



(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)



1-0051158

(51)^{2020.01} C07K 14/435; A61K 47/64; C07K 14/765; A61P 21/00; A61K 38/17; A61K 9/00 (13) B

(21) 1-2021-05876

(22) 27/02/2020

(86) PCT/KR2020/002809 27/02/2020

(87) WO2020/175931 A1 03/09/2020

(30) 10-2019-0023375 27/02/2019 KR

(45) 25/09/2025 450

(43) 27/12/2021 405A

(73) DAEWOONG PHARMACEUTICAL CO., LTD. (KR)

35-14, Jeyakgongdan 4-gil, Hyangnam-eup, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 18623, Korea

(72) KOH, Jung Min (KR); KIM, Sung Sub (KR); AHN, Kyong Hoon (KR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PROTEIN DUNG HỢP BAO GỒM LRRD2 CỦA PROTEIN SLIT3 LIÊN KẾT VỚI ALBUMIN, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY

(21) 1-2021-05876

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm Slit3 LRRD2 liên kết với albumin để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh về cơ và cụ thể là đề xuất một protein dung hợp bao gồm Slit3 LRRD2 liên kết với albumin, phân tử axit nucleic mã hóa protein dung hợp, một vectơ tái tổ hợp bao gồm phân tử axit nucleic, chất biến đổi bao gồm vectơ tái tổ hợp, phương pháp điều chế protein dung hợp bằng cách sử dụng chất biến đổi, chế phẩm được bao gồm protein dung hợp để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh về cơ và chế phẩm bao gồm protein dung hợp để cải thiện thời gian bán phân hủy *in vivo* - của LRRD2 của protein Slit 3.

PC ADN 3.1 (+) - SP xystatin S - HSA (pro) - trình tự protein H Slit3 LRRD2-FLAG

MARPLCTILLIMATLAGALADAHKSEVAHRRFDLGEENFKALVLIFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESABNCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKGEPERNECFCHKDDNPNLRLVRFPEYDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLPFAKRYKAAPTECCGAADKAAOLLPRDELDE
GKASSAKQRLKCSLQKFGERAFAKAWAVARLSORFPKAEFAEVSCLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRAADLAKYICENQDSISSKLKECCCKLLEKSHCIAE
VENDEMPADLPSLAACFVESKDVCKNYAEAKQVFLGMFLYETARRHROYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHEGYAKVDFEFKPLVEEPONLIHQNCLEFE
QLGEYKQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEQYLSVYLNGLCYLHEKTPVSDHVTKOOTESLVNRRPQFSALEVDETYVVK
EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKOTALVELYKHKKPKATKEQLKAVMDQFAAFVEKCKKADDKETCFAEESOKLVAASQAALGLSCPSPTCSNNIVDCHRK
QLMEIPANLPEQVIEPLECHSIKAPADAFQYKKLRIDGKNQDISDIAPDQFQKSLTSLVLYSNKTEIAKOLFQGLVSLQLLLLNANKNCLRVNTFOOLCNLN
LLSLYDNKLGTSKQLFAPLQSIQTLHLAQNPVCGDCHLWLAQYLOONPIETSQARCSPPHRLANKRISQKSKIFROS **DYKDDDDK* (SEQ ID NO: 9)**

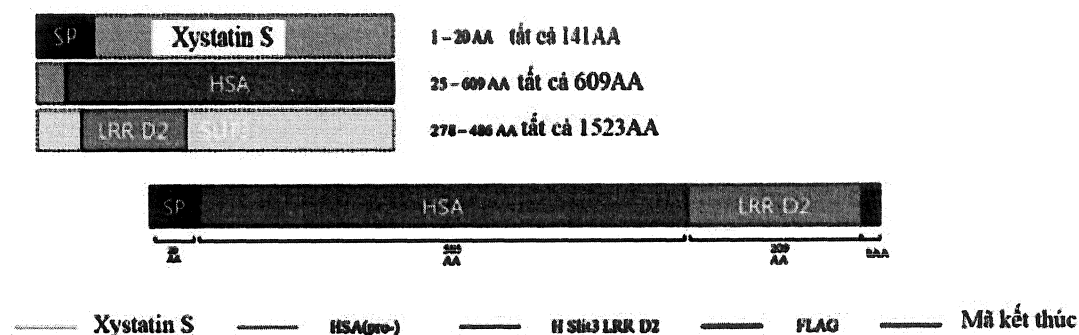


FIG. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm Slit3 LRRD2 liên kết với albumin để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh về cơ và đặc biệt hơn là đề xuất một protein dung hợp bao gồm Slit3 LRRD2 liên kết với albumin, phân tử axit nucleic mã hóa protein dung hợp, vectơ tái tổ hợp bao gồm phân tử axit nucleic, chất biến đổi bao gồm vectơ tái tổ hợp, phương pháp điều chế protein dung hợp bằng cách sử dụng chất biến đổi, chế phẩm bao gồm protein dung hợp để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh về cơ và chế phẩm chứa protein dung hợp để cải thiện thời gian bán hủy in vivo (trên cơ thể sống) của LRRD2 của protein Slit 3.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein Slit là loại protein đã biết có tác dụng điều chỉnh sự chuyển động của các neuron và sợi trục trong quá trình phát triển của hệ thần kinh. Được biết, protein Slit có thể hoạt động với một thụ thể Robo để điều chỉnh hoạt động sinh lý và đóng vai trò như một yếu tố điều chỉnh các quá trình nội bào khác nhau trong các mô khác nhau như mô tim, phổi, thận và vú, và như nó đã được báo cáo gần đây rằng các protein Slit đóng một vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh sự tăng trưởng, khả năng kết dính và khả năng di chuyển của tế bào, đã được biết là các protein khe có thể tham gia vào quá trình di chuyển trong sự biệt hóa của tế bào và sự xuất hiện và di căn của ung thư. Cụ thể, có báo cáo cho rằng protein Slit và protein Robo được biểu hiện trong giai đoạn phát triển phôi thai của động vật có xương sống, và sự biểu hiện của các protein Slit3, Robo1 và Robo2 được tăng lên trong các mô cơ. Báo cáo đề cập rằng sự biểu hiện của protein Slit3 đã tăng lên trong

các nguyên bào của mô cơ chân sau của phôi, nhưng protein có thể chỉ tham gia vào khả năng di chuyển và có thể không liên quan đến sự biệt hóa của các nguyên bào.

Các tác giả sáng chế này đã bộc lộ về LRRD2 của protein Slit3 có thể được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị hội chứng suy giảm cơ bắp bằng cách thúc đẩy sự biệt hóa của các nguyên bào để tăng khối lượng cơ (Công bố đơn đăng ký patent Hàn Quốc số 10-2017-0138920). Vì LRRD2 cần được sử dụng dưới dạng tiêm, bệnh nhân cần đến bệnh viện, nhưng LRRD2 có thời gian bán hủy in vivo rất ngắn, do đó, chu kỳ sử dụng của nó nên được rút ngắn để thể hiện tác dụng y học của nó, và dự kiến là một vấn đề trong đó hiệu quả của nó bị giảm do việc sử dụng quá nhiều thuốc xảy ra.

Do đó, các tác giả sáng chế này đã phát triển protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 với hiệu quả được cải thiện bằng cách tăng thời gian bán hủy in vivo của LRRD2, do đó hoàn thiện sáng chế này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết

Mục đích của sáng chế này là đề xuất protein dung hợp để cải thiện thời gian bán hủy in vivo của LRRD2 của protein Slit3.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa protein dung hợp như được mô tả ở trên, vectơ tái tổ hợp bao gồm phân tử axit nucleic và biến đổi bao gồm vectơ tái tổ hợp.

Một mục đích khác của sáng chế là cung cấp phương pháp điều chế protein dung hợp được mô tả ở trên.

Tuy nhiên, một mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm trong đó LRRD2 của protein Slit3 đã cải thiện hiệu quả phòng ngừa hoặc điều trị đối với bệnh về cơ.

Tuy nhiên, một mục đích khác của sáng chế này là đề xuất chế phẩm trong đó LRRD2 của protein Slit3 có thời gian bán hủy in vivo được nâng cao.

Giải pháp kỹ thuật

Để đạt được các mục đích như đã được mô tả ở trên, sáng chế đề xuất protein dung hợp trong đó albumin được liên kết với LRRD2 của protein Slit3.

Theo một phương án được ưu tiên làm ví dụ của sáng chế, albumin có thể là albumin huyết thanh người.

Theo một phương án được ưu tiên mẫu mực khác của sáng chế này, trong protein dung hợp, albumin huyết thanh người có thể được liên kết với đầu tận cùng N của LRRD2 của protein Slit3.

Theo một phương án được ưu tiên mẫu mực khác của sáng chế này, albumin huyết thanh người có thể bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 2.

Theo một phương án được lấy làm ví dụ được ưu tiên khác của sáng chế, LRRD2 của protein Slit3 có thể bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 3.

Theo một phương án được lấy làm ví dụ khác được ưu tiên của sáng chế này, trình tự liên kết có thể còn bao gồm giữa albumin và LRRD2 của protein Slit3.

Theo một phương án được lấy làm ví dụ được ưu tiên khác của sáng chế, trình liên kết có thể là (GGGGS) n (SEQ ID NO: 5), trong đó n có thể là số nguyên từ 1 đến 10.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa protein dung hợp như đã được mô tả ở trên.

Sáng chế cũng đề xuất vector tái tổ hợp bao gồm phân tử axit nucleic được mô tả ở trên và chất biến đổi chứa phân tử này.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều chế protein dung hợp, phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy chất biến đổi được mô tả ở trên.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa protein dung hợp được mô tả ở trên để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh về cơ.

Theo một phương án được lấy làm ví dụ được ưu tiên khác của sáng chế, được phẩm có thể được sử dụng dưới dạng thuốc tiêm.

Theo một phương án được làm ví dụ được ưu tiên khác của sáng chế, bệnh về cơ có thể là một hoặc nhiều bệnh bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm mất trương lực cơ, teo cơ, loạn dưỡng cơ, hội chứng suy giảm cơ bắp (bệnh thiếu cơ).

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm bao gồm LRRD2 của protein Slit3 liên kết với albumin để cải thiện thời gian bán hủy in vivo của LRRD2 của protein Slit3.

Hiệu quả của sáng chế

Vì LRRD2 của protein Slit3 liên kết với albumin có cùng hiệu quả tế bào học như LRRD2 không liên kết với albumin của protein Slit3 và có thời gian bán hủy in vivo tăng lên đáng kể so với LRRD2 của protein Slit3 không liên kết với albumin, bệnh liên quan đến cơ có thể được phòng ngừa hoặc điều trị hiệu quả hơn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 minh họa thành phần của protein dung hợp trong đó albumin theo sáng chế được liên kết với đầu tận cùng N của Slit3 LRRD2 và trình tự axit amin của nó.

Fig. 2 minh họa kết quả thực hiện trang SDS-PAGE sau khi phân lập và tinh sạch protein dung hợp SP xystatin S-HSA-Slit3LRRD2.

Fig. 3 là đồ thị minh họa khả năng liên kết thụ thể của các dạng protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 khác nhau.

Fig. 4 minh họa cấu hình thời gian nồng độ trong huyết tương của Slit3 LRRD2 sau khi tiêm tĩnh mạch Slit3 LRRD2 (●, "Slit3") và HSA-Slit3 LRRD2 (■, "HSA-Slit3") cho chuột đực ICR đã nhện ăn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án thực hiện sáng chế

Như đã mô tả ở trên, LRRD2 của protein Slit3 có thể được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị chứng giảm hội chứng suy giảm cơ bắp bằng cách thúc đẩy sự biệt hóa của các nguyên bào để tạo ra sự gia tăng khối lượng cơ, nhưng LRRD2 có thời gian bán hủy in vivo rất ngắn, vì vậy chu kỳ điều trị của nó nên rút ngắn để thể hiện các tác dụng y học của chúng, và dự kiến rằng một vấn đề trong đó hiệu quả của nó bị giảm do sử dụng quá nhiều thuốc có thể xảy ra.

Do đó, các tác giả sáng chế này đã tìm kiếm giải pháp cho vấn đề như đã được mô tả ở trên bằng cách nâng cao thời gian bán phân hủy in vivo của LRRD2 để phát triển protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 với hiệu quả được cải thiện. Vì LRRD2 gắn với albumin của protein Slit3 có cùng hiệu quả tế bào học như LRRD2 không liên kết với albumin của protein Slit3 và có thời gian bán hủy in vivo tăng lên đáng kể so với LRRD2 của protein Slit3 không liên kết với albumin, bệnh liên quan đến cơ có thể được phòng ngừa hoặc điều trị hiệu quả hơn.

Sau đây, sáng chế này sẽ được mô tả chi tiết hơn.

Sáng chế đề xuất protein dung hợp trong đó albumin được liên kết với LRRD2 của protein Slit3.

Trong protein dung hợp theo sáng chế này, "LRRD2 của protein Slit3" đề cập đến vùng lặp lại thứ hai giàu leuxin (LRRD2) trong protein Slit3. Thông qua các nghiên cứu trước đây, các nhà phát minh hiện tại đã xác nhận rằng protein Slit3 hoặc LRRD2 trong protein này liên kết với thụ thể Robo1 hoặc Robo2 để giải phóng liên kết β -catenin với M-cadherin của các nguyên bào thông qua hệ thống Slit-Robo, do đó thúc đẩy sự hình thành cơ bằng cách kích hoạt β -catenin và tăng biểu hiện của myogenin để tạo ra sự biệt hóa của các nguyên bào. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "Slit3 LRRD2" đề cập đến "LRRD2 của protein Slit3" và có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Trong protein dung hợp theo sáng chế này, albumin có thể là albumin huyết thanh người, albumin huyết thanh tằm huyết (RhSA), albumin huyết thanh khỉ đuôi dài cynomolgus (CySA), hoặc albumin huyết thanh chuột (MuSA), và tốt nhất là albumin huyết thanh người. Slit3 LRRD2 có thời gian bán hủy in vivo của Slit3 LRRD2 khi có mặt albumin huyết thanh người dài hơn ít nhất 10 lần so với Slit3 LRRD2 khi không có albumin huyết thanh người. Theo một phương án được lấy làm ví dụ cụ thể của sáng chế này, thời gian bán hủy trong huyết thanh của Slit3 LRRD2 khi có mặt albumin huyết thanh người dài hơn 14 lần so với thời gian bán phân hủy của Slit3 LRD2 khi không có albumin huyết thanh người.

