặc bằng cách polyme hóa mặt phân cách, bằng cách sử dụng hydroxymetylxenluloza hoặc vi nang gelatin hoặc vi nang poly (metylmecrolat), lần lượt, hoặc trong hệ phân phối thuốc dạng keo. Các hệ phân tán dạng keo bao gồm phức đại phân tử, viên nang nano, vi cầu, vi hạt, và các hệ nền lipid, bao gồm nhũ tương

dầu trong nước, mixen, mixen hỗn hợp, và liposom. Phương pháp bào chế liposom được mô tả trong, ví dụ, patent Mỹ số 4,235,871, 4,501,728, và 4,837,028. Phương pháp bào chế các chế phẩm nêu trên sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ.

Chế phẩm để sử dụng qua đường miệng có thể là ở dạng viên nang gelatin cứng trong đó hoạt chất được phối hợp với chất pha loãng rắn trơ, ví dụ, canxi cacbonat, canxi phosphat, kaolin hoặc xenluloza vi tinh thể, hoặc ở dạng viên nang gelatin mềm trong đó hoạt chất được phối hợp với môi trường nước hoặc dầu, ví dụ dầu lạc, parafin lỏng, hoặc dầu ôliu.

Hỗn dịch nước chứa nguyên liệu hoạt động kết hợp với tá dược thích hợp để sản xuất nó. Các tá dược này có thể là chất tạo hỗn dịch, ví dụ natri carboxymetylxenluloza, metyloxenluloza, hydroxy-propylmetylxenluloza, natri alginat, polyvinyl-pyrrolidon, gồm tragacan và gồm acacia; chất gây phân tán hoặc tạo ẩm, ví dụ phosphatit có trong tự nhiên (ví dụ, lexitin), hoặc sản phẩm ngưng tụ của alkylen oxit với axit béo (ví dụ, polyoxyetylen stearat), hoặc sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với rượu béo mạch dài (ví dụ, đối với heptadecaetylenoxyetanol), hoặc sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với este riêng phần có nguồn gốc từ axit béo và hexitol (ví dụ, polyoxyetylen sorbitol monooleat), hoặc sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với este riêng phần có nguồn gốc từ axit béo và hexitol anhydrit (ví dụ, polyetylen sorbitan monooleat). Hỗn dịch nước cũng có thể chứa một hoặc nhiều chất bảo quản.

Hỗn dịch dầu có thể được bào chế bằng cách tạo hỗn dịch hoạt chất trong dầu thực vật, ví dụ dầu lạc, dầu ôliu, dầu vừng hoặc dầu dừa, hoặc trong dầu khoáng như parafin lỏng. Hỗn dịch dầu có thể chứa chất làm đặc, ví dụ sáp ong, parafin rắn hoặc rượu xetyl. Chất làm ngọt là như các chất nêu trên, và chất điều vị có thể được bổ sung để mang lại chế phẩm dùng qua đường miệng trông ngon miệng.

Bột và hạt phân tán được thích hợp để bào chế hỗn dịch nước bằng cách bổ sung nước để hỗn hợp được chất với chất gây phân tán hoặc tạo ẩm, chất tạo hỗn dịch và một hoặc nhiều chất bảo quản. Chất gây phân tán hoặc tạo ẩm và chất tạo hỗn dịch thích hợp được nêu làm ví dụ trong bản mô tả này.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể ở dạng nhũ tương dầu trong nước. Pha dầu có thể là dầu thực vật, ví dụ dầu ôliu hoặc dầu lạc, hoặc dầu khoáng, ví dụ, parafin lỏng, hoặc hỗn hợp của chúng. Chất nhũ hóa thích hợp có thể là gồm có trong tự nhiên, ví dụ,

gôm acacia hoặc gôm tragacan; phosphatit có trong tự nhiên, ví dụ, đậu nành, lexitin, và este hoặc este riêng phần có nguồn gốc từ axit béo; hexitol anhydrit, ví dụ, sorbitan monooleat; và sản phẩm ngưng tụ của este riêng phần với etylen oxit, ví dụ, polyoxyetylen sorbitan monooleat.

Các chế phẩm cũng có thể bao gồm chất mang để bảo vệ chế phẩm chống lại sự phân hủy nhanh hoặc bài tiết khỏi cơ thể, như chế phẩm giải phóng kiểm soát, bao gồm dụng cụ cấy, liposom, hydrogel, tiền dược chất và hệ phân phối bao vi nang. Ví dụ, nguyên liệu làm chậm như glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl stearat riêng lẻ, hoặc kết hợp với sáp, có thể được sử dụng.

Sáng chế bộc lộ việc sử dụng các phức ở dạng thuốc đạn để sử dụng dược chất tại trực tràng. Thuốc đạn có thể được bào chế bằng cách phối hợp dược chất với chất phụ gia không kích ứng thích hợp mà ở dạng rắn ở nhiệt độ thông thường nhưng lại ở dạng lỏng ở nhiệt độ trực tràng và do đó sẽ chảy ra trong trực tràng để giải phóng dược chất. Các nguyên liệu như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bơ cacao và polyetylen glycol.

Các phức được đề xuất bởi sáng chế có thể ở dạng dược phẩm thích hợp khác bất kỳ (ví dụ, thuốc phun để sử dụng tại mũi hoặc xông hít) đã được biết hoặc phát triển trong tương lai.

Nồng độ của phức của polypeptit trong chế phẩm có thể thay đổi trong khoảng rộng (ví dụ, từ ít hơn khoảng 0,1%, thường là hoặc ít nhất khoảng 2% đến cao ở mức từ 20% đến 50% hoặc hơn theo trọng lượng) và thường sẽ được chọn chủ yếu dựa trên thể tích lỏng, độ nhớt, và các yếu tố của đối tượng phù hợp với, ví dụ, cách dùng cụ thể được chọn.

Sáng chế cũng dự tính trong bản mô tả này việc sử dụng công nghệ phân phối dự trữ thuốc của hãng Nano Precision Medical (Nano Precision Medical; Emeryville, CA). Công nghệ này ứng dụng màng ống nano titan oxit mà có tốc độ giải phóng bậc không của đại phân tử, như thuốc protein và peptit. Màng tương thích sinh học được trữ trong viên cấy dưới da, nhỏ mà có sự phân phối kéo dài (ví dụ, tối đa là một năm), tốc độ ổn định của các đại phân tử thuốc. Công nghệ này hiện nay được xem xét để phân phối chất chủ vận GLP-1 để điều trị bệnh tiểu đường typ II. Theo một số phương án nhất định, (các) phức bộc lộ trong bản mô tả này có thể là một chế phẩm thuốc có màng. Ví dụ, phức có thể được thấm vào trong màng hoặc được bao bởi màng này. Màng có thể có

hình dạng đĩa, ống hoặc hình cầu. Theo một số phương án nhất định, ống này có thể là ống nano hoặc hình cầu có thể là nano cầu.

Đường dùng

Sáng chế dự tính việc sử dụng các phức được bộc lộ, và chế phẩm chứa nó, theo cách thích hợp bất kỳ. Đường dùng thích hợp bao gồm ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong cơ, trong tĩnh mạch, dưới da (ví dụ, tiêm hoặc cấy), trong màng bụng, trong bề lớn của thận, trong động mạch, trong màng bụng, trong não (trong nhu mô) và trong não thất), qua đường miệng, trong mũi, âm đạo, dưới lưỡi, trong mắt, trực tràng, tại chỗ (ví dụ, qua da), dưới lưỡi và xông hít.

Thuốc tiêm dự trữ, thường được sử dụng dưới da hoặc trong cơ, cũng có thể sử dụng để giải phóng phức bộc lộ trong bản mô tả này trong một thời gian nhất định. Thuốc tiêm dự trữ thường là trên nền rắn hoặc nền chất dầu và thường bao gồm ít nhất là một trong các thành phần bào chế nêu trên. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ biết rõ chế phẩm có thể và việc sử dụng thuốc tiêm dự trữ.

Liên quan đến kháng thể, theo phương án ví dụ, kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế được bảo quản ở nồng độ 10mg/mL trong dung dịch nước muối đẳng trương vô khuẩn để tiêm ở 4°C và được pha loãng trong hoặc 100ml hoặc 200ml natri clorua 0,9% để tiêm trước khi sử dụng cho đối tượng. Kháng thể được sử dụng bằng đường truyền trong tĩnh mạch trong khoảng thời gian 1 giờ với liều nằm trong khoảng từ 0,2 đến 10 mg/kg. Theo các phương án khác, kháng thể được sử dụng bằng đường truyền trong tĩnh mạch trong khoảng thời gian từ 15 phút đến 2 giờ. Theo các phương án khác nữa, quy trình sử dụng là qua đường tiêm liều lớn dưới da.

Sáng chế đề xuất phương pháp trong đó các phức theo sáng chế được sử dụng cho đối tượng ít nhất là hai lần mỗi ngày, ít nhất là một lần mỗi ngày, ít nhất là một lần mỗi 48 giờ, ít nhất là một lần mỗi 72 giờ, ít nhất là một lần mỗi tuần, ít nhất là một lần mỗi 2 tuần, hoặc một lần một tháng.

Liệu pháp kết hợp

Sáng chế đề xuất việc sử dụng phức nêu trong bản mô tả này kết hợp với một hoặc nhiều chất có tác dụng điều trị hoặc phương thức phòng bệnh hoặc điều trị bệnh khác. Trong liệu pháp kết hợp như vậy, nhiều hoạt chất hoạt động thường có cơ chế hoạt động

khác nhau. Liệu pháp kết hợp như vậy đặc biệt có lợi bằng cách cho phép giảm liều của một hoặc nhiều chất, bằng cách đó làm giảm hoặc loại bỏ tác dụng phụ liên quan của một hoặc nhiều chất; hơn nữa, liệu pháp kết hợp như vậy có thể có hiệu quả điều trị bệnh và phòng bệnh hiệp đồng lên bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh cơ sở.

Như sử dụng trong bản mô tả này, “kết hợp” có thể bao gồm các liệu pháp có thể được sử dụng riêng biệt, ví dụ, bào chế riêng biệt để sử dụng riêng biệt (ví dụ, như có thể được cung cấp ở trong một kit), và các liệu pháp có thể được sử dụng cùng với nhau trong một chế phẩm đơn nhất (tức là, “đồng chế phẩm”).

Theo một số phương án nhất định, phức được sử dụng hoặc áp dụng lần lượt, ví dụ, trong đó một chất được sử dụng trước một hoặc nhiều chất khác. Theo các phương án khác, phức được sử dụng đồng thời, ví dụ, trong đó hai hoặc nhiều chất được sử dụng cùng thời điểm hoặc gần như cùng thời điểm; hai hoặc nhiều chất có thể ở trong hai hoặc nhiều chế phẩm riêng lẻ hoặc kết hợp trong một chế phẩm đơn nhất (tức là, đồng chế phẩm). Cho dù hai hoặc nhiều chất được sử dụng lần lượt hoặc đồng thời, chúng được coi là sử dụng kết hợp theo mục đích của theo sáng chế.

Phức theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với các chất khác hữu dụng trong việc điều trị, phòng, ức chế hoặc cải thiện bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh nêu trong bản mô tả này, bao gồm các chất thường được sử dụng cho đối tượng mắc bệnh béo phì, rối loạn ăn uống, chứng tăng đường huyết, chứng tăng insulin huyết, sự không dung nạp glucoza, và bệnh rối loạn chuyển hóa glucoza khác.