Protein dung hợp theo sáng chế này có thể được liên kết theo thứ tự của albumin huyết thanh người và Slit3 LRRD2, hoặc ngược lại. Tốt hơn là, albumin huyết thanh người và Slit3 LRRD2 được liên kết theo thứ tự này. Ví dụ, khi albumin huyết thanh người liên kết với đầu tận cùng N của Slit3 LRRD2, Slit3 LRRD2 có thời gian bán phân hủy in vivo tốt nhất và có hiệu quả điều trị đối với các bệnh liên quan đến cơ và khi

albumin huyết thanh người liên kết với đầu tận cùng C của chúng, nó có thể cho thấy một hiệu quả hiệu quả mặc dù có thể có sự khác biệt về mức độ.

Trong chế phẩm dung hợp theo sáng chế này, vì albumin huyết thanh người, trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ bao gồm 609 axit amin hoặc đoạn bao gồm một phần trình tự axit amin của chúng có thể được sử dụng. Trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ của albumin huyết thanh người được bộc lộ trong Ngân hàng gen NCBI (NCBI GenBank): AAA98797.1, và theo một phương án được lấy làm ví dụ của sáng chế này, đoạn bao gồm axit amin thứ 25 đến 609 (585 axit amin) từ albumin huyết thanh người có chiều dài đầy đủ bao gồm 609 axit amin đã được sử dụng. Trong protein dung hợp theo sáng chế này, albumin huyết thanh người bao gồm trình tự SEQ ID NO: 2 như sau:

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTC
VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTFC
CQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPK
AEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLL
EKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY
SVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE
YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVL
NQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTL
SEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGK
KLVAASQAALGL (SEQ ID NO: 2).

Trong protein dung hợp theo sáng chế, Slit3 LRRD2 có nguồn gốc từ người và trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ của LRRD2 trong protein Slit3 bao gồm 1523 axit amin hoặc đoạn bao gồm một phần trình tự axit amin của chúng có thể được sử dụng. Trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ của protein Slit3 được bộc lộ trong Ngân hàng gen NCBI (NCBI GenBank): AAQ89243.1, và theo một phương án ví dụ của sáng chế, là

Slit3 LRRD2, dạng đoạn bao gồm axit amin thứ 278 đến 486 (209 axit amin) từ protein Slit3 có chiều dài đầy đủ bao gồm 1523 axit amin đã được sử dụng. Trong protein dung hợp theo sáng chế, Slit3 LRRD2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 như sau:

ISCSPCTCSNNIVDCRGKGLMEIPANLPEGIVEIRLEQNSIKAIPAGAFTQYKKL
KRIDISKNQISDIAPDAFQGLKSLTSLVLYGNKITEIAKGLFDGLVSLQLLLLNANKINCL
RVNTFQDLQNLNLLSLYDNKLQTISKGLFAPLQSIQTLHLAQNPVCDCHLKWLADYL
QDNPIETSGARCSSPRRLANKRISQIKSKKFRCS (SEQ ID NO: 3).

Trong protein dung hợp theo sáng chế, "Slit3 LRRD2" có thể bao gồm tương đương chức năng của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3.

"Tương đương chức năng" có độ tương đồng trình tự ít nhất là 70% trở lên, tốt hơn là 80% trở lên, tốt hơn là 90% trở lên, và thậm chí tốt hơn nữa là 95% trở lên với trình tự axit amin của SEQ ID NOS: từ 1 đến 4 theo sáng chế bằng cách bổ sung, thay thế hoặc loại bỏ các axit amin của protein hoặc peptit, và đề cập đến protein hoặc peptit thể hiện hoạt động sinh lý về cơ bản tương đương với protein hoặc peptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NOS: từ 1 đến 4.

Cụ thể là, đối với protein dung hợp, không chỉ protein hoặc peptit có trình tự axit amin kiểu đại của chúng, mà còn có thể bao gồm biến thể trình tự axit amin của chúng trong phạm vi của sáng chế. Biến thể trình tự axit amin đề cập đến protein hoặc peptit có trình tự khác với trình tự axit amin kiểu đại của Slit3 LRRD2 bằng cách xóa, chèn, thay thế không bảo toàn hoặc bảo toàn của một hoặc nhiều gốc axit amin hoặc kết hợp của chúng.

Sự trao đổi axit amin có thể xảy ra trong protein và peptit mà không làm thay đổi hoàn toàn hoạt động của các phân tử được biết đến trong tình trạng kỹ thuật đã biết (H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). Các trao đổi thường xảy ra nhất là trao đổi giữa các gốc axit amin Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile,

Leu/Val, Ala/Glu, and Asp/Gly. Trong một số trường hợp, các axit amin cũng có thể bị biến đổi bằng cách photphoryl hóa, sulfat hóa, axetyl hóa, glycosyl hóa, metyl hóa, farnesyl hóa hoặc tương tự.

Slit3 LRRD2 theo sáng chế, hoặc các biến thể của chúng có thể được chiết xuất từ tự nhiên hoặc tổng hợp (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-2156, 1963) hoặc được điều chế bằng phương pháp tái tổ hợp gen dựa trên trình tự ADN (Sambrook và cộng sự, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2d Ed., 1989).

Slit3 LRRD2 theo sáng chế có thể không chỉ chịu sự dung hợp albumin mà còn có thể dung hợp hoặc PEGyl hóa protein Fc của IgG, và tương tự để tăng thời gian bán phân hủy in vivo của chúng.

Trong protein dung hợp theo sáng chế, trình tự liên kết có thể được thêm vào giữa albumin và LRRD2 của protein Slit3. Loại trình liên kết ưu tiên có thể là (GGGS) n (SEQ ID NO: 5), trong đó n có thể là số nguyên từ 1 đến 10 và tốt nhất là n có thể là số nguyên từ 1 đến 5.

Sáng chế này cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa protein dung hợp ở dạng albumin huyết thanh người được liên kết với đầu tận cùng N của Slit3 LRRD2, và ngoài ra, xystatin S có thể được liên kết với đầu tận cùng N của albumin huyết thanh người.

Trong phân tử axit nucleic theo sáng chế, xystatin S là một peptit tín hiệu, trình tự bazơ mã hóa xystatin S được liên kết với đầu tận cùng 5' của trình tự bazơ mã hóa albumin huyết thanh người và trình tự bazơ mã hóa albumin huyết thanh người có thể được liên kết với đầu tận cùng 5' của trình tự cơ sở mã hóa Slit3 LRRD2 để tạo ra xystatin S-HSA-Slit3 LRRD.

Trong phân tử axit nucleic theo sáng chế, xystatin S có nguồn gốc từ người và có thể được sử dụng làm trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ bao gồm

141 axit amin hoặc một phần trình tự axit amin của chúng. Trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ của xystatin S được công bố trong Ngân hàng gen NCBI (NCBI GenBank): EAX10135.1, và theo một phương án được lấy làm ví dụ của sáng chế, trong xystatin S có chiều dài đầy đủ bao gồm 141 axit amin, trình tự bazơ mã hóa đoạn bao gồm axit amin thứ 1 đến thứ 20 được sử dụng. Trong phân tử axit nucleic theo sáng chế, cystatin S là trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 sau đây.

MARPLCTLLLLMATLAGALA (SEQ ID NO: 1).

Sáng chế cũng đề xuất vector tái tổ hợp bao gồm trình tự cơ sở mã hóa protein dung hợp và trình tự khởi đầu được liên kết chức năng với trình tự cơ sở.

Thuật ngữ "liên kết chức năng" có nghĩa là được liên kết chức năng giữa trình tự điều hòa biểu hiện axit nucleic (một mảng của trình tự khởi đầu, trình tự tín hiệu hoặc vị trí liên kết yếu tố điều hòa phiên mã) và trình tự bazơ thứ cấp, và trình tự điều hòa biểu hiện ảnh hưởng đến quá trình phiên mã và/hoặc sự dịch mã của các axit nucleic tương ứng với trình tự thứ cấp.

Hệ thống vector theo sáng chế có thể được điều chế bằng phương pháp đã biết trong tình trạng kỹ thuật đã biết như được mô tả trong tài liệu [Sambrook và cộng sự, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)].

Nói chung, vector có thể được điều chế cho mục đích nhân bản hoặc mục đích biểu hiện. Hơn nữa, vector có thể được điều chế để sử dụng trong các tế bào vật chủ nhân thực hoặc nhân sơ. Ví dụ, khi vector được điều chế để biểu hiện trong tế bào nhân sơ, vector này bao gồm trình tự khởi đầu mạnh để bắt đầu phiên mã (ví dụ, trình tự khởi đầu pLλ, trình tự khởi đầu trp, trình tự khởi đầu lac, trình tự khởi đầu tac và trình tự khởi đầu T7), ribosom vị trí liên kết hoặc trình tự để bắt đầu dịch mã và dừng phiên mã / dịch mã. Cụ thể là, khi *E. coli* được sử dụng như một tế bào chủ, để sinh tổng hợp tryptophan ở *E. coli*, trình tự khởi đầu và một chất điều khiển trong operon (Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158: 1018-1024 (1984)) và trình tự khởi đầu hướng trái của thực khuẩn λ (trình tự khởi đầu

pL λ , Herskowitz, I. và Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14: 399-445 (1980)) có thể được sử dụng làm trình tự điều hòa. Khi *Bacillus* được sử dụng làm tế bào chủ, trình tự khởi đầu cho gen mã hóa protein độc tố của *Bacillus thuringiensis* (Appl. Environ. Microbiol. 64: 3932-3938 (1998); and Mol. Gen. Genet. 250: 734-741 (1996)) hoặc trình tự khởi đầu có thể hoạt động khác trong *Bacillus* có thể được sử dụng như một trình tự điều chỉnh.

Nhiều vector điển hình có sẵn cho tế bào nhân sơ đã được biết đến với những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực này, và việc lựa chọn một vector phù hợp là một vấn đề cần lựa chọn. Vector điển hình được sử dụng trong sáng chế này bao gồm pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8 / 9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, chuỗi pGEX, chuỗi pET, pUC19, λ gt⁺ 4 λ B, λ -charon, λ Δ z1 và M13 và không nhất thiết bị giới hạn ở đó.

Ví dụ, khi một vector được điều chế cho tế bào chủ sinh vật nhân chuẩn, trong số chúng, trình tự khởi đầu có nguồn gốc từ bộ gen của tế bào động vật hoặc tế bào động vật có vú (ví dụ, trình tự khởi đầu metallothionein) (metallothionein là nhóm protein mang kim loại) hoặc virus ở động vật có vú (ví dụ, trình tự khởi đầu muện adenovirus; trình tự khởi đầu 7.5 K của vaccinia, trình tự khởi đầu SV40, trình tự khởi đầu cytomegalovirus và trình tự khởi đầu tk của HSV) có thể được sử dụng. Vector nói chung bao gồm polyadenyl hóa vị trí của một phiên mã. Ví dụ về vector dựa trên virus thương mại có sẵn trên thị trường bao gồm pcADN 3 (Invitrogen; bao gồm trình tự khởi đầu cytomegalovirus và tín hiệu polyadenyl hóa), pSI (Promega; bao gồm trình tự khởi đầu SV 40 và tín hiệu polyadenyl hóa), pCI (Promega; bao gồm trình tự khởi đầu cytomegalovirus và tín hiệu polyadenyl hóa), và pREP7 (Invitrogen; bao gồm trình tự khởi đầu RSV và tín hiệu polyadenyl hóa SV 40).

Khi một vector được điều chế cho nấm men, các trình tự khởi đầu của các gen cho photphoglycerat kinaza, glyceraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, lactaza, enolaza và rượu khử nước có thể được sử dụng làm trình tự điều hòa.

Khi một vectơ biểu hiện được điều chế cho tế bào thực vật, có thể sử dụng các trình tự khởi đầu chức năng thực vật khác nhau được biết đến trong tình trạng kỹ thuật đã biết, và bao gồm trình tự khởi đầu 35S của virus khảm súp lơ (CaMV), trình tự khởi đầu 35S của virus khảm lộn, trình tự khởi đầu của virus trực khuẩn mía, trình tự khởi đầu của virus vằn hoa Comerina vàng, trình tự khởi đầu cảm ứng ánh sáng từ tiểu đơn vị của ribuloza-1,5-bis-phosphat cacboxylaza (ssRUBISCO), trình tự khởi đầu triosephosphat isomerase isomerase (TPI) của tế bào gạo, trình tự khởi đầu adenin phosphoribosyltransferase (APRT) từ cây *Arabidopsis*, trình tự khởi đầu gen actin 1 ở cây lúa và các trình tự khởi đầu tổng hợp mannopin và octopin.

Ngoài ra, vectơ tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm trình tự bazơ có khả năng dễ dàng phân tách một protein dung hợp biểu hiện và bao gồm, nhưng không giới hạn, glutathion S-transferase (Pharmacia, USA), protein liên kết với maltoza (NEB, USA), FLAG (IBI, USA) và 6X His (hexahistidin; Qiagen, USA). Các protein dung hợp được biểu hiện bằng một trình tự bổ sung như vậy có thể được phân tách bằng sắc ký ái lực một cách nhanh chóng và thuận tiện.

Theo một phương án cụ thể được lấy làm ví dụ của sáng chế này, trình tự FLAG đã được sử dụng và protein FLAG bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 4. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4 như sau:

DYKDDDDK (SEQ ID NO: 4).

Theo một phương án được lấy làm ví dụ khác của sáng chế này, protein dung hợp được phân tách bằng sắc ký ái lực. Ví dụ, trong trường hợp của glutathion S-transferase, chất đệm rửa giải bao gồm glutathion được sử dụng và khi 6X His được sử dụng để tách protein ngoại lai, nhựa liên kết Ni-NTA His (Novagen, USA) được sử dụng.

Vectơ biểu hiện của sáng chế này tốt nhất là bao gồm một hoặc nhiều điểm đánh dấu có khả năng chọn vật chủ đã biến đổi và các ví dụ của chúng bao gồm các gen kháng lại thuốc kháng sinh như ampicillin, gentamixin, chloramphenicol, streptomycin,

kanamycin, neomycin, genetixin và tetracyclin, gen URA3, và gen có khả năng chống lại các hợp chất độc hại khác như các ion kim loại.