Sáng chế đề xuất liệu pháp kết hợp với một số chất (và nhóm của chúng), bao gồm 1) insulin, chất giả insulin và chất kích thích tiết insulin, bao gồm sulfonylurea (ví dụ, chlorpropamit, tolazamit, acetohexamit, tolbutamit, glyburit, glimepirit, glipizit) và meglitinid (ví dụ, repaglinit (PRANDIN) và nateglinit (STARLIX)); 2) biguanit (ví dụ, metformin (GLUCOPHAGE)) và muối dược dụng của nó, cụ thể là, metformin hydroclorua, và chế phẩm giải phóng kéo dài chứa nó, như Glumetza™, Fortamet™, và GlucophageXR™) và chất khác hoạt động bằng cách tăng cường sử dụng glucoza, làm giảm sự sản xuất glucoza ở gan và/hoặc hạ mức sinh glucoza tại ruột; 3) chất ức chế alpha-glucosidaza (ví dụ, acarboza, vogliboza và miglitol) và chất khác làm chậm tiêu hóa carbohydrat và kết quả là giảm hấp thụ từ ruột và giảm sự tăng đường huyết sau bữa ăn; 4) thiazolidindion (ví dụ, rosiglitazon (AVANDIA), troglitazon (REZULIN), pioglitazon (ACTOS), glipizit, balaglitazon, rivoglitazon, netoglitazon, AMG 131,

MBX2044, mitoglitazon, lobeglitazon, IDR-105, troglitazon, englitazon, ciglitazon, adaglitazon, darglitazon làm tăng hoạt tính insulin (ví dụ, bằng cách gây nhạy cảm insulin) bao gồm insulin, và chất giả insulin (ví dụ, insulin degludec, insulin glargin, insulin lispro, insulin detemir, insulin glulisin và chế phẩm xông hít được của mỗi chất), do đó tăng cường sử dụng glucoza trong các mô ngoại vi; 5) peptit giống glucagon bao gồm chất ức chế DPP-IV (ví dụ, alogliptin, omarigliptin, linagliptin, vildagliptin (GALVUS) và sitagliptin (JANUVIA)) và peptit giống glucagon-1 (GLP-1-Glucagon-Like Peptit-1) và chất chủ vận GLP-1 và chất tương tự (ví dụ, exenatit (BYETTA và ITCA 650 (một bơm thẩm thấu được lồng vào dưới da sẽ phân phối chất tương tự exenatit trong thời kỳ 12 tháng; Intarcia, Boston, MA)) và chất chủ vận thụ thể GLP-1 (ví dụ, dulaglutit, semaglutit, albiglutit, exenatit, liraglutit, lixisenatit, taspoglutit, CJC-1131, và BIM-51077, bao gồm chế phẩm chứa nó để dùng trong mũi, qua da, và một lần-mỗi tuần); 6) và chất tương tự kháng-DPP-IV (chất giả incretin), chất chủ vận PPAR gamma, chất chủ vận PPAR alpha như dẫn xuất axit fenofibric (ví dụ, gemfibrozil, clofibrat, ciprofibrat, fenofibrat, bezafibrat), chất chủ vận PPAR tác dụng kép (ví dụ, ZYH2, ZYH1, GFT505, chiglitazar, muraglitazar, aleglitazar, sodelglitazar, và naveglitazar), chất chủ vận tác dụng pan-PPAR, chất ức chế PTP1B (ví dụ, ISIS-113715 và TTP814), chất ức chế SGLT (ví dụ, ASP1941, SGLT-3, empagliflozin, dapagliflozin, canagliflozin, BI-10773, PF-04971729, remogloflozin, TS-071, tofogliflozin, ipragliflozin, và LX-4211), chất kích thích tiết insulin, chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin (ví dụ, alacepril, benazepril, captopril, ceronapril, cilazapril, delapril, enalapril, enalaprilat, fosinopril, imidapril, lisinopril, moveltipril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril, temocapril, hoặc trandolapril), chất đối vận thụ thể angiotensin II (ví dụ, losartan tức là, COZAAR®, valsartan, candesartan, olmesartan, telmesartan và bất kỳ trong số các dược chất này được sử dụng kết hợp với hydrochlorothiazit như HYZAAR®) hoặc dược chất chống cao huyết áp khác như LCZ 696, chất chủ vận RXR, chất ức chế glycogen synthaza kinaza-3, chất điều hòa miễn dịch, chất ức chế giao cảm, dược chất phong bế giải phóng adrenalin beta (ví dụ, propranolol, atenolol, bisoprolol, carvedilol, metoprolol, hoặc metoprolol tartat), dược chất phong bế giải phóng adrenalin alpha thuốc chẹn (ví dụ, doxazoxin, prazosin hoặc alpha metyldopa) chất chủ vận giải phóng adrenalin alpha trung ương, chất giãn mạch ngoại vi (ví dụ hydralazin); chất chủ vận thụ thể tiết giải

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

thụ thể niacin như acipimox và acifran, cũng như chất chủ vận một phần thụ thể niacin; chất đối vận thụ thể glucagon (ví dụ, MK-3577, MK-0893, LY-2409021 và KT6-971); chất tách axit mật (ví dụ, colestilan, colestimit, colesevalam hydroclorua, colestipol, choletyramin, và dẫn xuất dialkylaminoalkyl của dextran liên kết chéo), chất ức chế axyl CoA:cholesterol axyltransferaza, (ví dụ, avasimib); chất dự tính để sử dụng trong các tình trạng viêm, như aspirin, thuốc chống viêm không steroid hoặc NSAID, glucocorticoid, và chất ức chế xyclooxygenaza-2 hoặc COX-2 chọn lọc; chất hoạt hóa glucokinaza (GKA) (ví dụ, AZD6370); chất ức chế 11β -hydroxysteroid dehydrogenaza typ 1, (ví dụ, như các chất được bộc lộ trong Patent Mỹ số 6,730,690, và LY-2523199); chất ức chế CETP (ví dụ, anacetrapib, evacetrapib, và torcetrapib); chất ức chế fructoza 1,6-bisphosphataza, (ví dụ, như các chất được mô tả trong Patent Mỹ số 6,054,587; 6,110,903; 6,284,748; 6,399,782; và 6,489,476); chất ức chế axetyl CoA carboxylaza-1 hoặc 2 (ACC1 hoặc ACC2); chất ức chế PCSK9; chất chủ vận một phần GPR-40; chất điều biến SCD; chất ức chế enzym tổng hợp axit béo; amylin và chất tương tự amylin (ví dụ, pramlintit); bao gồm dạng muối được dùng của các chất hoạt động trên khi có thể về mặt hóa học.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất liệu pháp kết hợp với các chất và phương pháp để thúc đẩy giảm cân, như các chất kích thích sự chuyển hóa hoặc làm giảm sự thèm ăn, và chế độ ăn điều chỉnh và/hoặc chế độ luyện tập để thúc đẩy giảm cân.

Các phức theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều chất khác theo cách bất kỳ thích hợp trong các trường hợp. Theo một phương án, việc điều trị bằng ít nhất là một chất hoạt động và ít nhất là một phức theo sáng chế được duy trì trong một giai đoạn thời gian. Theo phương án khác, việc điều trị bằng ít nhất là một chất hoạt động sẽ giảm đi hoặc gián đoạn (ví dụ, khi đối tượng đã ổn định), trong khi việc điều trị bằng phức theo sáng chế được duy trì theo một chế độ liều không đổi. Theo phương án mở rộng, việc điều trị bằng ít nhất là một chất hoạt động sẽ giảm đi hoặc gián đoạn (ví dụ, khi đối tượng đã ổn định), trong khi việc điều trị bằng (các) phức theo sáng chế sẽ giảm đi (ví dụ, liều thấp hơn, tần suất dùng thuốc ít hơn hoặc liệu trình điều trị ngắn hơn). Theo phương án khác nữa, việc điều trị bằng ít nhất là một chất hoạt động sẽ giảm đi hoặc gián đoạn (ví dụ, khi đối tượng đã ổn định), và việc điều trị bằng phức theo sáng chế sẽ tăng lên (ví dụ, liều cao hơn, tần suất dùng thuốc nhiều hơn hoặc liệu trình điều trị dài hơn). Theo phương án khác nữa, việc điều trị bằng ít nhất là một chất hoạt động được duy trì và việc điều trị bằng phức theo sáng chế sẽ giảm đi hoặc gián đoạn (ví dụ, liều thấp hơn,

tần suất dùng thuốc ít hơn hoặc liệu trình điều trị ngắn hơn). Theo phương án khác nữa, việc điều trị bằng ít nhất là một chất hoạt động và việc điều trị bằng (các) phức theo sáng chế sẽ giảm đi hoặc gián đoạn (ví dụ, liều thấp hơn, tần suất dùng thuốc ít hơn hoặc liệu trình điều trị ngắn hơn).

Liều dùng

Các phức theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng với lượng phụ thuộc vào, ví dụ, mục đích sử dụng (ví dụ, mức độ giải quyết mong muốn); tuổi, trọng lượng, giới tính, và tình trạng sức khỏe và thể chất của đối tượng được điều trị; bản chất của polypeptit, và/hoặc dạng chế phẩm được sử dụng; đường dùng; và bản chất của bệnh, rối loạn, tình trạng bệnh hoặc triệu chứng của nó (ví dụ, mức độ của rối loạn điều hòa glucoza/insulin và giai đoạn của bệnh). Phác đồ liều cũng có thể cân nhắc sự xuất hiện, bản chất, và mức độ của tác dụng phụ bất kỳ liên quan đến (các) chất được sử dụng. Các lượng dùng thuốc có hiệu quả và phác đồ liều có thể được xác định dễ dàng từ, ví dụ, thử nghiệm độ an toàn và thử nghiệm tăng dần liều, các nghiên cứu *in vivo* (ví dụ, mô hình động vật), và các phương pháp đã biết khác đối với người có hiểu biết trung bình.

Nói chung, các thông số liều chỉ ra là lượng liều là thấp hơn lượng có thể gây độc không hồi phục cho đối tượng (tức là, liều dung nạp tối đa, “MTD” (maximum tolerated dose)) và không thấp hơn lượng yêu cầu để gây ra được hiệu quả đo được trên đối tượng. Các lượng này được xác định bằng, ví dụ, các thông số dược động học và dược lực của quá trình hấp thu, phân bố, chuyển hóa, và thải trừ (“ADME”), để cân nhắc đường dùng và các yếu tố khác.

Liều hiệu quả (ED - effective dose) là liều hoặc lượng của chất gây ra đáp ứng điều trị hoặc hiệu quả mong muốn ở một nhóm đối tượng dùng chất này. “Liều hiệu quả trung bình” hoặc ED50 của một chất là liều hoặc lượng của chất gây ra được đáp ứng điều trị hoặc hiệu quả mong muốn trong 50% nhóm mà nó được sử dụng. Mặc dù giá trị ED50 thường được dùng như là số đo mức hiệu quả mong muốn thích hợp của một chất, nhưng đây là liều mà không nhất thiết được sử dụng lâm sàng thấy rằng cần phải xem xét đến tất cả các yếu tố có liên quan. Do đó, trong một số trường hợp, lượng có hiệu quả cao hơn giá trị ED50 tính được, trong một số trường hợp lượng có hiệu quả thấp hơn giá trị ED50 tính được, và trong một số trường hợp khác nữa lượng có hiệu quả bằng với giá trị ED50 tính được.

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

Mức liều thích hợp thường sẽ nằm trong khoảng từ 0,001 đến 100 mg/kg thể trọng của bệnh nhân mỗi ngày, có thể được sử dụng thành liều đơn hoặc nhiều liều. Theo một số phương án, mức liều sẽ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 25mg/kg mỗi ngày, và theo các phương án khác nằm trong khoảng từ 0,05 đến 10mg/kg mỗi ngày. Mức liều thích hợp có thể nằm trong khoảng từ 0,01 đến 25mg/kg mỗi ngày, từ khoảng 0,05 đến 10mg/kg mỗi ngày, hoặc từ khoảng 0,1 đến 5 mg/kg mỗi ngày. Trong khoảng này, liều có thể là nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,05, từ 0,05 đến 0,5 hoặc từ 0,5 đến 5,0 mg/kg mỗi ngày.

Để sử dụng chất qua đường miệng, chế phẩm có thể được cung cấp ở dạng viên nén, viên nang và dạng tương tự chứa từ 1,0 đến 1000 miligam hoạt chất, cụ thể là 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0, và 1000,0 miligam hoạt chất. Phức này có thể được sử dụng trong phác đồ, ví dụ, từ 1 đến 4 lần mỗi ngày, và thường là một lần hoặc hai lần mỗi ngày.

Liều của (các) phức theo sáng chế có thể được lặp lại với tần suất thích hợp, nó có thể nằm trong khoảng một lần mỗi ngày đến một lần mỗi tháng, phụ thuộc vào đáp ứng được động học của phức (ví dụ thời gian bán thải) và đáp ứng dược lực (ví dụ khoảng thời gian có hiệu lực điều trị của phức). Theo một số phương án, liều dùng thường được lặp lại trong khoảng một lần mỗi tuần, một lần mỗi hai tuần, một lần mỗi tháng. Theo các phương án khác, phức có thể được sử dụng khoảng một lần mỗi tháng.

Theo một số phương án nhất định, liều của phức bộc lộ có thể được chứa trong “dạng liều đơn vị”. Thuật ngữ “dạng liều đơn vị” để chỉ một đơn vị riêng biệt về mặt vật lý, mỗi đơn vị chứa lượng đã xác định của phức theo sáng chế, hoặc đơn độc hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất hỗ trợ khác, đủ để gây ra hiệu quả mong muốn. Sẽ biết rõ

là các thông số của dạng liều đơn vị sẽ phụ thuộc vào chất cụ thể và hiệu quả cần đạt được.

Kit

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

Kit có thể chứa một hoặc nhiều (các) phức bộc lộ trong bản mô tả này (trong, ví dụ, vật chứa vô khuẩn), có thể ở dạng được phẩm thích hợp để sử dụng cho đối tượng. (Các) phức này có thể được cung cấp ở dạng sẵn để dùng hoặc ở dạng yêu cầu, ví dụ, hoàn nguyên hoặc pha loãng trước khi sử dụng. Do (các) phức ở dạng cần phải hoàn nguyên bởi người dùng, kit cũng có thể bao gồm chất đệm, tá dược được dụng, và tương tự, được đóng gói với hoặc tách riêng khỏi (các) phức. Khi liệu pháp kết hợp được đề cập, kit có thể chứa nhiều chất riêng biệt hoặc chúng cũng có thể được kết hợp trong kit này. Mỗi thành phần của kit có thể được bao gói bằng một vật chứa riêng và tất cả các vật chứa khác nhau có thể ở trong một gói đơn. Kit theo sáng chế có thể được thiết kế cho các điều kiện cần thiết để duy trì cách thích hợp các thành phần trong đó (ví dụ, bảo quản lạnh hoặc làm lạnh).

Kit có thể chứa nhãn thuốc hoặc tờ hướng dẫn sử dụng đính kèm chứa các thông tin xác định của thành phần trong đó và tờ hướng dẫn sử dụng của chúng (ví dụ, thông số liều, dược lý lâm sàng của (các) hoạt chất, bao gồm cơ chất tác dụng, dược động học và dược lực, tác dụng phụ, chống chỉ định, v.v.). Nhãn thuốc hoặc tờ hướng dẫn sử dụng có thể bao gồm thông tin của nhà sản xuất như số lô và ngày hết hạn. Nhãn thuốc hoặc tờ hướng dẫn sử dụng đính kèm có thể, ví dụ, được gắn vào trong cấu trúc vật lý đựng các thành phần, được chứa riêng với cấu trúc vật lý này, hoặc được dán vào một thành phần của kit (ví dụ, ống tiêm, ống hoặc ống thuốc). Tờ hướng dẫn sử dụng ví dụ bao gồm các tờ hướng dẫn sử dụng để giảm hoặc hạ mức glucoza máu, điều trị chứng tăng đường huyết, điều trị bệnh tiểu đường, v.v. bằng chất điều biến được bộc lộ, và được phẩm chứa nó.

Nhãn thuốc hoặc tờ hướng dẫn sử dụng đính kèm có thể còn bao gồm, hoặc được đưa vào, vật ghi đọc được bằng máy tính, như đĩa (ví dụ, đĩa cứng, thẻ, đĩa nhớ), đĩa quang như CD- hoặc DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, băng từ, hoặc vật ghi lưu trữ điện

như RAM và ROM hoặc thiết bị ghép của chúng như vật ghi lưu trữ quang/từ, vật ghi FLASH hoặc thẻ nhớ. Theo một số phương án, tờ hướng dẫn thực tế không có trong kit, nhưng phương tiện để thu được các hướng dẫn sử dụng này từ các nguồn từ xa, ví dụ, thông qua internet, được cung cấp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ nêu dưới đây cung cấp cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này toàn bộ nội dung và mô tả về cách tạo ra và thực hiện sáng chế, và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế cũng như không dự tính rằng các thí nghiệm dưới đây là tất cả hoặc chỉ thực hiện các thí nghiệm này. Nỗ lực đã được thực hiện để đảm bảo độ chính xác về số liệu sử dụng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v.), tuy nhiên một số sai số và độ lệch thực nghiệm nên được tính đến.

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

Vật liệu và phương pháp

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

Động vật. Con chuột đực C57BL/6J béo phì do chế độ ăn (DIO) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được duy trì chế độ ăn nhiều chất béo (D12492, Research Diets, Inc, New Brunswick, NJ) chứa 60 kcal% chất béo, 20 kcal% protein và 20 kcal% carbohydrat trong 12-20 tuần. Tất cả nghiên cứu trên động vật được thông qua bởi ủy ban sử dụng và chăm sóc động vật NGM. Chuột DIO C57BL/6J biểu hiện kiểu béo phì giống như người, trong đó bệnh béo phì được cho là do hấp thu quá nhiều calo. Chuột C57BL/6J là chuột dễ béo phì trong đó quan sát thấy sự tăng cân rõ ràng, cũng như sự tăng insulin huyết và đôi khi là sự tăng đường huyết. Giống này là giống chuột thường được sử dụng nhất để làm mô hình béo phì do chế độ ăn. (Nilsson C., et al., Acta Pharmacologica Sinica (2012) 33: 173-181).

Axit nucleic và trình tự axit amin. Số lưu trữ Genbank BC000529.2 nêu cADN của ORF mã hóa biến thể GDF15 người, và số lưu trữ Genbank NP_004855.2 nêu trình tự axit amin mã hóa bởi cADN này. cADN của phần dung hợp Fc được mua tại InvivoGen (pFUSE-CHlg-hG1, GenBank: AY623427.1, protein ID = AAT49050) và được biến đổi như đã chỉ ra. Trình tự axit amin của phần dung hợp Fc được mã hóa bởi vector pFUSE-CHlg-hG1 là:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:55)

Xây dựng cấu trúc biểu hiện. Vector biểu hiện pTT5 của động vật có vú (National Research Council Canada) được biến đổi bằng cách cài trình tự yếu tố Kozak và trình tự IgK-peptit tín hiệu của người: (CACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCCAGATGT) (SEQ ID NO:56) ở giữa vị trí PmeI và EcoRI. Trong khi cả hai vị trí giới hạn bị loại bỏ, vị trí AgeI được tạo ra để tách dòng trong khung tiếp tục đối với các yếu tố được tiết ra. Để cài mảnh đơn (ví dụ, phần Fc của IgG1 người), công nghệ In-Fusion (Clontech) được sử dụng. Để cài hai hoặc nhiều mảnh được PCR tạo ra (tức là hIgG1-Fc + GDF15), chúng tôi sử dụng Gibson Assembly Master Mix (NEB) theo quy trình của nhà sản xuất. Tất cả các mảnh PCR được khuếch đại bởi hỗn hợp Sapphire PCR và tinh chế gel bằng kit chiết Qiagen. Tế bào khả biến điện TOP10 (Life Technologies) được biến nạp bằng phản ứng tách dòng, phết lên

đĩa LB-aga chứa carbenixilin và ủ qua đêm ở 37°C. Các khuẩn lạc riêng lẻ được nhặt và phân tích bằng cách sắp xếp trình tự. ADN từ các khuẩn lạc dương được khuếch đại (DNA-Maxi-prep, Qiagen), trình tự nguyên vẹn được khẳng định và sử dụng để chuyển nạp tế bào động vật có vú để biểu hiện protein tái tổ hợp.

Để tạo ra các mutein đặc hiệu, kỹ thuật đột biến tại vị trí được thực hiện với kit đột biến tại vị trí hoặc QuikChange Lightning hoặc kit đột biến đa vị trí QuikChange Lightning (Agilent) và đoạn môi thích hợp, theo quy trình của nhà sản xuất.

Phân tử dung hợp (Fc/Fc)-GDF15, GDF15 kiểu dại, và biểu hiện GDF15-glycomutein. Tất cả các phân tử được thu hồi từ quy trình chuyển nạp tạm thời trong tế bào Expi 293F (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Các tế bào thường được cấy chuyển trong môi trường biểu hiện Expi (Invitrogen) và duy trì ở dạng môi trường nuôi cấy hỗn dịch trong bình lắc có kích thước khác nhau. Đặc trưng, tế bào được cấy chuyển ở mật độ tế bào là 5e5 tế bào sống/ml và phát triển trong 3 ngày trước khi cấy chuyển. Các bình được giữ trong thiết bị ủ CO₂ được tạo ẩm (37°C và 5% CO₂) trên bề thiết bị lắc New Brunswick (New Brunswick Scientific Company, Edison, NJ) với tốc độ lắc là 110 vòng trên phút (RPM).

Tiến hành chuyển nạp khi mật độ tế bào của môi trường nuôi cấy đạt 2,5e6 tế bào sống/mL đạt cao hơn 95% sống. Đặc trưng, đối với 50mL dịch chuyển nạp, 2,5e6 tế bào/mL x 50mL tế bào được ủ trong 250mL bình máy lắc trong 42,5mL thể tích nuôi cấy. 50 microgam (50µg) plasmit ADN bao gồm vectơ biểu hiện chứa gen quan tâm đầu tiên được pha loãng trong 2,5mL môi trường huyết thanh khử OPTI-MEM (Invitrogen). Đồng thời, tác nhân chuyển nạp Expifectamine (Invitrogen), 2,67 lần thể tích (chứa lượng plasmit ADN) cũng được pha loãng trong 2,5mL môi trường huyết thanh khử OPTI-MEM. Sau khi ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng, tác nhân chuyển nạp đã pha loãng được bổ sung từ từ vào plasmit ADN đã pha loãng để tạo ra phức có khả năng chuyển nạp. Sau giai đoạn ủ thêm 20 phút ở nhiệt độ phòng, 5mL phức chuyển nạp được bổ sung vào 42,5mL môi trường nuôi cấy tế bào. Sau đó, các tế bào đã chuyển nạp được đặt trong thiết bị ủ CO₂ tạo ẩm trên máy lắc xoay tròn duy trì ở tốc độ 110 RPM. Hai mươi tư giờ sau khi chuyển nạp, môi trường đã chuyển nạp được nạp 250µL dung dịch gen tăng cường số 1 (Invitrogen) và 2,5mL dung dịch gen tăng cường số 2 (Invitrogen). Sau đó, môi trường nuôi cấy này được đặt lại trong thiết bị ủ CO₂ tạo ẩm trên máy lắc xoay tròn. Sáu đến bảy ngày sau khi chuyển nạp, thu hoạch tế bào nuôi cấy bằng cách ly tâm ở tốc độ

3000 RPM trong 30 phút trước khi lọc qua phễu lọc cỡ 0,2µm (Nalgene). Các mẫu sau đó được phân tích sự biểu hiện trên gel nhuộm commassie.

Tinh chế protein tái tổ hợp. Các phân tử (Fc/Fc)-GDF15 đã được biểu hiện vào trong môi trường cung cấp dinh dưỡng (CM- conditioned media) được đánh giá về tỷ lệ thu hồi và hoạt tính sau khi tinh chế. CM được chuyển lên cột mAb SelectSuRe (GE) với mức nạp không quá 20mg/mL nhựa. Thể tích CM nằm trong khoảng từ 50mL-1000mL để đánh giá tỷ lệ thu hồi. Sau khi nạp CM lên cột mAb SelectSuRe, cột này được rửa bằng 1XPBS (Corning Cellgro) với thể tích bằng 5-10 thể tích cột, tiếp đó là bước rửa giải với đệm Glyxin độ pH thấp (Polysciences Inc). Sau khi rửa giải, các nhóm (Fc/Fc)-GDF15 được trung hòa độ pH bằng Tris 1M độ pH= 8,0 (Teknova) và sau đó bơm lên trên cột Superdex200 (GE) đã được cân bằng trước trong 1XPBS (Corning Cellgro). Các phân đoạn chứa (Fc/Fc)-GDF15 nguyên vẹn, các phân tử được gắn hoàn chỉnh được phân nhóm và đánh giá độ tinh khiết và định lượng thông qua phương pháp A280 áp dụng hệ số dập tắt và khối lượng phân tử thích hợp để xác định tỷ lệ thu hồi dựa trên thể tích CM ban đầu. Các phân tử được gắn hoàn chỉnh là phức dime-dime của hai heterodime. Mỗi heterodime có một Fc kết hợp với glycomutein Fc-GDF15 qua tương tác nùm trong lỗ, và hai heterodime kết hợp qua tương tác GDF15 – GDF15.