Sáng chế này cũng đề xuất chất biến đổi bao gồm vector tái tổ hợp như được mô tả ở trên.

Vật chủ hữu ích để điều chế chất biến đổi được biết đến trong tình trạng kỹ thuật đã biết. Ví dụ, có thể sử dụng vật chủ nhân sơ là *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* và các loài *Pseudomonas* khác nhau, *Corynebacterium* và *Streptomyces*.

Trong tế bào nhân thực, nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*), tế bào côn trùng, tế bào người (ví dụ, CHO, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN and dòng tế bào MDCK) và tế bào soma thực vật có thể được sử dụng.

Sự biến đổi của tế bào chủ có thể được thực hiện bằng một số phương pháp được biết đến trong tình trạng kỹ thuật đã biết. Ví dụ, khi tế bào nhân sơ được sử dụng làm tế bào chủ, phương pháp CaCl_2 , phương pháp Hanson (Cohen, SN và cộng sự, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9: 2110-2114 (1973); và Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166: 557-580 (1983)) và điện di có thể được sử dụng để biến đổi. Hơn nữa, khi các tế bào nhân thực được sử dụng làm tế bào chủ, vi tiêm, kết tủa canxi photphat, sốc điện, nhiễm trùng kiểu hình qua trung gian liposom, xử lý DEAE-dextran và bắn phá hạt có thể được sử dụng để biến đổi. Ngoài ra, khi các tế bào thực vật được sử dụng làm tế bào chủ, phương pháp biến đổi qua trung gian *Agrobacterium* là phương pháp thích hợp nhất, lý do là cho phép vòng lặp cần thiết để tái phân biệt các cây lân cận khỏi chất nguyên sinh.

Sáng chế này cũng đề xuất phương pháp sản xuất protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2. Phương pháp này bao gồm (a) nuôi cấy chất biến đổi như được mô tả ở trên trong các điều kiện để biểu hiện; và (b) thu nhận protein dung hợp được tạo ra.

Chất biến đổi để điều chế protein dung hợp theo sáng chế này có thể được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường thích hợp và các điều kiện nuôi cấy được biết đến trong tình trạng kỹ thuật đã biết. Các quy trình nuôi cấy này có thể dễ dàng được điều chỉnh và sử dụng bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này theo chủng đã được chọn. Nuôi cấy tế bào được phân loại thành nuôi cấy huyền phù và nuôi cấy kết dính tùy thuộc vào phương pháp phát triển tế bào, và theo loại nuôi cấy theo lô, loại nuôi cấy bán chu kỳ và loại nuôi cấy liên tục tùy thuộc vào phương pháp nuôi cấy. Môi trường được sử dụng để nuôi cấy cần phải đáp ứng một cách thích hợp các yêu cầu của chủng cụ thể.

Môi trường được sử dụng để nuôi cấy tế bào động vật chứa các nguồn cacbon, nguồn nitơ và các thành phần nguyên tố vi lượng khác nhau. Ví dụ về nguồn cacbon có thể được sử dụng bao gồm cacbohydrat như glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột và xenluloza, chất béo như dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu gai dầu và dầu dừa, các axit béo như axit palmitic, stearic axit và axit linoleic, rượu như glycerol và etanol, và các axit hữu cơ như axit axetic. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc hỗn hợp. Ví dụ về nguồn nitơ có thể được sử dụng bao gồm các nguồn nitơ hữu cơ như pepton, dịch chiết nấm men, nước thịt, dịch chiết mạch nha, chất lỏng ngâm ngô (CSL) và bột đậu nành và các nguồn nitơ vô cơ như urê, amoni sulfat, amoni clorua, amoni photphat, amoni cacbonat và amoni nitrat. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc hỗn hợp. Môi trường có thể bao gồm kali dihydro photphat, kali hydro photphat và muối chứa natri tương ứng làm nguồn photpho. Hơn nữa, môi trường có thể bao gồm muối kim loại như magie sunfat hoặc sắt sunfat. Ngoài những chất nêu trên, các axit amin, vitamin, tiền chất thích hợp, và những chất tương tự có thể được bao gồm.

Trong quá trình nuôi cấy, độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng cách thêm hợp chất như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit photphoric và axit sulfuric vào sản phẩm nuôi cấy. Hơn nữa, sự hình thành bọt có thể được ngăn chặn

bằng cách sử dụng chất khử bọt như este polyglycol axit béo. Ngoài ra, để duy trì trạng thái hiếu khí của quá trình nuôi cấy, oxy hoặc khí có chứa oxy (ví dụ, không khí) được đưa vào môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy thường là 20°C đến 45°C, tốt nhất là 25°C đến 40°C.

Trong phương pháp sản xuất protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 theo sáng chế này, việc thu nhận protein dung hợp được tạo ra ở bước (b) có thể được thực hiện để thu nhận protein dung hợp ở dạng tách biệt. Ví dụ, khi protein dung hợp được biểu hiện bởi một lượng lớn vi khuẩn đã biến đổi, thì protein dung hợp thường được biểu hiện sau khi cảm ứng trình tự khởi đầu, nhưng sự biểu hiện vẫn tiếp tục và protein tạo thành kết tủa không hòa tan (nghĩa là phần thân thể vùi). Có một số giao thức phù hợp để tách phần thân thể vùi. Protein dung hợp đã tạo thành phần thân thể vùi có thể được cải tạo thông qua pha loãng hoặc thẩm tách bằng cách sử dụng chất đệm thích hợp. Và sau đó, protein dung hợp có thể được tinh chế bằng phương pháp cơ bản đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật đã biết bao gồm phân mảnh độ hòa tan bằng cách sử dụng amoni sulfat, lọc chênh lệch kích thước (siêu lọc) và sắc ký cột (tùy thuộc vào kích thước, điện tích bề mặt thực, tính kỵ nước hoặc ái lực).

Protein dung hợp theo sáng chế này có thể được biểu hiện ở thực vật. Tế bào thực vật có thể được biến đổi bằng một phương pháp điển hình đã biết trong lĩnh vực này, và có thể được biến đổi bằng cách sốc điện, bắn phá hạt và biến đổi do vi khuẩn *Agrobacterium* gây ra. Trong số đó, sự biến đổi do vi khuẩn *Agrobacterium* gây ra được ưu tiên hơn cả. Sự biến đổi do vi khuẩn *Agrobacterium* thường có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các lát lá và các mô khác như lá mầm và hypocotyl.

Các tế bào đã biến đổi có thể được chọn bằng cách cho môi trường nuôi cấy đã biến đổi tiếp xúc với chế phẩm đã chọn như chất ức chế trao đổi chất, kháng sinh và thuốc diệt cỏ. Khi tế bào được biến đổi và biểu hiện ổn định gen đánh dấu có khả năng kháng với gen đã chọn, các tế bào sẽ phát triển và biệt hóa trong quá trình nuôi cấy. Ví dụ, điểm

đánh dấu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gen kháng glycoposphat và hệ thống neomycin phototransferaza (nptII). Sự phát triển hoặc sự phân hóa lại của thực vật từ các nguyên bào thực vật hoặc các vật liệu ngoại lai khác nhau đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật đã biết. Các chồi rễ biến đổi thu được sẽ được cấy trong môi trường phát triển thực vật thích hợp. Sự phát triển hoặc tái phân hóa của thực vật bao gồm các gen ngoại lai do vi khuẩn *Agrobacterium* gây ra có thể được thực hiện bằng các phương pháp được biết đến trong tình trạng kỹ thuật đã biết.

Sáng chế này đề xuất chế phẩm được bao gồm LRRD2 liên kết với albumin của protein Slit3 để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh về cơ.

Chế phẩm được theo sáng chế này có thể ở dạng các bào chế khác nhau bằng đường uống hoặc đường tiêm. Khi chế phẩm được được bào chế, chế phẩm có thể được điều chế bằng cách sử dụng chất đệm (ví dụ, dung dịch muối hoặc PBS), chất chống oxy hóa, chất kìm khuẩn, chất tạo chelat (ví dụ, EDTA hoặc glutathion), chất độn, chất chất kéo dài, chất kết dính, chất hỗ trợ (ví dụ, nhôm hydroxit), chất tạo huyền phù, chất làm đặc, chất làm ướt, chất phân huỷ hoặc chất hoạt động bề mặt, chất pha loãng hoặc tá dược.

Ví dụ về chế phẩm dạng rắn dùng để uống bao gồm viên nén, thuốc viên, bột, hạt, viên nang, và các loại tương tự, và chế phẩm dạng rắn được điều chế bằng cách trộn một hoặc nhiều hợp chất với một hoặc nhiều tá dược, ví dụ, tinh bột (bao gồm tinh bột ngô, tinh bột mì, tinh bột gạo, tinh bột khoai tây và các loại tương tự), canxi cacbonat, sucroza, lactoza, dextroza, sorbitol, mannitol, xylitol, erythritol maltitol, xenluloza, metyl xenluloza, natri cacboxymetylxenluloza và hydroxypropymetyl-xenluloza, gelatin, hoặc loại tương tự.

Ví dụ, viên nén hoặc viên đường có thể thu được bằng cách trộn thành phần hoạt tính với tá dược dạng rắn, nghiền hỗn hợp thu được, thêm chất phụ trợ thích hợp vào đó, và sau đó chế biến hỗn hợp thu được thành hỗn hợp dạng hạt.

Hơn nữa, ngoài tá dược đơn giản, chất làm trơn như magnesi stearat và tan cũng được sử dụng. Chế phẩm dạng lỏng để uống tương ứng với chất huyền phù, chất lỏng dùng trong, nhũ tương, xirô, và các chất tương tự, và chế phẩm dạng lỏng có thể bao gồm, ngoài nước và parafin lỏng là những chất pha loãng đơn giản thường được sử dụng, khác nhau tá dược, ví dụ, chất làm ướt, chất tạo ngọt, chất tạo mùi, chất bảo quản, và những chất tương tự. Ngoài ra, trong một số trường hợp, polyvinyl pyrrolidon liên kết chéo, thạch, axit alginic, natri alginat hoặc chất tương tự có thể được thêm vào làm chất phân rã và chất chống đông máu, chất làm trơn, chất làm ướt, chất tạo hương vị, chất nhũ hóa, chất khử trùng, và những chất tương tự có thể được thêm vào.

Ví dụ về chế phẩm dùng để tiêm bao gồm dung dịch vô trùng trong nước, dung môi không chứa nước, dung môi huyền phù, nhũ tương, chế phẩm đông khô, thuốc đạn, hoặc loại tương tự. Là dung môi không chứa nước và dung môi huyền phù, có thể sử dụng propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu ô liu, este tiêm như etyl oleat, và các loại tương tự. Như là cơ sở của thuốc đạn, có thể sử dụng Witepsol, Macrogol, Tween 61, bơ cacao, chất béo laurin, glyxerol, gelatin, và các chất tương tự.

Chế phẩm được theo sáng chế này có thể được sử dụng bằng đường uống hoặc đường tiêm, và khi sử dụng bằng đường tiêm, có thể được bào chế dưới dạng chế phẩm để bôi ngoài da; mũi tiêm được sử dụng trong phúc mạc, trực tràng, tiêm tĩnh mạch, cơ bắp, tiêm dưới da, hoặc trong não tuỷ, hoặc qua đường tiêm trong cổ tử cung; chất dùng dưới da; hoặc ống xông mũi theo phương pháp được biết đến tình trạng kỹ thuật đã biết.

Thuốc tiêm phải được khử trùng và tránh bị nhiễm vi sinh vật như vi khuẩn và nấm. Ví dụ về chất mang thích hợp cho việc tiêm có thể là, nhưng không giới hạn ở, dung môi hoặc môi trường phân tán bao gồm nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol lỏng, và các loại tương tự), hỗn hợp của chúng, và / hoặc dầu thực vật. Tốt hơn, là chất mang thích hợp, có thể sử dụng dung dịch đẳng trương như dung dịch Hank, dung dịch Ringer, nước muối đệm photphat có chứa trietanolamin (PBS)

hoặc nước vô trùng để tiêm, 10% etanol, 40% propylen glycol, và 5 % dextroza và chất tương tự. Để bảo vệ vết tiêm khỏi bị nhiễm vi sinh vật, có thể bổ sung các chất kháng khuẩn và chất chống nấm khác nhau như paraben, clorobutanol, phenol, axit sorbic và thimerosal. Hơn nữa, trong hầu hết các trường hợp, thuốc tiêm có thể bổ sung chất đẳng trương như đường hoặc natri clorua.

Ví dụ về tác nhân dùng qua da bao gồm dạng chẳng hạn như thuốc mỡ, kem, dầu bôi ngoài da, gel, dung dịch để sử dụng bên ngoài, thuốc dán, thuốc bôi và bình xịt. Việc sử dụng qua da như được mô tả ở trên có nghĩa là một lượng hữu hiệu của thành phần hoạt tính có trong chế phẩm được đưa vào da thông qua việc sử dụng cục bộ của nó.

Trong trường hợp điều chế dùng cho đường hô hấp, protein dung hợp được sử dụng theo sáng chế này có thể được phân phối thuận tiện dưới dạng phun khí dung từ gói điều áp hoặc máy phun sương bằng cách sử dụng chất đẩy thích hợp, ví dụ, dichlorofluorometan, trichlorofluorometan, dichlorotetrafluoroetan, cacbon dioxit, hoặc các loại khí thích hợp khác. Trong trường hợp bình xịt có áp suất, đơn vị liều lượng có thể được xác định bằng bố trí một van để chuyển một lượng đã được định lượng. Ví dụ, viên nang gelatin và hộp đựng để sử dụng trong ống hít hoặc bình xịt có thể được bào chế để chứa hỗn hợp bột của hợp chất và chất nền bột thích hợp như lactoza hoặc tinh bột. Các chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa như được mô tả trong tài liệu, là sách hướng dẫn thường được biết đến trong tất cả các lĩnh vực hóa dược (Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour).