Tinh chế GDF15 WT và glycomutein GDF15. GDF15 kiểu dại và GDF15 glycomutein không liên hợp với Fc được tinh chế từ môi trường nuôi cấy theo phương pháp bắt giữ trao đổi ion. GDF15 WT và GDF15 glycomutein được rửa giải bằng gradient của muối/độ pH thích hợp cho phép rửa giải và tách tối ưu với các protein tạp chất ở tế bào chủ. Tất cả các phân tử GDF15 sau đó được tinh chế bằng GE HiTrap Phenyl HP ở độ pH 8,0 bằng gradient tuyến tính giảm của amoni sulfat. Các phân đoạn được đánh giá và phân nhóm dựa trên độ tinh khiết và đặc điểm glycosyl hóa qua hiện tượng chuyển gel trên gel SDS-PAGE không khử. Tương tự với các phân tử (Fc/Fc)-GDF15, GDF15 kiểu dại và GDF15 glycomutein được biểu hiện bởi peptit tín hiệu IgK.

Ví dụ 1: Thiết kế các phân tử dung hợp (Fc/Fc)-GDF15 heterodime nùm-trong-lỗ

Các thiết kế Fc-GDF15 được thể hiện trên Fig.1 và trình tự sơ cấp được mô tả sau đây (cấu trúc B1a/b-B19a/b). Để đạt được sự ghép hiệu quả cho các phân tử Fc-GDF15, một hệ thống hiệu quả được thiết kế để cho phép dime hóa Fc/Fc trong khi vẫn cho phép dime hóa GDF15/GDF15. Để tránh việc gấp nếp sai và khả năng kết vón của

Fc-GDF15 sợi đơn, một thành phần dung nạp heterodime được thiết kế cho tương tác Fc/Fc để cho phép homodime hóa GDF15/GDF15 với độ chính xác cao. Các heterodime Fc/Fc núm-trong-lỗ được thiết kế để đạt được sự ghép và tiết GDF15 từ hệ chuyển tiếp Expi 293F. Các hệ heterodime Fc/Fc núm-trong-lỗ được đánh giá bằng cách sử dụng hệ [T366Y (núm) // Y407T (lỗ)] hoặc [T366W (núm) // T366S-L368A-Y407V (lỗ)], ghép đôi với trình tự liên kết $(G_4S)_n$ ($n=2, 3, 4$, hoặc 5) và GDF15. Chú ý rằng việc đánh số vị trí axit amin trong khu vực CH3 của Fc là dựa trên hệ thống đánh số EU (Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)). Trong tất cả các trường hợp, thành phần Fc-dung hợp (núm/lỗ) được ghép đôi với đầu tận cùng N của GDF15 thành thực bao gồm các gốc axit amin A1-I112, R2-I112, N3-I112, G4-I112, D5-I112, H6-I112, hoặc C7-I112. Đoạn cắt cụt của đầu tận cùng N của GDF15 ($\Delta 1=R2-I112$, $\Delta 2=N3-I112$, $\Delta 3=G4-I112$, $\Delta 4=D5-I112$, $\Delta 5=H6-I112$, hoặc $\Delta 6=C7-I112$) được đưa vào để tăng cường độ ổn định do trình tự ở đầu tận cùng N (ARNGDH, SEQ ID NO:95) trước đây đã được chứng minh là một vị trí phân cắt protein nhạy cảm và đoạn cắt cụt ở đầu N mang lại độ ổn định rất cao so với GDF15 không chứa các đoạn cắt cụt ở đầu N.

Fig.1A-1D mô tả sự thay thế núm với lỗ trên Fc-GDF15 (chuỗi A), ghép đôi với lỗ với núm tương ứng trên phần Fc của heterodime (chuỗi B), ghép đôi với hoặc là vùng bản lề của IgG kiểu đại chứa hai liên kết disulfit nội phân tử hoặc không có vùng bản lề này (Δ bản lề- Δ hinge). Đối với các chuỗi A/B heterodime núm hoặc lỗ của Fc, đột biến AA (APELLGGP (SEQ ID NO:96) $\rightarrow$ APALAGGP (SEQ ID NO:97)) được đưa vào để loại bỏ chức năng hiệu ứng của IgG1. Các thiết kế heterodime (Fc/Fc)-GDF15 núm-trong-lỗ là các sản phẩm biểu hiện được ghi nhận là đã ghép và báo cáo trong Fig.2A. Trong tất cả các trường hợp, sự biểu hiện tạm thời của (Fc/Fc)-GDF15 núm-trong-lỗ mang lại tỷ lệ thu hồi, sau khi tinh chế, nằm trong khoảng từ 0mg/L đến 74,9mg/L của sản phẩm được ghép chính xác (0 = các khối kết tụ/không biểu hiện, <25mg/L, 25mg/L-49,9mg/L, 50mg/L-74,9mg/L, 75mg/L-99,0mg/L, >100mg/L). Trong tất cả các trường hợp, sự ghép và tiết các phân tử Fc/Fc-GDF15 heterodime núm-trong-lỗ được thực hiện với các mức tạp chất khác nhau của các dạng homodime gấp nếp sai như Fc(lỗ):Fc(lỗ), Fc(núm):Fc(núm), Fc(núm)-GDF15:Fc(núm)-GDF15 và Fc(lỗ)-GDF15:Fc(lỗ)-GDF15. Dựa trên profin biểu hiện, T366W (núm) được đặt vào trong chuỗi Fc-GDF15, ghép đôi với T366S-L368A-Y407V (lỗ) trên chuỗi của thành phần Fc của heterodime (Fig.1D) được thấy là tạo ra sản phẩm với độ ổn định cao nhất và tối thiểu hóa sự ghép cặp sai của

sản phẩm Fc/Fc-homodime (Fig.2A – biến thể B5a/B5b). Thiết kế này tập trung vào việc xử lý và việc tối ưu hóa biểu hiện hơn nữa.

Tỷ lệ thu hồi biến thể B5a/B5b từ nguồn Expi 293F được biểu hiện tạm thời là tỷ lệ thu hồi nằm trong khoảng từ 0,0mg/L đến 24,9mg/L. Để tăng cường biểu hiện, tỷ lệ ghép & tỷ lệ thu hồi, các vị trí N-glycosyl hóa được đưa vào trong trình tự thành thực của GDF15 (Fig.1F). Trong các cấu trúc thiết kế này, sự có mặt của vị trí liên ứng glycan liên kết tại N trên GDF15 làm tăng có ý nghĩa sự biểu hiện, sự ghép và tỷ lệ thu hồi của heterodime (Fc/Fc)-GDF15 nùm-trong-lỗ hoàn toàn thành thực B5a/B5b (Fig.2A – biến thể từ B9a/B9b đến B19a/B19b). Chiều dài trình tự liên kết được thấy là tối ưu khi n=5 đối với (G₄S)_n về sự gắn kết thụ thể & hoạt tính thông qua một nghiên cứu *in vitro*. Sự có mặt của glycan trên vị trí D5T loại bỏ hoàn toàn vị trí khử amit sơ cấp trên vị trí N3 của GDF15 thành thực và dường như làm tăng độ ổn định của phân tử như được chứng minh trong Ví dụ 2.

Sự có mặt của glycan liên kết tại N trong trình tự GDF15 được đề xuất là hỗ trợ sự biểu hiện và tối thiểu hóa các sản phẩm gấp nếp sai không bị tích tụ do thời gian lưu tăng lên trong lưới nội bào và lưới Golgi trong quá trình tiết. Thời gian lưu thêm này được đề xuất là có hiệu quả có lợi lên động học gấp nếp và cho phép ghép cặp nùm-trong-lỗ của heterodime (Fc/Fc) tăng có ý nghĩa và tỷ lệ thu hồi từ môi trường nuôi cấy tế bào động vật có vú.

Trình tự của các biến thể (B1a/b-B19a/b) được nêu sau đây. Trong trình tự được mô tả sau đây, peptit tín hiệu IgK của người là chữ thường sau đó là trình tự Fc. Trong trình tự này cũng bao gồm trình tự liên kết và trình tự GDF15, sau trình tự Fc là trình tự liên kết (được gạch chân) sau đó là trình tự GDF15 (in đậm). Việc đánh số vị trí của thay thế trong trình tự Fc là dựa trên cách đánh số EU, thay thế có việ dẫn đến axit amin có tại vị trí tương ứng trong IgG1Fc của người (SEQ ID NO:2). Việc đánh số xóa bỏ ở đầu N trong trình tự GDF15 và (các) thay thế là có việ dẫn đến GDF15 kiểu đại thành thực của người (SEQ ID NO:1).

B1a: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366Y)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)

mdmrvpaqlglglwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS

LYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSG
GGGSGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC
 PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQ
 TYDDLAKDCHCI(SEQ ID NO:57)

B1b: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(Y407T)

mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSLKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:58)

B2a: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(Y407T)- (G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)

mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSLKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSG
GGGSGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC
 PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQ
 TYDDLAKDCHCI(SEQ ID NO:59)

B2b: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366Y)

mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:60)

B3a: hIgK-hIgG1-Fc(Δ bản lẻ, AA)(T366Y)-(G₄S)₅- Δ N3-GDF15 (G4-I112)

mdmrvpaqlglglllwlrgarcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGD
HCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA
ANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDL
 LAKDCHCI(SEQ ID NO:61)

B3b: hIgK-hIgG1-Fc(Δ bản lẻ, AA)(Y407T)

mdmrvpaqlglglllwlrgarcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:62)

B4a: hIgK-hIgG1-Fc(Δ bản lẻ, AA)(Y407T)-(G₄S)₅- Δ N3-GDF15 (G4-I112)

mdmrvpaqlglglllwlrgarcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGD
HCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA
ANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDL
 LAKDCHCI(SEQ ID NO:63)

B4b: hIgK-hIgG1-Fc(Δ bản lẻ, AA)(T366Y)

mdmrvpaqlglglllwlrgarcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVK

GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:64)

B5a: hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)

mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFS SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSGGDH CPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIG
ACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTG
VSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:65)

B5b: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
RWQQGNVFS SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:66)

B6a: hIgK- hIgG1-Fc(AA) (T366S)(L368A)(Y407V)-(G₄S)₅-ΔN6-GDF15 (C7-I112)

mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
RWQQGNVFS SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPS
QFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQT
YDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:67)

B6b: hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)

mdmrvpaqlglglllwlrgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:68)

B7a: hIgK-hIgG1-Fc(Δ bản lẻ, AA)(T366W)-(G4S)₅- Δ N3-GDF15 (G4-I112)

mdmrvpaqlglglllwlrgarcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGD
 HCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA
 ANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDL
 LAKDCHCI(SEQ ID NO:69)

B7b: hIgK-hIgG1-Fc(Δ bản lẻ AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

mdmrvpaqlglglllwlrgarcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:70)

B8a: hIgK-hIgG1-Fc(Δ h, AA) (T366S)(L368A)(Y407V)-(G4S)₅- Δ N6-GDF15 (C7-I112)

mdmrvpaqlglglllwlrgarcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSCPL
 GPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMH

CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ 85/234	
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF VIET NAM	
NGÀY	21-08-2024
DATE	
SỐ ĐƠN	
APL.No.	

AQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVSLOQTYDDLAKDC
HCI(SEQ ID NO:71)

B8b: hIgK-hIgG1-Fc(Δ h, AA)(T366W)

mdmrvpaqllgllllwlrargcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:72)

B9a: hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₃-GDF15 (A1-I112) (D5T)

mdmrvpaqllgllllwlrargcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSARN
 GTHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQF
 RAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVSLOQTYD
 DLLAKDCHCI(SEQ ID NO:73)

B9b: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

mdmrvpaqllgllllwlrargcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:74)

B10a: hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₄-GDF15 (A1-I112) (D5T)

mdmrvpaqllgllllwlrargcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGG
 GSARNGTHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGA

CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSL
QTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:75)

B10b: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

mdmrvpaqlglglwlrargDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:76)

B11a: hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-GDF15 (A1-I112) (D5T)

mdmrvpaqlglglwlrargDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSARNGTHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT
MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKT
DTGVSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:77)

B11b: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

mdmrvpaqlglglwlrargDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:76)

B12a: hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₂-ΔN2-GDF15 (N3-I112) (D5T)

mdmrvpaqlglglwlrargDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSNGTHCPLG
PGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHA

QIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDC
HCI(SEQ ID NO:78)

B12b: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

mdmrvpaqlglglwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:79)

B13a: hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN2-GDF15 (N3-I112) (D5T)

mdmrvpaqlglglwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSNGTHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMC
 IGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTG
 VSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:80)

B13b: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

mdmrvpaqlglglwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:81)

B14a: hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G₄-I112)(R21N)

mdmrvpaqlglglwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGG

GSGGGGSGDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCI
GACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDG
VSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:82)

B14b: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

mdmrvpaqlglglwlrgrcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:83)

B15a: hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(S23N/E25T)

mdmrvpaqlglglwlrgrcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
GSGGGGSGDHCPLGPGRCCRLHTVRANLTDLGWADWVLSPREVQVTMCI
GACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDG
VSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:84)

B15b: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

mdmrvpaqlglglwlrgrcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:85)

B16a: hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(F52N/A54T)

mdmrvpaqlglglwlrgrcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV

LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGSGGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCI
 GACPSQNRTANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDG
 VSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:86)

B16b: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:87)

B17a: hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(R53N/A55T)

mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGSGGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCI
 GACPSQFNATNMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDG
 VSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:88)

B17b: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:89)

B18a: hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)
(K91N/D93T)

mdmrvpaqlglglwlrgrarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
GSGGGSGGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCI
 GACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTG
 VSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:90)

B18b: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

mdmrvpaqlglglwlrgrarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:91)

B19a: hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)- (G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-
I112)(D93N/G95T)

mdmrvpaqlglglwlrgrarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
GSGGGSGGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCI
 GACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTNTT
 VSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:92)

B19b: hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

mdmrvpaqlglglwlrgrarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV

LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK-
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:93)

Trình tự của GDF15 kiểu đại thành thực của người (SEQ ID NO:1) và GDF15 glycomutein được nêu trong Fig.2B là như sau:

IgK- GDF15 kiểu đại thành thực của người

mdmrvpaqllgllllwlrgrarcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWV
LSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPM
VLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:108)

IgK-GDF15-glycomutein R21N

mdmrvpaqllgllllwlrgrarcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWV
LSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPM
VLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:109)

IgK-GDF15-glycomutein R53N/A55T

mdmrvpaqllgllllwlrgrarcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWV
LSPREVQVTMCIGACPSQFNATNMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPM
VLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:110)

IgK-GDF15-glycomutein S64N/H66T

mdmrvpaqllgllllwlrgrarcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWV
LSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTNLTRLKPDTVPAPCCVPASYNPM
VLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:111)

IgK-GDF15-glycomutein P70N

mdmrvpaqllgllllwlrgrarcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWV
LSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKNDTVPAPCCVPASYNPM
VLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:112)

IgK-GDF15-glycomutein Q90N

mdmrvpaqllgllllwlrgrarcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWV
LSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPM
VLINKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:113)

IgK-GDF15-glycomutein K91N/D93T

mdmrvpaqllgllllwlgarcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWV
LSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPM
VLIQNTTTGVSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:114)

IgK-GDF15-glycomutein D93N/G95T

mdmrvpaqllgllllwlgarcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWV
LSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPM
VLIQKTNTTVSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:115)

IgK-GDF15-glycomutein G95N

mdmrvpaqllgllllwlgarcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWV
LSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPM
VLIQKTDTNVSLQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:116)

IgK-GDF15-glycomutein S97N/Q99T

mdmrvpaqllgllllwlgarcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWV
LSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPM
VLIQKTDGTGNLTTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:117)

IgK-GDF15-glycomutein L98N

mdmrvpaqllgllllwlgarcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWV
LSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPM
VLIQKTDGTGVSNQTYDDLLAKDCHCI(SEQ ID NO:118)

Các phân tử GDF15 được biểu hiện bằng cách sử dụng peptit tín hiệu IgK, mà peptit này được phân cắt từ polypeptit được tiết bằng peptidaza tín hiệu được biểu hiện bởi tế bào 293. Tỷ lệ thu hồi của GDF15 kiểu đại thành thực của người (SEQ ID NO:1) và GDF15 glycomutein được nêu trong Fig.2B.

Các GDF15 glycomutein ví dụ có thể được biểu hiện ở dạng GDF15 glycomutein Fc-Fc(núm/lỗ) được mô tả USSN14/811,578 nộp ngày 28 tháng Bảy năm 2015.

Ví dụ 2: Hiệu quả của phân tử dung hợp (Fc/Fc)-GDF15 lên thể trọng và lượng hấp thu thức ăn ở mô hình chuột DIO

Hiệu quả của phân tử dung hợp được sử dụng dưới da có Fc-heterodime tái tổ hợp đã dung hợp với GDF15 tái tổ hợp của người (tức là, phức gồm hai heterodime, mỗi heterodime có polypeptit Fc được đime hóa với polypeptit là Fc-GDF15 glycomutein) lên thể trọng được đánh giá trong giai đoạn 35 ngày. Ngắn gọn, các phân tử dung hợp B9a/B9b, B11a/B11b và B13a/B13b được sử dụng mỗi tuần trong 21 ngày với liều là 0,4

nmol/kg và 4nmol/kg ở dạng thuốc tiêm liều lớn dưới da (10mL/kg) cho chuột DIO có trọng lượng khoảng 35-40g. Sau khi dùng tá dược lỏng đối chứng hoặc phân tử dung hợp, sự giảm thể trọng được theo dõi ở các thời điểm khác nhau trong giai đoạn 35 ngày bao gồm 21 ngày dùng protein sau đó là 14 ngày rửa thuốc (sau khi dùng) để theo dõi hiệu lực.

Như được thể hiện trên Fig.3-6, việc sử dụng phân tử dung hợp Fc (phức heterodime-heterodime) ở liều 0,4nmol/kg và 4nmol/kg gây ra sự giảm thể trọng có ý nghĩa. Trong mỗi nhóm chuột, $n = 6$ và giá trị p (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, ns=không có ý nghĩa) được xác định bởi kiểm định t-test không cặp đôi của Student so với nhóm đối chứng sử dụng tá dược lỏng ở mỗi thời điểm xác định. Như được thể hiện trên Fig.7, tổng thể trọng với phân tích SEM được trình bày ở mỗi thời điểm lấy mẫu đối với tất cả các nhóm. Như được thể hiện trên Fig.8, sự thay đổi thể trọng (g) với phân tích SEM và giá trị p được trình bày ở mỗi thời điểm lấy mẫu đối với tất cả các nhóm. Như được thể hiện trên Fig.9, phần trăm thay đổi thể trọng (%) với phân tích SEM và giá trị p được trình bày ở mỗi thời điểm lấy mẫu đối với tất cả các nhóm.

Như được thể hiện trên Fig.3 & 5, quan sát thấy hiệu quả làm giảm thể trọng tăng lên đối với B13a/B13b so với B9a/B9b và B11a/B11b trong nghiên cứu liều 0,4nmol/kg. Hiệu quả *in vivo* tăng lên đối với B13a/B13b được cho là do độ ổn định tăng lên vì có đoạn cắt cụt ở 2 gốc ở 2 đầu N của GDF15 (Δ AR).

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

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

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

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phức chứa heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai, mỗi heterodime trong số heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai chứa:

(i) polypeptit thứ nhất chứa từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C:

IgG1 Fc thứ nhất của người chứa vùng bản lề thứ nhất và trình tự CH3 thứ nhất chứa ít nhất là một phần nhô ra đã được xử lý chứa ít nhất là một thay thế axit amin tương ứng ở IgG1 Fc của người, trong đó thay thế này được chọn từ nhóm bao gồm Q347W/Y, T366W/Y, và T394W/Y, theo hệ đánh số EU, và

(ii) polypeptit thứ hai chứa từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C:

IgG1 Fc thứ hai của người chứa vùng bản lề thứ hai và trình tự CH3 thứ hai chứa ít nhất là một khoang đã được xử lý chứa ít nhất là một thay thế axit amin tương ứng ở trình tự IgG1 Fc của người, trong đó thay thế này được chọn từ nhóm bao gồm T366S, L368A, T394S, F405T/V/A, và Y407T/V/A, theo hệ đánh số EU;

trong đó polypeptit thứ nhất đime hóa với polypeptit thứ hai thông qua việc đặt vị trí phần nhô ra của polypeptit thứ nhất vào khoang của polypeptit thứ hai,

trong đó đầu tận cùng C của polypeptit thứ nhất hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ hai được tiếp hợp với đầu tận cùng N của mutein GDF15 thông qua nhóm liên kết, trong đó mutein GDF15 chứa trình tự axit amin liên kế dài ít nhất là 98 axit amin và đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1, trong đó axit amin ở đầu tận cùng C của mutein GDF15 tương ứng với isoleuxin tại vị trí 112 của SEQ ID NO:1, và trình tự axit amin liên kế không chứa hai axit amin đầu tiên có mặt tại đầu tận cùng N của SEQ ID NO:1, và trong đó mutein GDF15 chứa thay thế D5T so với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1; và

trong đó mutein GDF15 ở heterodime thứ nhất đime hóa với mutein GDF15 ở heterodime thứ hai bằng cách đó tạo nên phức chứa heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai.

2. Phức theo điểm 1, trong đó mutein GDF15 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:129.

3. Phức theo điểm 1 hoặc 2, trong đó polypeptit thứ nhất chứa thay thế T366W/Y.

4. Phức theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó polypeptit thứ hai chứa các thay thế T366S, L368A, và Y407T/V/A.
5. Phức theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó
 - (i) polypeptit thứ nhất chứa từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C:
 - (a) IgG1 Fc thứ nhất của người chứa vùng bản lề thứ nhất và trình tự CH3 thứ nhất chứa thay thế T366W;
 - (b) phân liên kết, và
 - (c) mutein GDF15; và
 - (ii) polypeptit thứ hai chứa từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C:
 - (a') trình tự IgG1 Fc thứ hai của người chứa vùng bản lề thứ hai và trình tự CH3 thứ hai chứa các thay thế T366S, L368A, và Y407V.
6. Phức theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó polypeptit thứ nhất chứa miền CH2, polypeptit thứ hai chứa miền CH2, hoặc cả hai polypeptit thứ nhất và thứ hai chứa miền CH2.
7. Phức theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó phân liên kết chứa trình tự (G4S)₃ hoặc (G4S)₅.
8. Phức theo điểm 1, trong đó polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin đã được thể hiện ở SEQ ID NO:3 và polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin đã được thể hiện ở SEQ ID NO:4.
9. Phức theo điểm 1, trong đó polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin đã được thể hiện ở SEQ ID NO:5 và polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin đã được thể hiện ở SEQ ID NO:6.
10. Phức theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó mutein GDF15 được glycosyl hóa tại N.

11. Phức chứa heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai, mỗi heterodime trong số heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai chứa:

polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin đã được thể hiện ở SEQ ID NO: 5; và polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin đã được thể hiện ở SEQ ID NO: 6, trong đó polypeptit thứ nhất được glycosyl hóa tại N, và trong đó polypeptit thứ nhất được dime hóa với polypeptit thứ hai.

12. Dược phẩm chứa phức theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11 và chất pha loãng, chất mang hoặc tá dược được dụng.

13. Axit nucleic hoặc các axit nucleic mã hóa polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.

14. Vector hoặc các vector chứa axit nucleic hoặc các axit nucleic theo điểm 13.

15. Tế bào chủ chứa:

- (i) axit nucleic hoặc các axit nucleic theo điểm 13; hoặc
- (ii) vector hoặc các vector theo điểm 14.