Dược phẩm theo sáng chế này được sử dụng với lượng được dụng. Thuật ngữ "lượng hữu hiệu được dụng" như được sử dụng ở đây đề cập đến lượng đủ để điều trị bệnh với tỷ lệ lợi ích/rủi ro hợp lý có thể áp dụng cho điều trị y tế và liều dùng hiệu quả có thể được xác định theo các yếu tố bao gồm loại bệnh của bệnh nhân, mức độ nghiêm trọng bệnh tật, hoạt tính của thuốc, độ nhạy cảm với thuốc, thời gian dùng thuốc, đường

dùng, tốc độ bài tiết, thời gian điều trị và các loại thuốc được sử dụng đồng thời, và các yếu tố khác được biết đến trong lĩnh vực y tế. Dược phẩm theo sáng chế này có thể được sử dụng như chất điều trị riêng lẻ hoặc kết hợp với các chất điều trị khác, có thể được sử dụng một cách tuần tự hoặc đồng thời với các tác nhân điều trị trong lĩnh vực liên quan, và có thể được sử dụng với một liều duy nhất hoặc nhiều liều. Nghĩa là, tổng lượng hữu hiệu của chế phẩm theo sáng chế này có thể được sử dụng cho một bệnh nhân với một liều duy nhất hoặc có thể được sử dụng theo một quy trình điều trị được phân đoạn, trong đó nhiều liều được sử dụng trong một thời gian dài. Điều quan trọng là sử dụng chế phẩm với một lượng tối thiểu để có thể đạt được hiệu quả tối đa mà không có bất kỳ tác dụng phụ nào, có xem xét đến tất cả các yếu tố đã nói ở trên và lượng này có thể dễ dàng được xác định bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Liều dùng của dược phẩm theo sáng chế này thay đổi tùy theo trọng lượng cơ thể, tuổi, giới tính và tình trạng sức khỏe của bệnh nhân, tuổi của bệnh nhân, chế độ ăn uống, thời gian sử dụng, phương pháp sử dụng, tỷ lệ bài tiết và mức độ nghiêm trọng của bệnh tật. Liều dùng hàng ngày của chúng có thể được sử dụng qua đường tiêm với số lượng tốt nhất là 0,01 đến 50 mg, và tốt hơn là 0,1 mg đến 30 mg trên 1 kg trọng lượng cơ thể một ngày dựa trên HSA-Slit3 LRRD2, và liều hàng ngày của chúng có thể được sử dụng bằng đường uống ở một liều duy nhất hoặc nhiều liều với lượng tốt nhất là từ 0,01 đến 100 mg, và tốt hơn là từ 0,01 đến 10 mg trên 1 kg trọng lượng cơ thể một ngày dựa trên HSA-Slit3 LRRD2 theo sáng chế này. Tuy nhiên, vì lượng hữu hiệu có thể tăng hoặc giảm tùy thuộc vào đường dùng, mức độ nghiêm trọng của bệnh béo phì, giới tính, trọng lượng cơ thể, tuổi tác, và tương tự, nên liều dùng không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế này theo bất kỳ cách nào.

Dược phẩm theo sáng chế này có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp với phẫu thuật, xạ trị, liệu pháp hormon, hóa trị và các phương pháp sử dụng chất điều chỉnh phản ứng sinh học.

Dược phẩm theo sáng chế này cũng có thể được điều chế dưới dạng chế phẩm để sử dụng bên ngoài. Khi dược phẩm để phòng ngừa và điều trị bệnh về cơ theo sáng chế này được sử dụng như chế phẩm để bôi ngoài da, dược phẩm có thể chứa thêm các chất phụ trợ thường được sử dụng trong lĩnh vực da liễu, chẳng hạn như bất kỳ thành phần nào khác thường được sử dụng trong quá trình điều chế cho sử dụng bên ngoài cho da, chẳng hạn như chất béo, dung môi hữu cơ, chất hòa tan, chất làm đặc và chất tạo keo, chất làm mềm, chất chống oxy hóa, chất tạo huyền phù, chất ổn định, chất tạo bọt, chất tạo mùi, chất hoạt động bề mặt, nước, chất nhũ hóa ion, chất nhũ hóa không ion, chất điện, chất chặn ion kim loại, chất tạo chelat, chất bảo quản, vitamin, chất ngăn chặn, chất làm ướt, tinh dầu, chất nhuộm, chất màu, chất hoạt tính ưa nước, chất hoạt tính ưa béo, hoặc túi lipid. Ngoài ra, các thành phần có thể được giới thiệu với một lượng thường được sử dụng trong lĩnh vực da liễu.

Khi dược phẩm để phòng ngừa và điều trị bệnh về cơ theo sáng chế này được điều chế dưới dạng chế phẩm để bôi ngoài da, dược phẩm có thể ở chế phẩm như thuốc mỡ, miếng dán, gel, kem và bình xịt, nhưng không giới hạn ở đó.

Bệnh về cơ theo sáng chế này được ưu tiên là bệnh về cơ do suy giảm chức năng cơ, suy giảm cơ hoặc thoái hóa cơ và là loại bệnh được biết đến trong tình trạng kỹ thuật đã biết, và cụ thể là bệnh về cơ được ưu tiên theo sáng chế này là một hoặc nhiều bệnh được lựa chọn từ nhóm bao gồm bệnh mất trương lực cơ, teo cơ, loạn dưỡng cơ, thoái hóa cơ, nhược cơ, hội chứng suy giảm cơ bắp (thiếu cơ), nhưng bệnh về cơ không bị giới hạn ở đó.

Sự hao mòn cơ hoặc thoái hóa cơ xảy ra vì những lý do như các yếu tố bẩm sinh, các yếu tố mắc phải và lão hóa, và sự hao mòn cơ được đặc trưng bởi sự mất dần khối lượng cơ và làm suy yếu và thoái hóa cơ, đặc biệt là cơ xương hoặc cơ có chủ ý, và cơ tim.

Cụ thể là, cơ liên quan một cách toàn diện đến gân, cơ và dây chằng, và chức năng cơ hoặc chức năng của cơ bắp có nghĩa là khả năng tạo ra một lực bằng cách co cơ, và bao gồm: sức mạnh cơ bắp trong đó cơ có thể phát huy tác dụng lực co lại tối đa để có thể chịu được lực cản; sức bền cơ bắp là khả năng thể hiện thời gian hoặc bao nhiêu lần cơ có thể lặp lại sự co và thả lỏng với một khối lượng nhất định; và tính nhanh nhẹn là khả năng tạo ra một lực mạnh trong một khoảng thời gian ngắn. Chức năng cơ tỷ lệ thuận với khối lượng cơ và thuật ngữ “cải thiện chức năng cơ” dùng để chỉ sự cải thiện chức năng cơ theo hướng tích cực hơn.

Sáng chế này cũng đề xuất chế phẩm thực phẩm chức năng tốt cho sức khỏe bao gồm LRRD2 liên kết với albumin của protein Slit3 để phòng ngừa hoặc giảm bớt bệnh về cơ. Vì thành phần của hoạt chất có trong chế phẩm thực phẩm chức năng tốt sức khỏe theo sáng chế này và tác dụng của chúng cũng giống như thành phần đối với dược phẩm như đã được mô tả ở trên, nên phần mô tả của chúng sẽ bị bỏ qua.

Chế phẩm thực phẩm chức năng tốt cho sức khỏe theo sáng chế này có thể được điều chế ở nhiều dạng khác nhau bằng các phương pháp điển hình đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật đã biết. Thực phẩm thông thường có thể được chế biến bằng cách thêm protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 theo sáng chế này vào, nhưng không giới hạn ở đó, đồ uống (bao gồm cả đồ uống có cồn), trái cây và thực phẩm chế biến sẵn của chúng (ví dụ: trái cây đóng hộp, thực phẩm đóng chai, mứt, mứt cam và các loại tương tự), cá, thịt và thực phẩm chế biến của chúng (ví dụ: giăm bông, xúc xích, thịt bò bắp và các loại tương tự), bánh mì và mì (ví dụ: mì sợi nhỏ, mì kiểu mạch, mì ăn liền, mì Ý, mì ống và các loại tương tự), nước ép trái cây, các loại đồ uống khác nhau, bánh quy, gluten lúa mì, các sản phẩm từ sữa (ví dụ: bơ, pho mát và các loại tương tự), dầu thực vật ăn được, bơ thực vật, protein thực vật, thực phẩm đóng túi nấu, thực phẩm đông lạnh và các loại gia vị khác nhau (ví dụ: tương đậu nành, nước tương, nước sốt, và các loại tương tự), và tương

tự. Ngoài ra, chất bổ sung dinh dưỡng có thể được điều chế bằng cách thêm protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 theo sáng chế này vào, nhưng không bị giới hạn ở, viên nang, dạng viên, viên nén và các loại tương tự. Hơn nữa, đối với thực phẩm chức năng tốt sức khỏe, ví dụ, protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 theo sáng chế này được điều chế dưới dạng, không bị giới hạn ở trà, nước trái cây và đồ uống và có thể được thực hiện bằng cách chế biến thành chất lỏng, hạt, viên nang và bột để có thể uống được (đồ uống tốt cho sức khỏe). Hơn nữa, protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 theo sáng chế này có thể được sử dụng và điều chế ở dạng bột hoặc chất lỏng đậm đặc để được sử dụng ở dạng phụ gia thực phẩm. Ngoài ra, chế phẩm chức năng thực phẩm theo sáng chế này có thể được điều chế dưới dạng chế phẩm bằng cách trộn protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 theo sáng chế này với thành phần hoạt tính được biết là có tác dụng phòng ngừa bệnh về cơ và cải thiện chức năng cơ.

Khi protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 theo sáng chế này được sử dụng làm đồ uống tốt cho sức khỏe, chế phẩm đồ uống tốt cho sức khỏe có thể chứa các chất tạo hương vị khác nhau hoặc cacbohydrat tự nhiên và tương tự như các thành phần bổ sung, chẳng hạn như đồ uống thông thường. Các loại cacbohydrat tự nhiên như được mô tả ở trên có thể là các monosacarit như glucoza và fructoza; disacarit như maltoza và sucroza; polysacarit như dextrin và xyclodextrin; và rượu đường như xylitol, sorbitol và erythritol. Là chất tạo ngọt, có thể sử dụng chất tạo ngọt tự nhiên như thaumatin và chiết xuất từ cây cỏ ngọt; chất tạo ngọt tổng hợp như sacarin và aspartame, và chất tương tự. Tỷ lệ của cacbohydrat tự nhiên nói chung là khoảng từ 0,01 đến 0,04 g, và tốt nhất là khoảng từ 0,02 đến 0,03 g trên 100 mL chế phẩm theo sáng chế này.

Hơn nữa, protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 theo sáng chế này có thể được chứa dưới dạng thành phần hoạt tính của chế phẩm thực phẩm để phòng ngừa bệnh về cơ và cải thiện chức năng cơ, và lượng của nó là lượng hữu hiệu để đạt được tác dụng phòng ngừa bệnh về cơ và cải thiện chức năng cơ bắp và không bị giới hạn cụ thể nào, nhưng

tốt nhất là từ 0,01 đến 100% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của toàn bộ chế phẩm. Chế phẩm thực phẩm chức năng tốt cho sức khỏe theo sáng chế này có thể được điều chế bằng cách trộn protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 với các thành phần hoạt tính khác được biết là có tác dụng phòng ngừa bệnh về cơ và cải thiện chức năng cơ.

Ngoài các phần nói trên, chế phẩm thực phẩm chức năng tốt cho sức khỏe theo sáng chế này có thể chứa nhiều chất dinh dưỡng, vitamin, chất điện giải, chất tạo hương, chất tạo màu, axit pectic, muối của axit pectic, axit alginic, muối của axit alginic, axit hữu cơ, chất tạo đặc bảo vệ, chất điều chỉnh độ pH, chất ổn định, chất bảo quản, glycerin, rượu, chất cacbonat và các chất tương tự. Ngoài ra, thực phẩm tốt cho sức khỏe theo sáng chế này có thể chứa thịt để chế biến nước trái cây tự nhiên, đồ uống nước hoa quả hoặc đồ uống thực phẩm. Những thành phần này có thể được sử dụng một mình hoặc trong hỗn hợp của chúng. Tỷ lệ của các chất phụ gia này không quan trọng đáng kể, nhưng thường được chọn trong phạm vi từ 0,01 đến 0,1 phần khối lượng trên 100 phần khối lượng của chế phẩm theo sáng chế này.

Ngoài ra, sáng chế này đề xuất chế phẩm mỹ phẩm chứa protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 để cải thiện chức năng cơ. Vì thành phần của thành phần hoạt tính có trong chế phẩm mỹ phẩm theo sáng chế này và tác dụng của chúng giống như thành phần đối với chế phẩm dược như đã được mô tả ở trên, phần mô tả của nó sẽ bị bỏ qua.

Chế phẩm mỹ phẩm không có giới hạn cụ thể nào, nhưng có thể được sử dụng để bôi ngoài da.

Chế phẩm mỹ phẩm theo sáng chế này bao gồm protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 như là thành phần hoạt tính và có thể được điều chế dưới dạng chế phẩm mỹ phẩm cơ bản (kem dưỡng da, kem dưỡng, tinh chất, chất tẩy rửa như bột làm sạch và nước làm sạch, dạng gói và dầu dưỡng thể), chế phẩm mỹ phẩm màu (kem nền, son môi, mascara và lớp nền trang điểm), chế phẩm dành cho tóc (dầu gội, xả, dưỡng tóc, và gel

dưỡng tóc), xà phòng và các loại tương tự với các tá dược có thể chấp nhận được về mặt da liễu.

Tá dược có thể bao gồm, ví dụ, nhưng không giới hạn ở, chất làm mềm da, chất tăng độ thẩm thấu qua da, chất tạo màu, chất tạo mùi, chất nhũ hóa, chất làm đặc và dung môi. Hơn nữa, có thể còn bao gồm thêm chất tạo mùi thơm, chất màu, chất khử trùng, chất chống oxy hóa, chất bảo quản, chất giữ ẩm và các chất tương tự, và bao gồm chất làm đặc, muối vô cơ, vật liệu polyme tổng hợp và các chất tương tự để cải thiện tính chất vật lý. Ví dụ, khi chất tẩy rửa và xà phòng được điều chế bằng cách sử dụng chế phẩm mỹ phẩm theo sáng chế này, chất tẩy rửa và xà phòng có thể được điều chế dễ dàng bằng cách thêm protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 vào chất tẩy rửa và xà phòng điển hình. Khi điều chế kem, kem có thể được điều chế bằng cách thêm protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 vào nền kem dầu trong nước (O/W) nói chung. Có thể thêm chất tạo mùi thơm, chất tạo chelat, chất màu, chất chống oxy hóa, chất bảo quản và các chất tương tự, và các nguyên liệu tổng hợp hoặc tự nhiên như protein, khoáng chất hoặc vitamin để cải thiện các tính chất vật lý của chúng.

Hàm lượng của protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 có trong chế phẩm mỹ phẩm theo sáng chế này là, nhưng không giới hạn ở, tốt nhất là từ 0,001 đến 10% khối lượng, và tốt hơn là từ 0,01 đến 5% khối lượng, dựa trên tổng khối lượng của toàn bộ thành phần. Khi hàm lượng nhỏ hơn 0,001% khối lượng, không thể mong đợi các tác dụng mong muốn và khi hàm lượng vượt quá 10% khối lượng, có thể khó điều chế chế phẩm mỹ phẩm theo sáng chế này vì các lý do như an toàn hoặc chế phẩm.

Sáng chế này cũng đề xuất phụ gia thức ăn chăn nuôi bao gồm LRRD2 liên kết với albumin của protein Slit3 để cải thiện chức năng cơ. Vì thành phần của một hoạt chất có trong phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế này và tác dụng của chúng cũng giống như thành phần đối với dược phẩm được mô tả ở trên, nên phân mô tả của chúng sẽ bị bỏ qua.

Phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế này tương ứng với thức ăn bổ sung theo Đạo luật kiểm soát thức ăn chăn nuôi và cá.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "thức ăn chăn nuôi" có thể đề cập đến bất kỳ công thức tự nhiên hoặc nhân tạo nào, một bữa ăn và tương tự, hoặc một thành phần của một bữa ăn cho động vật ăn, uống và tiêu hóa hoặc thích hợp cho việc đó.

Loại thức ăn như được mô tả ở trên không có giới hạn cụ thể nào và có thể sử dụng thức ăn thường được sử dụng trong tình trạng kỹ thuật đã biết. Ví dụ không hạn chế về thức ăn chăn nuôi bao gồm thức ăn thực vật như ngũ cốc, rễ và trái cây, phụ phẩm chế biến thực phẩm, tảo, sợi, phụ phẩm dược phẩm, chất béo và dầu, tinh bột, bầu bí hoặc phụ phẩm ngũ cốc; và thức ăn chăn nuôi như protein, chất vô cơ, dầu mỡ, chất khoáng, protein đơn bào, sinh vật phù du hoặc thực phẩm. Những thức ăn này có thể được sử dụng một mình hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều thức ăn đó.

Ngoài ra, phụ gia thức ăn chăn nuôi cũng có thể chứa chất mang mà vật nuôi có thể chấp nhận được. Trong sáng chế này, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể được sử dụng như nó vốn có, hoặc chất mang, chất ổn định đã biết và những chất tương tự có thể được thêm vào, các chất dinh dưỡng khác nhau như vitamin, axit amin và khoáng chất, chất chống oxy hóa, các chất phụ gia khác, và những chất tương tự có thể được thêm vào, nếu cần, và dạng của chúng có thể ở trạng thái thích hợp chẳng hạn như dạng bột, hạt, viên và hỗn dịch. Khi phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế này được điều chế, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể được dành riêng cho một con vật nuôi hoặc trong hỗn hợp với thức ăn chăn nuôi.

Sáng chế này cũng đề xuất chế phẩm bao gồm LRRD2 liên kết với albumin của protein Slit3 để cải thiện thời gian bán phân hủy in vivo của LRRD2 của protein Slit3.

Sau đây, sáng chế này sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các Ví dụ. Những Ví dụ này chỉ để làm ví dụ cho sáng chế này, và người có hiểu biết thông thường trong lĩnh

vực kỹ thuật này hiểu rõ ràng là phạm vi của sáng chế này không bị giới hạn bởi các Ví dụ này.

Các từ viết tắt được sử dụng trong các Ví dụ và ý nghĩa của chúng như được thể hiện trong Bảng 1 sau đây.

Bảng 1

CL	Systemic plasma clearance - Thanh thải huyết tương toàn thân
$T_{1/2}$	Terminal half-life - Thời gian bán phân hủy cuối
V_{ss}	Steady state volume of distribution - Khối lượng phân bố ở trạng thái ổn định
IV	Intravenous - Tĩnh mạch
PO	Per oral - Dùng đường uống
C_{max}	Maximum plasma concentration observed - Nồng độ huyết tương tối đa quan sát được
T_{max}	Time to C_{max} - Thời gian dẫn đến C_{max} nồng độ huyết tương tối đa quan sát được
$AUC_{0-\infty}$	Total area under the plasma concentration time curve from zero to infinity - Toàn bộ khu vực dưới đường cong thời gian nồng độ huyết tương từ 0 đến vô cùng
AUC_{0-t}	Area under the plasma concentration time curve from zero to the last quantifiable time point - Khu vực dưới đường cong thời gian nồng độ huyết tương từ 0 đến thời điểm cuối cùng có thể định lượng được
MRT	Mean residence time - Thời gian lưu trú trung bình
BA	Estimated bioavailability - Sinh khả dụng ước tính
BQL	Below Quantification Level - Dưới mức định lượng

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Điều chế protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2

Sự biểu hiện được thực hiện bằng cách biến đổi tế bào huyền phù Expi293F với 1,6 mg/ml PC ADN3.1 vector SP xystatin S-HSA-Slit3 LRR D2-FLAG ADN. Sau khi tế bào được nuôi cấy đến 4,5 đến 5×10^6 tế bào/ml trong 125 ml huyền phù tế bào 293F và chỉ môi trường được thay thế bằng môi trường mới, quá trình chuyển nạp được thực hiện

bằng cách phản ứng 400 μ l Expifectamin với 7,5 ml (Mẫu thử A) ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, phản ứng 150 ug ADN với 7,5 ml Opti-mem (Mẫu thử B) ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó trộn Mẫu thử A và B để phản ứng Mẫu thử A và B ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Sau 24 giờ, các tế bào được xử lý bằng cách trộn chất tăng cường 1 và 2, sau đó được nuôi cấy trong 7 ngày.

Sau khi tế bào được kết tủa từ dung dịch nuôi cấy đã được nuôi cấy trong 7 ngày bằng máy ly tâm ở 4°C và 800 vòng/phút trong 20 phút, phần nổi phía trên được lọc bằng bộ lọc 0,22 μ m do công ty Corning sản xuất và sử dụng. Là một loại nhựa, nhựa chống FLAG do công ty Sigma sản xuất đã được sử dụng. 1,2 ml nhựa được sử dụng tương ứng và quá trình tinh chế được thực hiện ở 1 ml/phút ở 4°C. Dung dịch đệm giặt sử dụng Tris glyxin (TBS, pH 7,4) đã được chảy với lượng cao gấp 20 lần lượng nhựa. Để rửa giải, 200 μ l peptit FLAG do công ty Sigma-Aldrich sản xuất và 9,8 ml TBS được trộn và sử dụng, 8 phần 500 μ l mỗi phần thu được, các phân đoạn protein được thu nhận, cô đặc bằng cách thay đổi chất đệm thành DPBS, và sau đó nồng độ đã thực hiện đo.

Fig. 2 minh họa kết quả thực hiện SDS-PAGE sau khi phân lập và tinh sạch protein dung hợp bằng quy trình nêu trên, xác nhận rằng kích thước của protein dung hợp được minh họa trong Fig. 1, được điều chế trong ví dụ này, là 75 KDa.

Ví dụ 2

Xác nhận khả năng liên kết thụ thể của các dạng protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 khác nhau

2-1. Điều chế các dạng protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 khác nhau

Dựa trên phương pháp điều chế của Ví dụ 1, 12 loại protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 khác nhau đã được điều chế như thể hiện trong Bảng 2. Với vai trò như là một trình liên kết, (GGGGS) 3 (SEQ ID NO: 6) đã được sử dụng.

Bảng 2

Loại protein dung hợp	Đầu tận cùng liên kết với HSA	Có hoặc không có Trình liên kết	Loại LRRD2	Dạng cuối cùng
LRRD2-1	Đầu tận cùng N	không	Đoạn (68 a.a.)	HSA-Đoạn LRRD2
LRRD2-2	Đầu tận cùng N	Không	Trung gian (130 a.a.)	HSA-Trung gian LRRD2
LRRD2-3	Đầu tận cùng N	Không	Độ dài đầy đủ (209 a.a.)	HSA-Độ dài đầy đủ LRRD2
LRRD2-4	Đầu tận cùng N	có	Đoạn (68 a.a.)	HSA-Trình liên kết-Đoạn LRRD2
LRRD2-5	Đầu tận cùng N	có	Trung gian (130 a.a.)	HSA-Trình liên kết-Trung gian LRRD2
LRRD2-6	Đầu tận cùng N	có	Độ dài đầy đủ (209 a.a.)	HSA-Trình liên kết-Độ dài đầy đủ LRRD2
LRRD2-7	Đầu tận cùng N	không	Đoạn (68 a.a.)	Đoạn LRRD2-HSA
LRRD2-8	Đầu tận cùng C	không	Trung gian (130 a.a.)	Trung gian LRRD2-HSA
LRRD2-9	Đầu tận cùng C	không	Độ dài đầy đủ (209 a.a.)	Độ dài đầy đủ LRRD2-HSA
LRRD2-10	Đầu tận cùng C	có	Đoạn (68 a.a.)	Đoạn LRRD2-Trình liên kết-HSA
LRRD2-11	Đầu tận cùng C	có	Trung gian (130 a.a.)	Trung gian LRRD2-Trình liên kết-HSA
LRRD2-12	Đầu tận cùng C	có	Độ dài đầy đủ (209 a.a.)	Độ dài đầy đủ LRRD2-Trình liên kết-HSA

Trình tự axit amin của 12 loại protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 như được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3

Loại protein dung hợp	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
LRRD2-1	MMARPLCTLLLLMATLAGALADAHKSEVA HRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFED HVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPER NECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEG	7

	KASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVAR LSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHP DYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNL GKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQ LCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKER QIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ AALGLTSLVLYGNKITEIAKGLFDGLVSLQ LLLLNANKINCLRVNTFQDLQNLNLLSLYD NKLQTISKGLFADYKDDDDK	
LRRD2-2	MARPLCTLLLLMATLAGALADAHKSEVAH RFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDH VKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTL FGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPER NECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEG KASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVAR LSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHP DYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNL GKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQ LCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKER QIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ AALGLIVEIRLEQNSIKAIPAGAFTQYKKLKR IDISKNQISDIAPDAFQGLKSLTSLVLYGNKI TEIAKGLFDGLVSLQLLLLNANKINCLRVNT FQDLQNLNLLSLYDNKLQTISKGLFAPLQSI QTLHLAQNP DYKDDDDK	8
LRRD2-3	MARPLCTLLLLMATLAGALADAHKSEVAH RFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDH VKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTL FGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPER NECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEG KASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVAR LSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHG	9

	DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHP DYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELFQGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNL GKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQ LCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKER QIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ AALGLISCPSPCTCSNNIVDCRGKGLMEIPA NLPEGIVEIRLEQNSIKAIPAGAFTQYKKLKR IDISKNQISDIAPDAFQGLKSLTSLVLYGNKI TEIAKGLFDGLVSLQLLLLNANKINCLRVNT FQDLQNLNLLSLYDNKLQTISKGLFAPLQSI QTLHLAQNPFCVCDCHLKWADYLDNPIET SGARCSSPRRLANKRISQIKSKKFRCSYKD DDDK	
LRRD2-4	MARPLCTLLLLMATLAGALADAHKSEVAH RFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDH VKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTL FGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPER NECFLQHKDDNPPLPRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEG KASSAQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVAR LSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHP DYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELFQGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNL GKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQ LCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKER QIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ AALGLGGGGSGGGSGGGGSLTSLVLYGN KITEIAKGLFDGLVSLQLLLLNANKINCLRV NTFQDLQNLNLLSLYDNKLQTISKGLFADY KDDDDK	10
LRRD2-5	MARPLCTLLLLMATLAGALADAHKSEVAH RFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDH VKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTL FGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPER NECFLQHKDDNPPLPRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEG	11

	KASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVAR LSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHP DYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELFELGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNL GKVGSCKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQ LCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKER QIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ AALGLGGGGSGGGSGGGGSIVEIRLEQNSI KAIPAGAFTQYKKLKRIDISKNQISDIAPDAF QGLKSLTSLVLYGNKITEIAKGLFDGLVSLQ LLLNANKINCLRVNTFQDLQNLNLLSLYD NKLQTISKGLFAPLQSIQTLHLAQNP DYKDD DDK	
LRRD2-6	MARPLCTLLLLMATLAGALADAHKSEVAH RFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDH VKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTL FGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPER NECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFECCQAADKAACLLPKLDEL RDEG KASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVAR LSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHP DYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELFELGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNL GKVGSCKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQ LCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKER QIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ AALGLGGGGSGGGSGGGGSISCPSPCTCSN NIVDCRGKGLMEIPANLPEGIVEIRLEQNSIK AIPAGAFTQYKKLKRIDISKNQISDIAPDAFQ GLKSLTSLVLYGNKITEIAKGLFDGLVSLQL LLLNANKINCLRVNTFQDLQNLNLLSLYDN KLQTISKGLFAPLQSIQTLHLAQNP FVCDCH LKWLADYLQDNPIETSGARCSSPRRLANKRI SQIKSKKFRCSDYKDDDDK	12
LRRD2-7	MARPLCTLLLLMATLAGALATSLVLYGNK ITEIAKGLFDGLVSLQLLLLNANKINCLRVN TFQDLQNLNLLSLYDNKLQTISKGLFADAH	13

	KSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQ CPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCD KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAK QEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVM CTAHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDE LRDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHT ECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSK LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSL AADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEY ARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAA DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVE VSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLS VVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNR RPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICT LSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLK AVMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGLGGGGSGGGGSGGGGSDY KDDDDK	
LRRD2-8	MARPLCTLLLLMATLAGALAI VEIRLEQNSI KAIPAGAFTQYKKLKRIDISKNQISDIAPDAF QGLKSLTSLVLYGNKITEIAKGLFDGLVSLQ LLLLNANKINCLRVNTFQDLQNLNLLSLYD NKLQTISKGLFAPLQSIQTLHLAQNPDAHKS EVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCP FEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKS LHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ EPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELL FFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAW AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTE CCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKL KECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLA ADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYA RRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAAD PHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF QLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV SRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSV VLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRR PCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS EKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAV MDDFAAFVEKCKCKADDKETCFAEEGKKLV AASQAALGLGGGGSGGGGSGGGGSDYKD DDDK	14
LRRD2-9	MARPLCTLLLLMATLAGALAI SCSPCTCSN NIVDCRGKGLMEIPANLPEGIVEIRLEQNSIK AIPAGAFTQYKKLKRIDISKNQISDIAPDAFQ	15