16. Phương pháp tạo ra phức theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, bao gồm việc: nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 15 và phân lập phức.

17. Phương pháp theo điểm 16, còn bao gồm việc bào chế phức thành dược phẩm vô trùng.

18. Dược phẩm để dùng trong việc điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn thể trọng, rối loạn chuyển hóa glucoza, hoặc hội chứng chuyển hóa ở đối tượng là người, trong đó dược phẩm chứa phức và chất pha loãng, chất mang hoặc tá dược được dụng, và

trong đó phức này chứa heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai, mỗi heterodime trong số heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai chứa:

- (i) polypeptit thứ nhất chứa từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C:

IgG1 Fc thứ nhất của người chứa vùng bản lề thứ nhất và trình tự CH3 thứ nhất chứa ít nhất là một phần nhô ra đã được xử lý chứa ít nhất là một thay thế axit amin tương ứng ở IgG1 Fc của người, trong đó thay thế này được chọn từ nhóm bao gồm Q347W/Y, T366W/Y, và T394W/Y, theo hệ đánh số EU, và

(ii) polypeptit thứ hai chứa từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C:

IgG1 Fc thứ hai của người chứa vùng bản lề thứ hai và trình tự CH3 thứ hai chứa ít nhất là một khoang đã được xử lý chứa ít nhất là một thay thế axit amin tương ứng ở trình tự IgG1 Fc của người, trong đó thay thế này được chọn từ nhóm bao gồm T366S, L368A, T394S, F405T/V/A, và Y407T/V/A, theo hệ đánh số EU;

trong đó polypeptit thứ nhất đime hóa với polypeptit thứ hai thông qua việc đặt vị trí phần nhô ra của polypeptit thứ nhất vào khoang của polypeptit thứ hai,

trong đó đầu tận cùng C của polypeptit thứ nhất hoặc đầu tận cùng C của polypeptit thứ hai được tiếp hợp với đầu tận cùng N của mutein GDF15 thông qua nhóm liên kết, trong đó mutein GDF15 chứa trình tự axit amin liên tiếp dài ít nhất là 98 axit amin và đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1, trong đó axit amin ở đầu tận cùng C của mutein GDF15 tương ứng với isoleuxin tại vị trí 112 của SEQ ID NO:1, và trình tự axit amin liên tiếp không chứa hai axit amin đầu tiên có mặt tại đầu tận cùng N của SEQ ID NO:1, và trong đó mutein GDF15 chứa thay thế D5T so với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1; và

trong đó mutein GDF15 ở heterodime thứ nhất đime hóa với mutein GDF15 ở heterodime thứ hai bằng cách đó tạo nên phức chứa heterodime thứ nhất và heterodime thứ hai.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> NGM BIOPHARMACEUTICALS, Inc.
 Shen, Wenyan
 Lindhout, Darrin A.
 Haldankar, Raj
 Matern, Hugo
- <120> PHỨC CHỨA HETEROĐIME THỨ NHẤT VÀ HETEROĐIME THỨ HAI VÀ DƯỢC PHẨM
 CHỨA PHỨC NÀY ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH RỐI LOẠN CHUYỂN HÓA
- <130> NGMB-142WO
- <150> Đơn Mỹ số 62/073,737
 <151> 31-10-2014
- <150> US 62/244,604
 <151> 21-10-2015
- <160> 136
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
- <400> 1

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 2

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

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

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 3
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 3

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 Trp Cys Leu 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 Tyr 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Gly Thr
 225 230 235 240

His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg
 245 250 255

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

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

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

Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro
 305 310 315 320

Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr

325

330

335

Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 340 345

<210> 4
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 4

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

7/126

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

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

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

Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
355 360

<210> 6

<211> 227

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 6

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

<210> 7
<211> 361
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 7

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 Trp Cys Leu 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 Tyr 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 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 Asp His Cys
245 250 255

Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Asn 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> 8
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp
 <400> 8
 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

12/126

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

Pro Gly Lys 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 Asp His Cys
245 250 255

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

Leu Thr 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> 10

<211> 227

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 10

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

<210> 11

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

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 11

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 Trp Cys Leu 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 Tyr 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 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 Asp 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 Asn Arg Thr 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> 12

<211> 227

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 12

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

<210> 13
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 13

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 Trp Cys Leu 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 Tyr 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 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 Asp 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 Asn Ala Thr
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> 14

<211> 227

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 14

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
 <210> 15
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp
 <400> 15
 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 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
145	150	155
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 Tyr 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
225	230	235
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp 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 Asn Thr Thr 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> 16

<211> 227

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 16

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

<210> 17
<211> 361
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 17

Asp Lys Thr His Thr Cys ProPro 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 Trp Cys Leu 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 Tyr 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 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 Asp 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 Asn Thr Thr Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp
 340 345 350
 Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 355 360
 <210> 18
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp
 <400> 18
 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

<210> 19
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 19

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 20

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

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 21

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 22

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 23

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 24

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 25

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 26

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Gly

1

5

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 28

Glu Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

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

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

<400> 29

Pro Xaa Xaa Xaa
1

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
<222> (2)..(3)

<223> axit amin ở vị trí này có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC

<222> (4)..(4)

<223> axit amin ở vị trí này có thể là axit amin kỵ nước bất kỳ

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC

<222> (5)..(5)

<223> axit amin ở vị trí này có thể là Ser hoặc Thr bất kỳ

<400> 30

Pro Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC

<222> (2)..(2)

<223> axit amin ở vị trí này có thể là Leu hoặc Gln

<400> 31

Pro Xaa Gly Met Thr Ser

1

5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC

<222> (2)..(2)

<223> axit amin ở vị trí này có thể là Leu hoặc Gln

<400> 32

Pro Xaa Gly Met Thr
1 5

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 33

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

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 34

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

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 35

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

<210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 36

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

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 37

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

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 38

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

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 39

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

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 40

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

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 41

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

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 42

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

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 43

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

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 44

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

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 45

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

<210> 46

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 46

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

<210> 47

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 47

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

<210> 48

<211> 12

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 48

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

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 49

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

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 50

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

<210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 51

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

<210> 52
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 52

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

<210> 53
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 53

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

<210> 54
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 54

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

<210> 55
<211> 227
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 55

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

<210> 56
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 56
 accatggaca tgaggggtccc cgctcagctc ctgggggtcc tgctactctg gctccgaggt
 60
 gccagatgt
 69

<210> 57
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 57

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270

Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
 275 280 285

His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
 290 295 300

Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro
 305 310 315 320

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

325 330 335
 His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
 340 345 350

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
 355 360 365

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 370 375 380

<210> 58
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 58

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

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

115 120 125
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205
 Thr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245

<210> 59

<211> 383

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 59

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
275 280 285

His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
290 295 300

Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro
305 310 315 320

Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
325 330 335

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
340 345 350

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
355 360 365

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 60

<211> 249

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 60

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 61

<211> 373
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 61

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
 20 25 30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 35 40 45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 50 55 60

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 65 70 75 80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 85 90 95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 100 105 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 115 120 125

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 130 135 140

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Tyr Cys Leu
 145 150 155 160

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 165 170 175

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

180 185 190
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 195 200 205
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 210 215 220
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro
 260 265 270
 Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu
 275 280 285
 Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met
 290 295 300
 Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala
 305 310 315 320
 Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala
 325 330 335
 Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys
 340 345 350
 Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys
 355 360 365
 Asp Cys His Cys Ile
 370

<210> 62
 <211> 239
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 62

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
20 25 30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
35 40 45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
50 55 60

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
65 70 75 80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
85 90 95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
100 105 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
115 120 125

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
130 135 140

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
165 170 175

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
180 185 190

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Thr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
195 200 205

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
210 215 220

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230 235

<210> 63

<211> 373

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 63

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
20 25 30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
35 40 45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
50 55 60

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
65 70 75 80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
85 90 95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
100 105 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
115 120 125

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
130 135 140

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
165 170 175

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
180 185 190

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Thr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
195 200 205

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
210 215 220

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro
260 265 270

Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu
275 280 285

Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met
290 295 300

Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala
305 310 315 320

Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala
325 330 335

Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys

340 345 350

Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys
 355 360 365

Asp Cys His Cys Ile
 370

<210> 64
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 64

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
 20 25 30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 35 40 45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 50 55 60

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 65 70 75 80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 85 90 95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 100 105 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 115 120 125

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

130 135 140
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Tyr Cys Leu
 145 150 155 160
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 165 170 175
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 180 185 190
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 195 200 205
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 210 215 220
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230 235

 <210> 65
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

 <400> 65
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30
 Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

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

His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
290 295 300

Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro
305 310 315 320

Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
325 330 335

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
340 345 350

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
355 360 365

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 66

<211> 249

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 66

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 67

<211> 380

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 67

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

210 215 220
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270
 Gly Ser Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val
 275 280 285
 Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro
 290 295 300
 Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe
 305 310 315 320
 Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu
 325 330 335
 Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn
 340 345 350
 Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr
 355 360 365
 Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 370 375 380

<210> 68
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 68

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

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

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245

<210> 69
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 69

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
 20 25 30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 35 40 45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 50 55 60

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 65 70 75 80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 85 90 95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 100 105 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 115 120 125

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 130 135 140

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
165 170 175

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
180 185 190

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
195 200 205

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
210 215 220

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro
260 265 270

Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu
275 280 285

Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met
290 295 300

Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala
305 310 315 320

Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala
325 330 335

Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys
340 345 350

Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys

355

360

365

Asp Cys His Cys Ile
370

<210> 70
<211> 239
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 70

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
20 25 30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
35 40 45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
50 55 60

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
65 70 75 80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
85 90 95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
100 105 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
115 120 125

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
130 135 140

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala

63/126

64/126

Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys
305 310 315 320

Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys
325 330 335

Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr
340 345 350

Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His
355 360 365

Cys Ile
370

<210> 72

<211> 239

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 72

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
20 25 30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
35 40 45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
50 55 60

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
65 70 75 80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
85 90 95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
100 105 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
115 120 125

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
130 135 140

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
165 170 175

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
180 185 190

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
195 200 205

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
210 215 220

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230 235

<210> 73

<211> 376

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 73

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

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

68/126

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

<210> 75
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 75

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg Asn
 260 265 270

Gly Thr His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
 275 280 285

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
 290 295 300

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
 305 310 315 320

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
 325 330 335

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

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
 355 360 365

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 370 375 380

<210> 76

<211> 249

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 76

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

180 185 190
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205
 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245

<210> 77
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp
 <400> 77

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

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

Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys
325 330 335

Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys
340 345 350

Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr
355 360 365

Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His
370 375 380

Cys Ile
385

<210> 78

<211> 369

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 78

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Gly Ser Asn Gly Thr His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys
 260 265 270

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

Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala
 290 295 300

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

100 105 110
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205
 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245

<210> 80

<211> 384

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 80

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Asn Gly Thr His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
275 280 285

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
290 295 300

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
305 310 315 320

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
325 330 335

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
340 345 350

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
355 360 365

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 81

<211> 249

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 81

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

245

<210> 82
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 82

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

83/126

<210> 83
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 83

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 84

<211> 383

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 84

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270

Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
 275 280 285

His Thr Val Arg Ala Asn Leu Thr Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
 290 295 300

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

87/126

100 105 110
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205
 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245

<210> 86

<211> 383

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 86

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
275 280 285

His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
290 295 300

Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro
305 310 315 320

Ser Gln Asn Arg Thr Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
325 330 335

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
340 345 350

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
355 360 365

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 87

<211> 249

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 87

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

245

<210> 88
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 88

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

93/126

<210> 89
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 89

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 90

<211> 383

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 90

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270

Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
 275 280 285

His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
 290 295 300

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

97/126

100 105 110
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205
 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245
 <210> 92
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp
 <400> 92
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
275 280 285

His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
290 295 300

Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro
305 310 315 320

Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
325 330 335

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
340 345 350

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asn Thr Thr Val Ser
355 360 365