	GLKSLTSLVLYGNKITEIAKGLFDGLVSLQL LLLNANKINCLRVNTFQDLQNLNLLSLYDN KLQTISKGLFAPLQSIQTLHLAQNPFCVCDCH LKWLADYLQDNPIETSGARCSSPRRLANKRI SQIKSKKFRCSDAHKSEVAHRFKDLGEENF KALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEF AKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVAT LRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDD NPNLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKY LYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAAFTECC QAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRL KCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEF AEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRA DLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCI AEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNY AEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRL AKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKP LVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALVR YTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKH PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVE LVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGG SGGGGSGGGGSDYKDDDDK	
LRRD2-10	MARPLCTLLLLMATLAGALALTSVLVLYGNK ITEIAKGLFDGLVSLQLLLLNANKINCLRVN TFQDLQNLNLLSLYDNKLQTISKGLFAGGG <u>GSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEE</u> NFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVT EFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTV ATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLK KYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAAFTE CCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQ RLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAE EFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKS HCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDE FKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKC CKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK TPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTA LVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEK CKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLG GGGSGGGGSGGGGSDYKDDDDK	16

LRRD2-11	MARPLCTLLLLMATLAGALAIVEIRLEQNSI KAIPAGAFTQYKKLKRIDISKNQISDIAPDAF QGLKSLTSLVLYGNKITEIAKGLFDGLVSLQ LLLLNANKINCLRVNTFQDLQNLNLLSLYD NKLQTISKGLFAPLQSIQTLHLAQNP <u>GGGGS</u> <u>GGGSGGGGSD</u> AHKSEVAHRFKDLGEENF KALVLIIFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEF AKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVAT LRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDD NPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKY LYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC QAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRL KCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRA DLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCI AEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNY AEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRL AKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKP LVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVR YTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKH PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVE LVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKK ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGG SGGGGSGGGGSDYKDDDDK	17
LRRD2-12	MARPLCTLLLLMATLAGALAI SC SPCTCSN NIVDCRGKGLMEIPANLPEGIVEIRLEQNSIK AIPAGAFTQYKKLKRIDISKNQISDIAPDAFQ GLKSLTSLVLYGNKITEIAKGLFDGLVSLQ LLNANKINCLRVNTFQDLQNLNLLSLYDN KLQTISKGLFAPLQSIQTLHLAQNPVCDCH LKW LADYLQDNPIETSGARCSSPRRLANKRI SQUIKSKFRCSGGGGSGGGGSGGGGSDAHK SEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQC PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ EPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELL FFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAW AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTE CCHGDLLECADDRA DLAKYICENQDSISSKL KECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLA ADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYA RRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAAD PHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFE QLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV SRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSV VLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRR	18

	PCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS EKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAV MDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLV AASQAALGLGGGGSGGGGSGGGGSDYKD DDDK	
--	---	--

* Trình tự được gạch chân trong Bảng 3 là trình tự liên kết GS để liên kết HSA và LRRD2 và trình tự in đậm là trình tự liên kết GS để liên kết trình tự được thêm vào đầu tận cùng C để thể hiện protein dung hợp ở dạng cuối cùng.

2-2. Xác nhận khả năng liên kết thụ thể của các dạng protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 khác nhau

Slit3 LRRD2 liên kết với thụ thể Robo1 hoặc Robo2, và kết quả là, liên kết β -catenin với M-cadherin của nguyên bào được giải phóng thông qua hệ thống Slit-Robo để kích hoạt β -catenin và tăng biểu hiện của myogenin, và sau đó, sự hình thành các cơ được thúc đẩy bằng cách tạo ra sự phân hóa của các nguyên bào. Do đó, trong ví dụ này, khả năng liên kết thụ thể của 12 loại protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 được điều chế trong Ví dụ 2-1 đã được xác nhận. Khả năng liên kết của 12 loại protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 với thụ thể Robo1 được định lượng bằng hệ thống ELISA. Điều kiện chi tiết như sau.

Các tấm khối lượng mẫu microtiter 96 giếng (do công ty NUNC sản xuất) được phủ 12 loại protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 ở 4 °C trong 18 giờ ở 0, 1, 10, 100 và 1000 nM mỗi giếng, có tính đến khối lượng phân tử. Vật liệu phủ được rửa ba lần bằng cách sử dụng PBS chứa 0,05% Tween 20 (PBST). Quá trình chặn được thực hiện với PBST được bổ sung 1% BSA ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ để chặn liên kết không đặc hiệu. Vật liệu phủ được rửa ba lần bằng PBST để loại bỏ chất đệm chặn. Sau khi rửa, 30ug protein thu được từ dòng tế bào tạo xương tương ứng được phép bám dính (chất đệm ly giải: 0,5% NP40, 50 mM Tris độ pH 7,5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,2 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM DTT, 1 mM PMSF và hỗn hợp ức chế proteinaza) ở nhiệt

độ phòng trong 2 giờ. Sau khi rửa ba lần bằng PBST, kháng thể Robo1 (abcam: ab7279) được pha loãng với 0,1% BSA ở tỷ lệ 1: 1000 được bám vào đó ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Sau khi rửa ba lần bằng PBST, kháng thể liên kết HRP (tín hiệu tế bào: 7074) được pha loãng với 0,1% BSA ở tỷ lệ 1: 2000 được kết dính vào đó ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Sau khi rửa năm lần bằng PBST, phản ứng được thực hiện với dung dịch TMB ở 37°C trong 30 phút. Để dừng phản ứng, đã dùng 100 μ l H₂SO₄ 1N, để đo độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm.

Kết quả là, như được minh họa trong Fig. 3, đã xác nhận là khả năng liên kết thụ thể của LRRD2-3 và LRRD2-6 là tốt nhất.

Ví dụ 3

Nghiên cứu được động học của protein dung hợp Slit3 LRRD2 và HSA-Slit3 LRRD2 ở chuột

Trong ví dụ này, dựa trên kết quả của Ví dụ 2, nghiên cứu được động học đã được thực hiện bằng cách chọn LRRD2-3, chất này có khả năng liên kết thụ thể tốt nhất.

Nghiên cứu được động học là một phần của quá trình phát triển thuốc mới và nhằm mục đích thu thập thông tin về sự hấp thu, phân phối, chuyển hóa và bài tiết của thuốc thử nghiệm bằng cách đánh giá sự thay đổi nồng độ thuốc trong cơ thể theo thời gian. Trong ví dụ này, các đặc tính được động học đã được xác nhận ở chuột sau khi tiêm tĩnh mạch một lần protein dung hợp Slit3 LRRD2-3 và HSA-Slit3 LRRD2 (LRRD2-3).

3-1. Hóa chất và dung môi

Carbamazepin được sử dụng trong ví dụ này được mua của Công ty Sigma Aldrich, và axetonitril cấp độ HPLC và metanol được mua của công ty J.T. Baker.

3-2. Động vật và điều kiện điều trị

Trong ví dụ này, chuột đực dựa trên ICR (6 tuần tuổi, Công ty Orient Bio Co., Ltd., Seongnam, Republic of Korea) với trọng lượng cơ thể dao động từ 30 đến 32,5 g đã được sử dụng. Chuột được để nhịn ăn trong 4 giờ trước khi thử nghiệm và việc nhịn ăn được duy trì đến 4 giờ sau khi điều trị. Nơi sinh sản được cho có ánh sáng và bóng tối trong 12 giờ, và nhiệt độ thích hợp (từ 20 đến 25°C) và độ ẩm (40 đến 60%) được duy trì.

Bảng 4

Thử nghiệm dược động học

Tài liệu điều trị	Số lượng động vật	Liều lượng điều trị
Slit3 LRRD2	4	10 mg/kg
HSA-Slit3 LRRD2 (LRRD2-3)	3	35 mg/kg
Tổng	7	-

Slit3 LRRD2 được điều chế bằng cách hòa tan trong PBS với liều 1 mg / mL. HSA-Slit3 LRRD2 (LRRD2-3) được điều chế bằng cách hòa tan trong PBS với liều lượng 3,5 mg / mL (1 mg / mL đối với Slit3 LRRD2) có tính đến khối lượng phân tử. Liều là 10 mL / kg ở cả hai nhóm và dung dịch đã điều chế được tiêm qua tĩnh mạch đuôi trái.

3-3. Thử nghiệm dược động học

Trong trường hợp thử nghiệm dược động học, những con chuột nhịn ăn được tiêm Slit3 LRRD2 và HSA-Slit3 LRRD2 (LRRD2-3) với liều 10 mg / kg và 35 mg / kg tương ứng qua tĩnh mạch đuôi. Sau khi dùng thuốc, chuột được cố định bằng tay ở các thời điểm tương ứng là 0,05, 0,12, 0,33, 1, 3, 7, 10, 24, 48 và 72 giờ và sau đó 70 µL máu được thu thập từ đám rối tĩnh mạch quỹ đạo bên phải bằng cách sử dụng heparin- ống mao dẫn

trắng. Máu thu được được ly tâm trong 5 phút và sau đó được bảo quản đông lạnh ở -20°C cho đến khi huyết tương được phân lập và phân tích.

3-4. Phương pháp phân tích

Nồng độ của Slit3 LRRD2 trong các mẫu huyết tương được định lượng bằng hệ thống HPLC / MS / MS. Trước khi tiền xử lý mẫu thử, các mẫu huyết tương được tinh chế bằng cách sử dụng hạt từ tính Ni-NTA. Sau khi tinh chế Slit3 LRRD2 và HSA-Slit3 LRRD2 (LRRD2-3) được biến tính bằng cách thêm 6M urê và 18 mM dithiothreitol (DTT) vào đó, quá trình alkyl hóa được tạo ra bằng cách sử dụng 225 mM iốt axetamid. Sau đó, để thu được peptit đặc trưng, 850 ng trypsin lợn tái tổ hợp (V5117, Promega, Madison, WI, USA) đã được thêm vào đó và hỗn hợp thu được được phản ứng trong nồi cách thủy ở 37°C trong 24 giờ. Sau khi 50 µL axit formic 3% hòa tan trong MeOH được thêm vào 70 µL sản phẩm phân hủy trypsin được tạo ra sau phản ứng, mẫu hỗn hợp được treo bằng máy trộn khuấy trong 10 phút, ly tâm ở tốc độ 13500 vòng / phút trong 10 phút, và 160 µL của phần nổi phía trên được lấy và chuyển đến một bình phân tích, và 5 µL của phần nổi phía trên đã chuyển được bơm vào hệ thống HPLC MSMS để thực hiện phân tích.

Điều kiện phân tích chi tiết như sau.

- Hệ thống HPLC: Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)
- Cột: ZORBAX® C8 3,5 µm, 2,1*50 mm (Agilent)
- Pha động:

A: 0,1% axit formic hòa tan trong nước cất

B: Axetonitril

(Rửa giải đẳng cấp)

Time	0 → 0.1 → 1.0 → 1.5 → 2.5 → 3 → 5
B (%)	5 → 5 → 5 → 95 → 95 → 5 → 5

- Tốc độ dòng chảy: 300 μ L / phút - Nhiệt độ: 20 ° C trong cột và 10 ° C trong khay lấy mẫu tự động

- Thời gian chạy: 5 phút

- Phát hiện: Khối phổ kế tứ cực Tandem (API 4000, QTRAP®, Applied Biosystems / MDS SCIEX, Foster City, CA, USA)

- Khí rèm: 20 psi

- Khí nguồn ion 1: 50 psi

- Khí nguồn ion 2: 60 psi

- Điện áp Ionspray: 5500 V

- Nhiệt độ: 600°C

- Chế độ giám sát nhiều phản ứng (MRM): tích cực

Các ion phân tử của peptit đặc trưng Slit3 LRRD2 (P6) bị phân mảnh bởi năng lượng va chạm 23 V và khí va chạm được đặt thành 'trung bình (8 psi)' trong thiết bị. Các ion được phát hiện ở chế độ MRM tích cực với ESI, và P6 được định lượng từ 587,97 đến 491,50 theo đơn vị m/z. Các đỉnh phát hiện được tích hợp bằng phần mềm Analyst phiên bản 1.4.2 (Hệ thống sinh học ứng dụng/MDS SCIEX). Khoảng định lượng của Slit3 LRRD2 trong huyết tương là 1 đến 100 μ g /mL và của HSA-Slit3 LRRD2 (LRRD2-3) là

3 đến 100 µg/mL. Trong phân tích tương ứng, Slit3 LRRD2 cho thấy thời gian lưu đỉnh là 3,29 phút.

3-5. Phân tích dữ liệu

Nồng độ của CNC00000 trong huyết tương theo thời gian được xác định bằng phương pháp phân tích LC-MS/MS như được mô tả trong Ví dụ 3-4 và các thông số dược động học (thông số PK) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích không ngăn của WinNonlin® 4.2 (Pharsight Corp., Phần mềm Cary, NC, USA). Nồng độ tối đa (C_{max}) và thời gian đến nồng độ tối đa (T_{max}) được tính toán tạm thời từ đường cong theo nồng độ thuốc trong máu so với thời gian, và hằng số tốc độ thải trừ (K_e) được tính bằng phân tích hồi quy tuyến tính trong giai đoạn cuối của thang đo logarit.

Thời gian bán phân hủy ($T_{1/2}$) được tính bằng cách chia $LN2$ cho K_e , và diện tích dưới đường cong nồng độ thuốc trong máu so với thời gian ($AUC_{0-\infty}$) và diện tích dưới đường cong nồng độ thuốc trong máu so với thời gian ($AUMC_{0-\infty}$) được tính bằng quy tắc hình thang tuyến tính và phương pháp ngoại suy diện tích tiêu chuẩn. Khe hở (CL) và thể tích phân bố trạng thái ổn định (V_{ss}) được tính theo Phương trình 1 đến Phương trình 3 như sau:

Phương trình 1

$$CL = \frac{Dose}{AUC_{0-\infty}}$$

Phương trình 2

$$V_{ss} = MRT \times CL$$

Phương trình 3

$$MRT = \frac{AUMC_{0-\infty}}{AUC_{0-\infty}}$$

3-6. Kết quả

Nồng độ của Slit3 LRRD2 và HSA-Slit3 LRRD2 (LRRD2-3) trong huyết tương theo thời gian như được thể hiện trên Fig. 4 và Bảng 5 và Bảng 6, và các thông số dược động học được thể hiện trong Bảng 6. Các thông số liên quan và tất cả các giá trị được tính toán cho từng cá thể và sau đó được tính trung bình. Đề cập đến mô hình nồng độ máu và hồ sơ thí nghiệm động vật theo thời gian, bất kỳ quần thể bất thường nào đều bị loại khỏi phân tích dữ liệu và nhóm thí nghiệm được sử dụng để phân tích dữ liệu được thiết lập có ít nhất $n = 3$ trở lên.

Bảng 5

Nồng độ huyết tương sau khi tiêm tĩnh mạch Slit3

Nồng độ trong huyết tương của Slit3 ($\mu\text{g} / \text{mL}$)						
Thời gian (giờ)	#1	#2	#3	#4	Trung bình	S.D.
0,05	122	90,9	97,6	96,7	102	13,8
0,12	62,6	61,4	47,9	59,7	57,9	6,77
0,33	14,1	11,4	12,1	11,0	12,2	1,38
1	0,66	0,48	0,84	0,71	0,67	0,15
3	BQL	BQL	BQL	BQL	0,000	-
7	BQL	BQL	BQL	BQL	0,000	-
10	BQL	BQL	BQL	BQL	0,000	-
24	BQL	BQL	BQL	BQL	0,000	-

BQL: Khi nhỏ hơn giới hạn định lượng, nó được coi là bằng "0"

Bảng 6

Nồng độ huyết tương sau khi tiêm tĩnh mạch HSA-Slit3 (LRRD2-3)

Nồng độ trong huyết tương của Slit3 ($\mu\text{g} / \text{mL}$)					
Thời gian (giờ)	#6	#7	#8	Trung bình	S.D.
0,05	587	460	577	541	70,6
0,12	539	366	480	462	87,9
0,33	355	327	441	374	59,4
1	217	199	262	226	32,4
3	82,8	73,6	98,9	85,1	12,8
7	18,9	18,5	23,4	20,3	2,72
10	9,71	7,64	12,5	9,95	2,44
24	BQL	BQL	BQL	0,000	-

* BQL: Khi nhỏ hơn giới hạn định lượng, nó được coi là bằng "0".

Như đã xác nhận trong Bảng 7 sau đây, Slit3 LRRD2 (LRRD2-3) liên kết HSA cho thấy thời gian bán phân hủy được cải thiện xấp xỉ 14 lần so với Slit3 LRRD2.

Bảng 7

Tham số	Slit3 LRRD2		HSA-Slit3 LRRD2 (LRRD2-3)	
	Trung bình	S.D.	Trung bình	S.D.
$T_{\max}$ (giờ)	0,050	$\pm$ 0,000	0,050	$\pm$ 0,000
C_0 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	153,9	33,25	607,8	59,87
$C_{\max}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	101,8	$\pm$ 13,79	541,3	$\pm$ 70,61
$T_{1/2}$ (giờ)	0,139	$\pm$ 0,012	1,993	$\pm$ 0,147
$AUC_{\text{tất cả}}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	23,63	$\pm$ 2,534	919,9	$\pm$ 131,2
AUC_{inf} ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	23,77	$\pm$ 2,530	948,1	$\pm$ 136,1
CL ($\text{mL}/\text{h}/\text{kg}$)	424,0	$\pm$ 40,88	10,69	$\pm$ 1,504
V_{ss} (mL/kg)	61,46	$\pm$ 7,368	24,1	$\pm$ 3,293

Ví dụ 4

Xác nhận hiệu quả in vivo của Slit3 LRRD2 gắn với HSA

Những con chuột Balbc trụi lông 9 tuần tuổi bị cắt bỏ buồng trứng được điều trị bằng Slit3 LRRD2 mà albumin không bị ràng buộc hoặc protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 (LRRD2-3) trong 4 tuần kể từ khi chuột được 11 tuần tuổi. Mỗi loại thuốc được sử

dụng bằng cách tiêm vào tĩnh mạch một lần mỗi ngày, năm lần mỗi tuần, và Slit3 LRRD2 và Slit3 LRRD2 gắn với HSA (LRRD2-3) được tiêm hàng ngày với liều tương ứng là 10 mg và 37,13 mg (Slit3 LRRD2 tương ứng với 10 mg hằng ngày). Sau khi điều trị xong, cơ dếp được thu thập và đo khối lượng của cơ, và kết quả được thể hiện trong Bảng 8 sau đây.

Bảng 8

Nhóm	Khối lượng cơ (mg) của cơ dếp
Đối chứng (n = 8)	5,89 ± 0,25
Slit3 LRRD2 (n = 8)	6,73 ± 0,20*
Protein dung hợp HSA-Slit3 LRRD2 (LRRD2-3) (n = 8)	6,80 ± 1,75*

*P < 0,05, so với đối chứng không điều trị

Như được thể hiện trong Bảng 8, cả Slit3 LRRD2 không liên kết với albumin và Slit3 LRRD2 liên kết với HSA đều làm tăng đáng kể khối lượng cơ của cơ dếp. Tuy nhiên, Slit3 LRRD2 gắn với HSA thậm chí còn cho thấy hiệu quả điều trị mạnh hơn so với Slit3 LRRD2 không liên kết với albumin.

Khả năng áp dụng trong công nghiệp

Vì LRRD2 liên kết với albumin của protein Slit3 có cùng hiệu quả tế bào học như LRRD2 không liên kết với albumin của protein Slit3 và có thời gian bán phân hủy in vivo tăng lên đáng kể so với LRRD2 không liên kết với albumin của protein Slit3, các bệnh liên quan đến cơ có thể được phòng ngừa hoặc điều trị một cách hiệu quả hơn.

Các dự án nghiên cứu và phát triển quốc gia hỗ trợ sáng chế này như sau.

(1) [Các dự án nghiên cứu và phát triển quốc gia hỗ trợ sáng chế]

[Số nhận dạng dự án] 2017-1229 (HI15C0377010017)

[Tên Bộ] Bộ Y tế và Phúc lợi

[Cơ quan quản lý nghiên cứu] Viện phát triển công nghiệp y tế Hàn Quốc

[Tên dự án nghiên cứu] Nghiên cứu dịch theo hướng dịch bệnh

[Tiêu đề nghiên cứu] Khám phá các yếu tố bài tiết tế bào đại nhân có tác dụng thúc đẩy hình thành xương

[Tỷ lệ đóng góp] 75/100

[Tổ chức hành chính] Trung tâm Y tế Asan, Seoul

[Thời gian nghiên cứu] 7 tháng 9 năm 2017 đến 6 tháng 9 năm 2018

(2) [Các dự án nghiên cứu và phát triển quốc gia hỗ trợ sáng chế này]

[Số nhận dạng dự án] 2013-2234 (HI13C1634060018)

[Tên Bộ] Bộ Y tế và Phúc lợi

[Cơ quan quản lý nghiên cứu] Viện phát triển công nghiệp y tế Hàn Quốc

[Tên dự án nghiên cứu] Nghiên cứu dịch theo hướng dịch bệnh

[Tên nghiên cứu] Nghiên cứu được động học của Slit3 LRRD2 và xác minh độc tính *in vivo* bằng cách sử dụng chuột Slit3 TG

[Tỷ lệ đóng góp] 25/100

[Tổ chức hành chính] Hợp tác Công nghiệp & Học thuật tại Đại học Quốc gia Chungnam (IAC)

[Thời gian nghiên cứu] từ ngày 1 tháng 11 năm 2013 đến ngày 30 tháng 6 năm 2019

YÊU CẦU BẢO HỘ

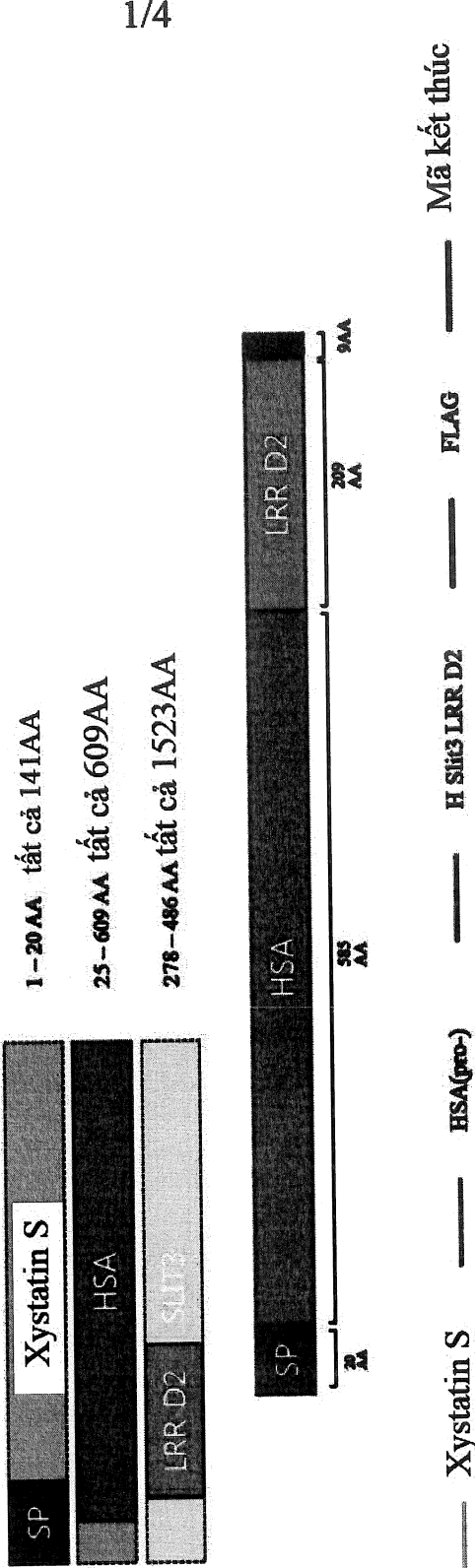
1. Protein dung hợp bao gồm LRRD2 của protein Slit3 liên kết với albumin, trong đó LRRD2 của protein Slit3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 3.
2. Protein dung hợp theo điểm 1, trong đó albumin là albumin huyết thanh người.
3. Protein dung hợp theo điểm 2, trong đó albumin huyết thanh người được liên kết với đầu tận cùng N của LRRD2 của protein Slit3.
4. Protein dung hợp theo điểm 3, trong đó albumin huyết thanh người bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 2.
5. Protein dung hợp theo điểm 1, còn bao gồm trình tự liên kết giữa albumin và LRRD2 của protein Slit3.
6. Protein dung hợp theo điểm 5, trong đó trình tự liên kết là (GGGGS)_n, trong đó n là số nguyên từ 1 đến 10.
7. Phân tử axit nucleic mã hóa protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6.
8. Vector tái tổ hợp bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 7.
9. Chất biến đổi bao gồm vector tái tổ hợp theo điểm 8.
10. Phương pháp điều chế protein dung hợp chứa LRRD2 của protein Slit3 liên kết với albumin, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chất biến đổi theo điểm 9.
11. Dược phẩm chứa protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh về cơ, trong đó bệnh về cơ là do suy giảm chức năng cơ, hao mòn cơ hoặc thoái hóa cơ.
12. Dược phẩm chứa protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh về cơ, trong đó dược phẩm được sử dụng dưới dạng thuốc tiêm.
13. Dược phẩm chứa protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh về cơ, trong đó bệnh về cơ là một hoặc nhiều bệnh được

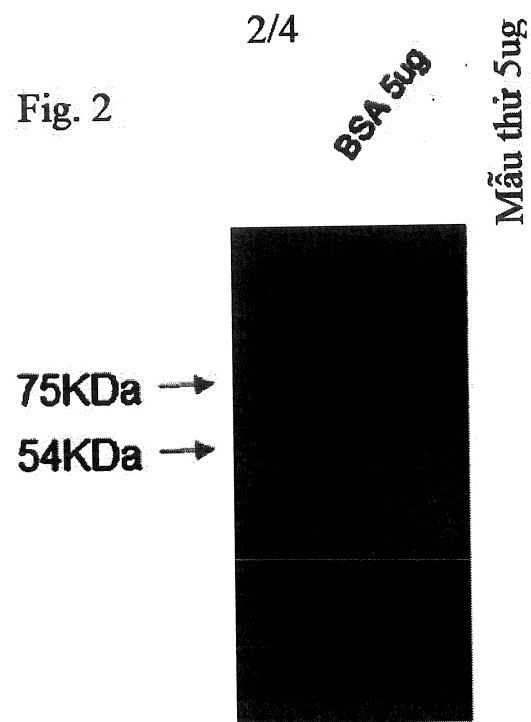
chọn từ nhóm bao gồm mất trương lực cơ, teo cơ, loạn dưỡng cơ, thoái hóa cơ, nhược cơ, hao mòn cơ và hội chứng suy giảm cơ bắp.