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 93

<211> 249

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 93

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 130 135 140

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

245

<210> 94
<211> 31
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 94

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

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

<210> 95
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 95

Ala Arg Asn Gly Asp His
1 5

<210> 96
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 96

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5

<210> 97
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 97

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro
1 5

<210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 98

Ala Pro Ala Leu Leu Gly Gly Pro
1 5

<210> 99

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 99

Ala Pro Glu Leu Ala Gly Gly Pro
1 5

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 100

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 101

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 101

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 102

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 102

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 103

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 103

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 104

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 104

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 105

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

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 105

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 106
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 106

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 107
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 107

Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 108
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 108

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 109

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 109

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Asn Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 110

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 110

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Asn Ala Thr Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 111

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 111

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Asn Leu Thr Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 112

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 112

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
 65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Asn Asp Thr Val Pro
 85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 113
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 113

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
 65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
 85 90 95

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

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 114
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 114

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
 65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
 85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110

Asn Thr Thr Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 115

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 115

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr

50 55 60
 Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
 65 70 75 80
 Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
 85 90 95
 Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110
 Lys Thr Asp Thr Asn Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125
 Lys Asp Cys His Cys Ile
 130
 <210> 117
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp
 <400> 117
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30
 Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45
 Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60
 Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
 65 70 75 80
 Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro

85 90 95
 Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110
 Lys Thr Asp Thr Gly Val Asn Leu Thr Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125
 Lys Asp Cys His Cys Ile
 130
 <210> 118
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp
 <400> 118
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30
 Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45
 Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60
 Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
 65 70 75 80
 Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
 85 90 95
 Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110
 Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Asn Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala

115

120

125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 119
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 119

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

Thr

<210> 120
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
<222> (1)..(5)
<223> mạch axit amin này có thể lặp lại đến 50 lần

<400> 120

Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 121
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (1)..(1)
 <223> axit amin này có thể lặp lại đến 20 lần

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (1)..(5)
 <223> mạch axit amin này có thể lặp lại đến 20 lần

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (2)..(2)
 <223> axit amin này có thể lặp lại đến 20 lần

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (3)..(3)
 <223> axit amin này có thể lặp lại đến 20 lần

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (4)..(4)
 <223> axit amin này có thể lặp lại đến 20 lần
 <220>

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (5)..(5)
 <223> axit amin này có thể lặp lại đến 20 lần

<400> 121

Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5

<210> 122
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (1)..(5)
 <223> mạch axit amin này có thể lặp lại đến 20 lần

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC
 <222> (5)..(5)

<223> axit amin này có thể lặp lại đến 20 lần

<400> 122

Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 123

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC

<222> (1)..(5)

<223> mạch axit amin này có thể lặp lại đến 20 lần

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC

<222> (2)..(2)

<223> axit amin này có thể lặp lại đến 20 lần

<400> 123

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 124

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC

<222> (1)..(4)

<223> mạch axit amin này có thể lặp lại đến 20 lần

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC

<222> (4)..(4)

<223> axit amin này có thể lặp lại đến 20 lần

<400> 124

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 125

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC

<222> (1)..(4)

<223> mạch axit amin này có thể lặp lại đến 50 lần

<400> 125

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 126

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC

<222> (1)..(5)

<223> mạch axit amin này có thể lặp lại đến 50 lần

<400> 126

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 127

<211> 227

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 127

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 Trp Cys Leu 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 Tyr 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

<210> 128
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 128

Ala	Arg	Asn	Gly	Thr	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> 129
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 129

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

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

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

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

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

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

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

<210> 130

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 130

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

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

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

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

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

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

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

<210> 131

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 131

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

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

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

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

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

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

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

<210> 132

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 132

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

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

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

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

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

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

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

<210> 133

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 133

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

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

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

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

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

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

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

<210> 134

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 134

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

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

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

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

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

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

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

<210> 135
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 135

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

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

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

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

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

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

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

<210> 136
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự polypeptit tổng hợp

<400> 136

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

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

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

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

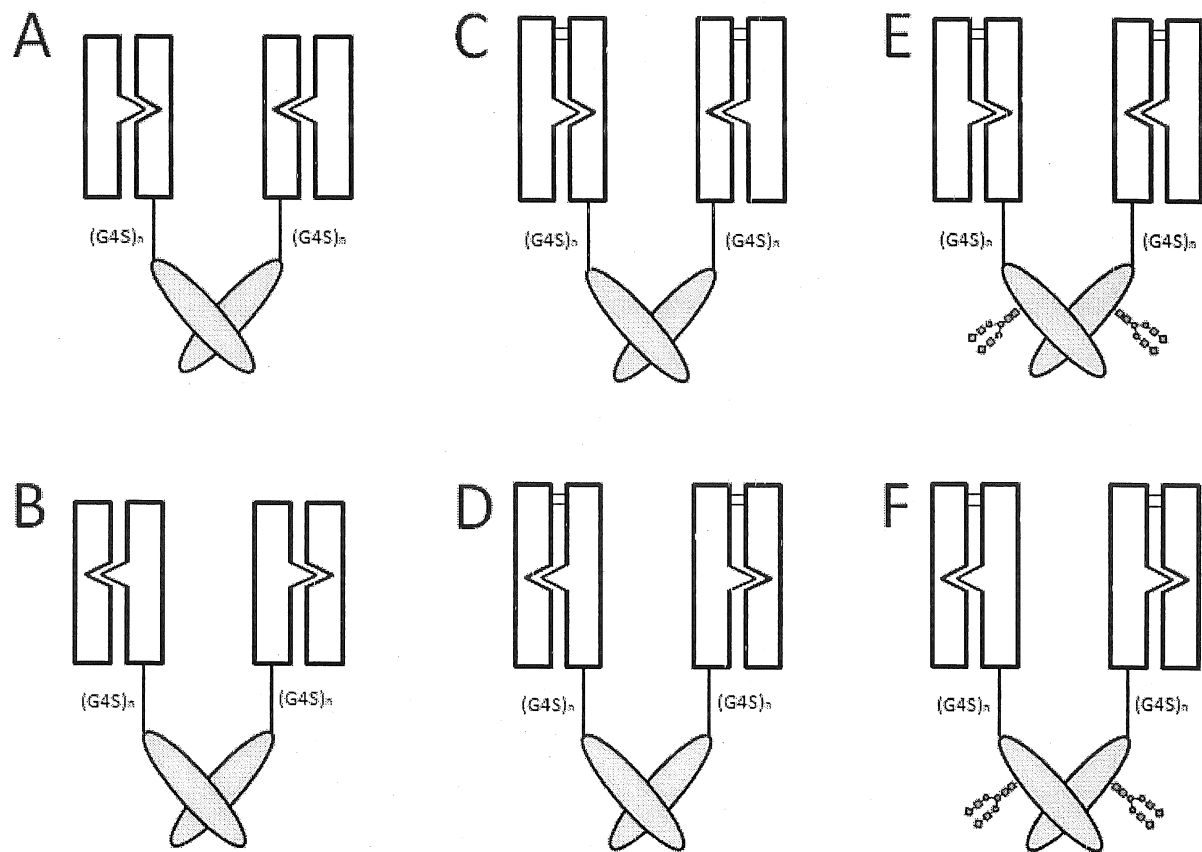
Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

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

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

1/10

Fig. 1 – Các thiết kế của phân tử (Fc/Fc)-GDF15 nóm-trong-lỗ



2/10

Fig. 2A – Tỷ lệ thu hồi của phân tử (Fc/Fc)-GDF15 nóm-trong-lỗ được thao tác di truyền

<u>Chuỗi A của Fc-GDF15</u>	<u>Chuỗi B của phần Fc heterodime (nóm/lỗ)</u>	<u>Số biến thể</u>	<u>GDF15 mutein (glycosyl hóa)</u>	<u>Tỷ lệ thu hồi (mg/L)</u>
hlgG1-Fc(AA)(T366Y)-(G ₄ S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hlgG1-Fc(AA)(Y407T)	B1a/B1b	KHÔNG	<25
hlgG1-Fc(AA)(Y407T)-(G ₄ S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hlgG1-Fc(AA)(T366Y)	B2a/B2b	KHÔNG	25-49,9
hlgG1-Fc(Δbản lề, AA)(T366Y)-(G ₄ S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hlgG1-Fc(Δbản lề, AA)(Y407T)	B3a/B3b	KHÔNG	50-74,9
hlgG1-Fc(Δbản lề, AA)(Y407T)-(G ₄ S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hlgG1-Fc(Δbản lề, AA)(T366Y)	B4a/B4b	KHÔNG	<25
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hlgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B5a/B5b	KHÔNG	<25
hlgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)-(G ₄ S) ₅ -ΔN6-GDF15 (C7-I112)	hlgG1-Fc(AA)(T366W)	B6a/B6b	KHÔNG	<25
hlgG1-Fc(Δbản lề, AA)(T366W)-(G ₄ S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hlgG1-Fc(Δbản lề, AA)(T366S,L368A,Y407V)	B7a/B7b	KHÔNG	25-49,9
hlgG1-Fc(Δbản lề, AA)(T366S,L368A,Y407V)-(G ₄ S) ₅ -ΔN6-GDF15(C7-I112)	hlgG1-Fc(Δbản lề, AA)(T366W)	B8a/B8b	KHÔNG	Không có sẵn
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₃ -GDF15 (A1-I112) (D5T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B9a/B9b	CÓ	>100
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₄ -GDF15 (A1-I112) (D5T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B10a/B10b	CÓ	>100
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₅ -GDF15 (A1-I112) (D5T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B11a/B11b	CÓ	>100
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₂ -ΔN2-GDF15 (N3-I112) (D5T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B12a/B12b	CÓ	75-99
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₅ -ΔN2-GDF15 (N3-I112) (D5T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B13a/B13b	CÓ	>100
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)(R21N)	hlgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B14a/B14b	CÓ	75-99
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)(S23N/E25T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B15a/B15b	CÓ	75-99
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)(F52N/A54T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B16a/B16b	CÓ	>100
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)(R53N/A55T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B17a/B17b	CÓ	75-99
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112) (K91N/D93T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B18a/B18b	CÓ	75-99
hlgG1-Fc(AA)(T366W)-(G ₄ S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)(D93N/G95T)	hlgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B19a/B19b	CÓ	50-74,9

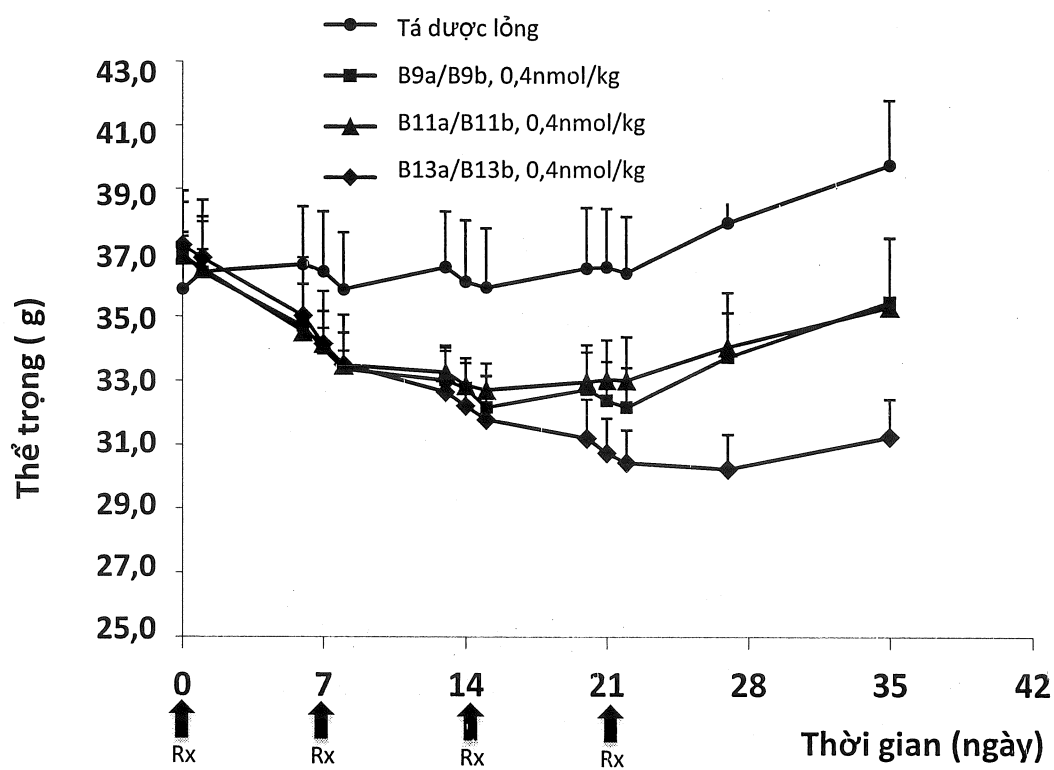
3/10

Fig. 2B – Tỷ lệ thu hồi của GDF15 glycomutuin

<u>Biến thể glycosyl hóa</u>	<u>Tỷ lệ thu hồi (mg/L)</u>
hGDF15 kiểu dại	< 0,99
R21N	< 0,99
R53N/A55T	4 - 7,99
S64N/H66T	16 - 31,99
P70N	2 - 3,99
Q90N	4 - 7,99
K91N/D93T	16 - 31,99
D93N/G95T	8 - 15,99
G95N	8 - 15,99
S97N/Q99T	8 - 15,99
L98N	4 - 7,99

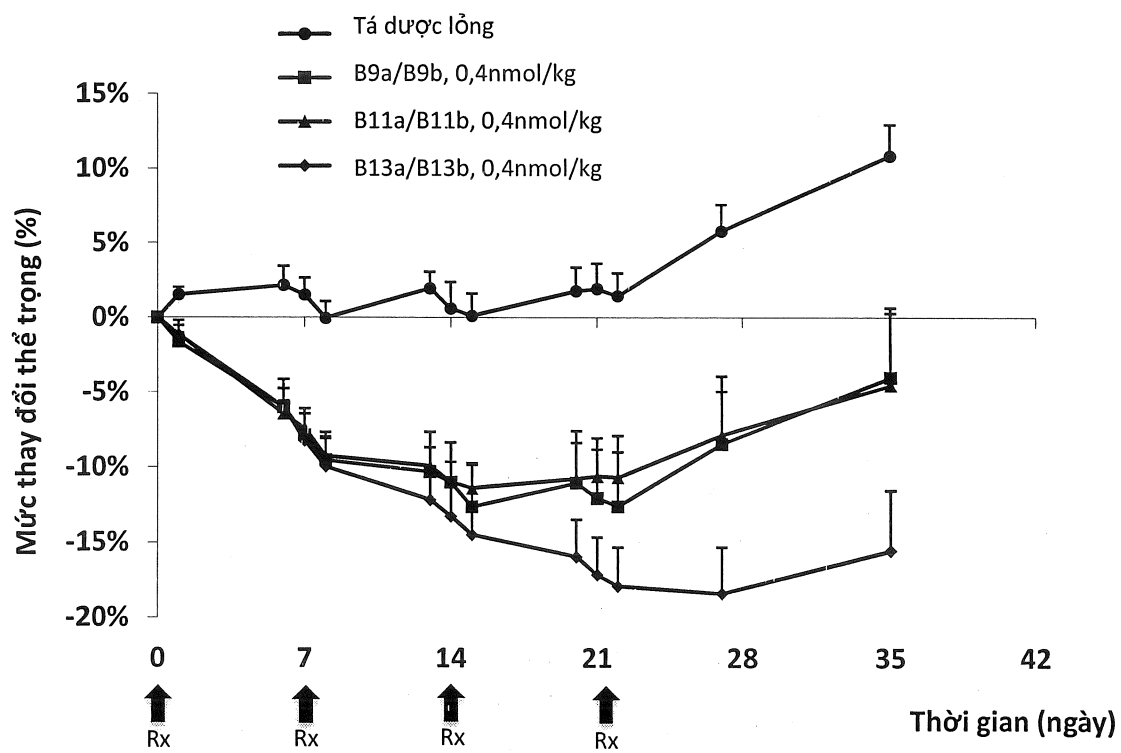
4/10

Fig. 3 – Sự giảm thể trọng ở mô hình chuột DIO khi sử dụng phân tử (Fc/Fc)-GDF15 với liều 0,4nmol/kg



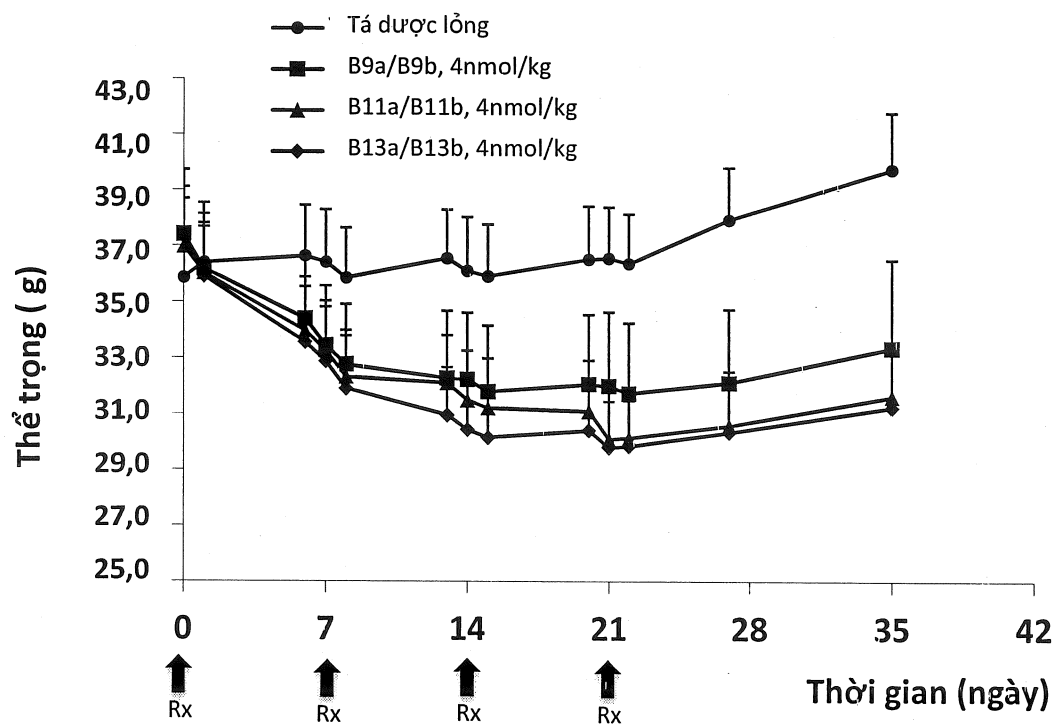
5/10

Fig. 4 – Phần trăm giảm thể trọng ở mô hình chuột DIO khi sử dụng phân tử (Fc/Fc)-GDF15 với liều 0,4nmol/kg



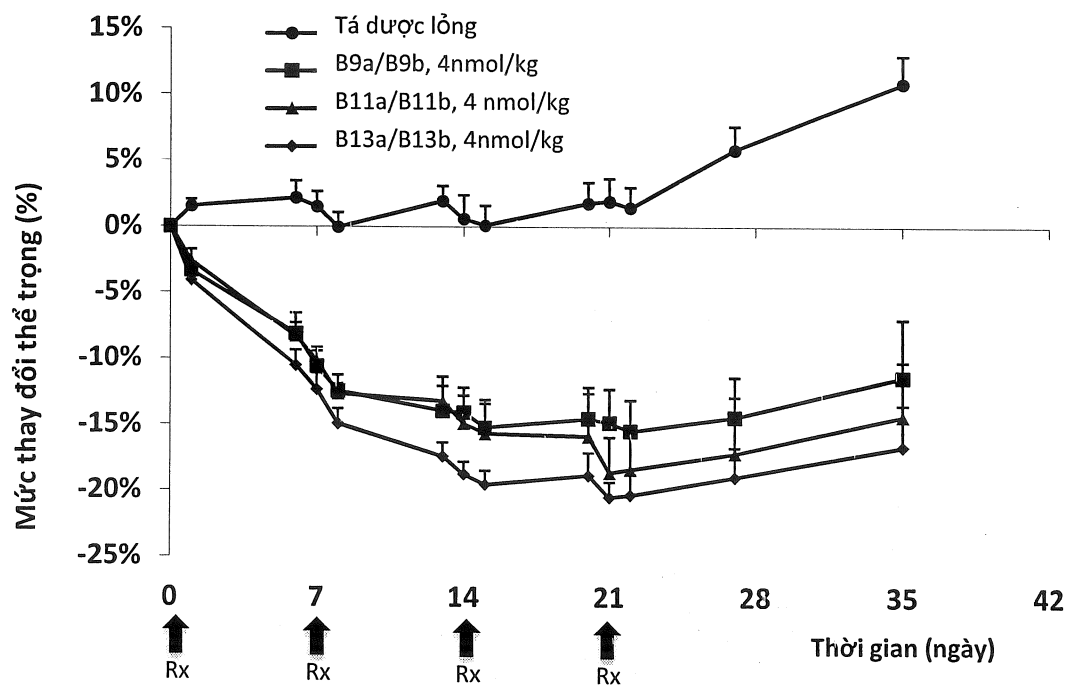
6/10

Fig. 5 – Mức giảm thể trọng ở mô hình chuột DIO khi sử dụng phân tử (Fc/Fc)-GDF15 với liều 4,0nmol/kg



7/10

Fig. 6 – Phần trăm giảm trọng lượng cơ thể ở mô hình chuột DIO khi sử dụng phân tử (Fc/Fc)-GDF15 với liều 4,0nmol/kg



8/10

Fig. 7 – Thê trọng (g) ở chuột DIO tại mỗi thời điểm đối với phân tử (Fc/Fc)-GDF15 liều 0,4nmol/kg và 4,0nmol/kg

	D 0	D1	D6	D7	D8	D13	D14	D15	D20	D21	D22	D27	D35
Tá dược lỏng	35,9	36,4	36,6	36,4	35,9	36,6	36,1	35,9	36,5	36,6	36,4	37,9	39,8
B9a/B9b 0,4nmol/kg	37,0	36,4	34,7	34,0	33,4	33,0	32,8	32,2	32,7	32,4	32,2	33,7	35,5
B9a/B9b 4nmol/kg	37,4	36,2	34,4	33,5	32,8	32,3	32,2	31,8	32,1	32,0	31,7	32,1	33,4
B11a/B11b 0,4nmol/kg	36,9	36,5	34,5	34,2	33,5	33,3	32,9	32,7	33,0	33,0	33,0	34,1	35,3
B11a/B11b 4nmol/kg	37,0	36,0	34,0	33,3	32,3	32,1	31,5	31,2	31,1	30,1	30,2	30,6	31,6
B13a/B13b 0,4nmol/kg	37,2	36,8	35,0	34,2	33,5	32,7	32,2	31,8	31,2	30,7	30,4	30,2	31,2
B13a/B13b 4nmol/kg	37,4	35,9	33,6	32,9	31,9	31,0	30,5	30,2	30,4	29,8	29,9	30,4	31,2

sem	D 0	D1	D6	D7	D8	D13	D14	D15	D20	D21	D22	D27	D35
Tá dược lỏng	1,77	1,72	1,81	1,87	1,78	1,74	1,92	1,84	1,89	1,82	1,76	1,87	2,04
B9a/B9b 0,4nmol/kg	1,58	1,58	1,30	1,17	1,13	0,91	0,93	0,99	1,16	1,21	1,23	1,39	2,01
B9a/B9b 4nmol/kg	2,32	2,35	2,27	2,12	2,14	2,39	2,37	2,35	2,47	2,63	2,51	2,61	3,15
B11a/B11b 0,4nmol/kg	0,59	0,58	0,52	0,47	0,45	0,77	0,69	0,82	1,15	1,23	1,35	1,69	2,15
B11a/B11b 4nmol/kg	1,70	1,78	1,89	1,76	1,65	1,69	1,76	1,76	1,81	1,72	1,68	1,93	1,87
B13a/B13b 0,4nmol/kg	1,69	1,80	1,81	1,64	1,55	1,44	1,33	1,36	1,21	1,09	1,02	1,07	1,17
B13a/B13b 4nmol/kg	1,70	1,75	1,96	1,94	1,87	1,70	1,66	1,69	1,71	1,64	1,63	1,71	1,97