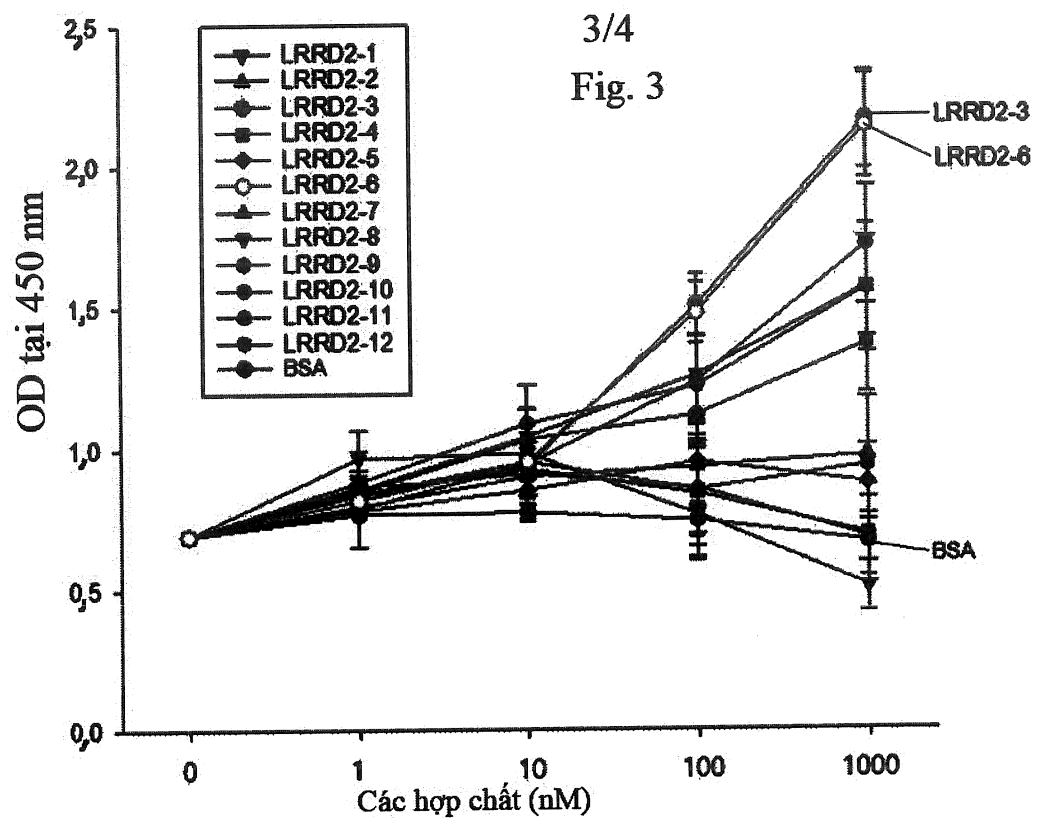
14. Chế phẩm chứa protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 để cải thiện thời gian bán phân hủy *in vivo* của LRRD2 của protein Slit3.

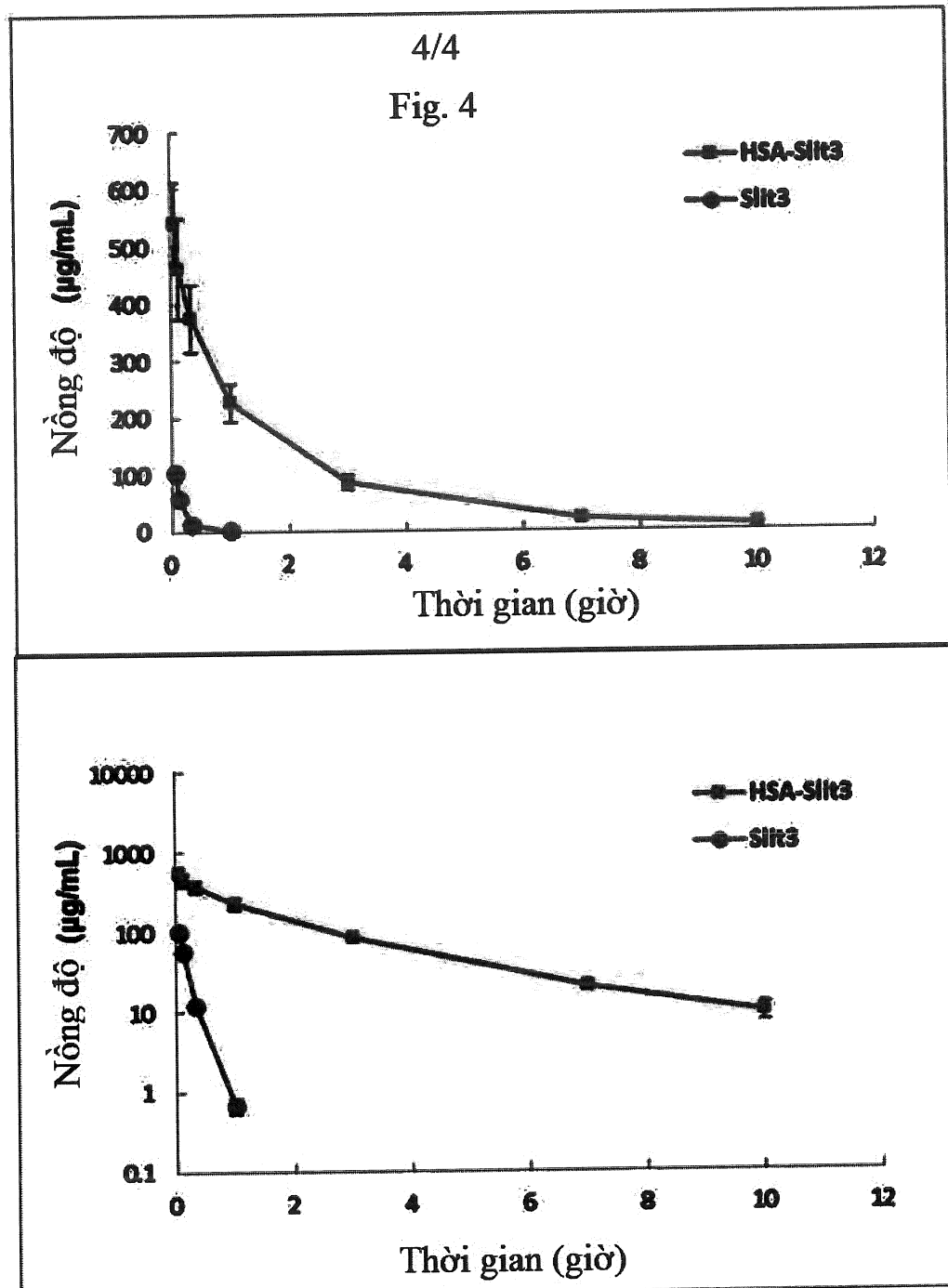
Fig. 1
PC ADN 3.1 (+) - SP xystatin S - HSA (pro) - trình tự protein H Slit3 LRRD2-FLAG

MARPLCTLLMATLAGALADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLAFAQYLQCPFFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKYL YEIARRHPYFAPPELLFFAKRYKAAFTCCQQAADKAACLLPKLDELIRDE
GKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEAEVSKLVDTLTKVHTECCCHGDILLECADDRADLAKYICENQDSSISSKLLKECKEPILLEKSHCIAE
VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHCEYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCSELF
QLGEYKFQNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSWLNQLVHKEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK
EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAYMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLISCPSPTCSNNIVDCRGK
GLMEIPANLPEGIVEIRLEQNSIKAIPAGAFQYKLLKRIDISKNOISDIAPDAFQGLKSLTSLVLYGNKITEIAKGLFDGLVSLQLLLNANKINCLRVNTFQDLQNLN
LLSLYDNKLOTISKGLFAPLOSQTLLHLAQNPFCVDCCHLKWLDYLODNPIETSGARCSPRRLANKRISQIKSKKFRCS **DYKDDDDK* (SEQ ID NO: 9)**









DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> DAEWOONG PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Protein dung hợp bao gồm LRRD2 của protein Slit3 liên kết với albumin, phương pháp điều chế và dược phẩm chứa protein này

<130> 1067120

<150> KR 10-2019-0023375

<151> 2019-02-27

<160> 18

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> SP Cystatin S

<400> 1

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala
20

<210> 2

<211> 585

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> HSA

<400> 2

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

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

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 580 585

<210> 3
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Slit3 LRRD2

<400> 3

Ile Ser Cys Pro Ser Pro Cys Thr Cys Ser Asn Asn Ile Val Asp Cys
 1 5 10 15

Arg Gly Lys Gly Leu Met Glu Ile Pro Ala Asn Leu Pro Glu Gly Ile
 20 25 30

Val Glu Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys Ala Ile Pro Ala Gly
 35 40 45

Ala Phe Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile Asp Ile Ser Lys Asn
 50 55 60

Gln Ile Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln Gly Leu Lys Ser Leu
 65 70 75 80

Thr Ser Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr Glu Ile Ala Lys Gly
 85 90 95

Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu Leu Asn Ala Asn
 100 105 110

Lys Ile Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp Leu Gln Asn Leu
 115 120 125

Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr Ile Ser Lys Gly
 130 135 140

Leu Phe Ala Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu His Leu Ala Gln Asn
 145 150 155 160

Pro Phe Val Cys Asp Cys His Leu Lys Trp Leu Ala Asp Tyr Leu Gln
 165 170 175

Asp Asn Pro Ile Glu Thr Ser Gly Ala Arg Cys Ser Ser Pro Arg Arg
 180 185 190

Leu Ala Asn Lys Arg Ile Ser Gln Ile Lys Ser Lys Lys Phe Arg Cys
 195 200 205

Ser

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> FLAG

<400> 4

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Liên kết GS

<220>
 <221> LẶP LẠI
 <222> (1)..(5)
 <223> Gốc axit amin ở vị trí 1 đến vị trí 5 được lặp lại từ 1 đến 5 lần.

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Liên kết GS

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 7

<211> 681

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> LRRD2-1

<400> 7

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys
 20 25 30

Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala
 35 40 45

Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn
 50 55 60

Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu
 65 70 75 80

Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr
 85 90 95

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

Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp
 115 120 125

Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys
 130 135 140

Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr
 145 150 155 160

Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe
 165 170 175

Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala
 180 185 190

Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu
 195 200 205

Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln
 210 215 220

Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser
 225 230 235 240

Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr
 245 250 255

Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu
 260 265 270

Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln
 275 280 285

Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu
 290 295 300

Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala
 305 310 315 320

Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys
 325 330 335

Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr
 340 345 350

Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg
 355 360 365

Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala
 370 375 380

Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu
 385 390 395 400

Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu
 405 410 415

Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr
 420 425 430
 Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg
 435 440 445
 Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
 450 455 460
 Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu
 465 470 475 480
 Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys
 485 490 495
 Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu
 500 505 510
 Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr
 515 520 525
 Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys
 530 535 540
 Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr
 545 550 555 560
 Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu
 565 570 575
 Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly
 580 585 590
 Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Leu Thr Ser
 595 600 605
 Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr Glu Ile Ala Lys Gly Leu Phe
 610 615 620
 Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu Leu Asn Ala Asn Lys Ile
 625 630 635 640
 Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp Leu Gln Asn Leu Asn Leu
 645 650 655

Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr Ile Ser Lys Gly Leu Phe
 660 665 670

Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 675 680

<210> 8
 <211> 743
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> LRRD2-2

<400> 8

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys
 20 25 30

Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala
 35 40 45

Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn
 50 55 60

Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu
 65 70 75 80

Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr
 85 90 95

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

Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp
 115 120 125

Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys
 130 135 140

Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr
 145 150 155 160

Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe
 165 170 175

Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala
 180 185 190

Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu
 195 200 205

Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln
 210 215 220

Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser
 225 230 235 240

Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr
 245 250 255

Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu
 260 265 270

Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln
 275 280 285

Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu
 290 295 300

Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala
 305 310 315 320

Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys
 325 330 335

Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr
 340 345 350

Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg
 355 360 365

Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala
 370 375 380

Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu
 385 390 395 400

Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu
 405 410 415

Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr
 420 425 430

Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg
 435 440 445

Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
 450 455 460

Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu
 465 470 475 480

Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys
 485 490 495

Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu
 500 505 510

Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr
 515 520 525

Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys
 530 535 540

Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr
 545 550 555 560

Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu
 565 570 575

Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly
 580 585 590

Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Ile Val Glu
 595 600 605

Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys Ala Ile Pro Ala Gly Ala Phe
 610 615 620

Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile Asp Ile Ser Lys Asn Gln Ile
 625 630 635 640

Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln Gly Leu Lys Ser Leu Thr Ser
 645 650 655

Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr Glu Ile Ala Lys Gly Leu Phe
660 665 670

Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu Leu Asn Ala Asn Lys Ile
675 680 685

Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp Leu Gln Asn Leu Asn Leu
690 695 700

Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr Ile Ser Lys Gly Leu Phe
705 710 715 720

Ala Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu His Leu Ala Gln Asn Pro Asp
725 730 735

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
740

<210> 9
<211> 822
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> LRRD2-3

<400> 9

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys
20 25 30

Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala
35 40 45

Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn
50 55 60

Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu
65 70 75 80

Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr
85 90 95

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

Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp
 115 120 125

Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys
 130 135 140

Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr
 145 150 155 160

Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe
 165 170 175

Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala
 180 185 190

Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu
 195 200 205

Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln
 210 215 220

Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser
 225 230 235 240

Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr
 245 250 255

Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu
 260 265 270

Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln
 275 280 285

Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu
 290 295 300

Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala
 305 310 315 320

Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys
 325 330 335

Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr
 340 345 350
 Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg
 355 360 365
 Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala
 370 375 380
 Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu
 385 390 395 400
 Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu
 405 410 415
 Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr
 420 425 430
 Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg
 435 440 445
 Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
 450 455 460
 Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu
 465 470 475 480
 Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys
 485 490 495
 Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu
 500 505 510
 Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr
 515 520 525
 Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys
 530 535 540
 Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr
 545 550 555 560
 Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu
 565 570 575

Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly
 580 585 590

Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Ile Ser Cys
 595 600 605

Pro Ser Pro Cys Thr Cys Ser Asn Asn Ile Val Asp Cys Arg Gly Lys
 610 615 620

Gly Leu Met Glu Ile Pro Ala Asn Leu Pro Glu Gly Ile Val Glu Ile
 625 630 635 640

Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys Ala Ile Pro Ala Gly Ala Phe Thr
 645 650 655

Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile Asp Ile Ser Lys Asn Gln Ile Ser
 660 665 670

Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln Gly Leu Lys Ser Leu Thr Ser Leu
 675 680 685

Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr Glu Ile Ala Lys Gly Leu Phe Asp
 690 695 700

Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu Leu Asn Ala Asn Lys Ile Asn
 705 710 715 720

Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp Leu Gln Asn Leu Asn Leu Leu
 725 730 735

Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr Ile Ser Lys Gly Leu Phe Ala
 740 745 750

Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu His Leu Ala Gln Asn Pro Phe Val
 755 760 765

Cys Asp Cys His Leu Lys Trp Leu Ala Asp Tyr Leu Gln Asp Asn Pro
 770 775 780

Ile Glu Thr Ser Gly Ala Arg Cys Ser Ser Pro Arg Arg Leu Ala Asn
 785 790 795 800

Lys Arg Ile Ser Gln Ile Lys Ser Lys Lys Phe Arg Cys Ser Asp Tyr
 805 810 815

Lys Asp Asp Asp Asp Lys
820

<210> 10
<211> 696
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> LRRD2-4

<400> 10

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys
20 25 30

Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala
35 40 45

Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn
50 55 60

Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu
65 70 75 80

Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr
85 90 95

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

Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp
115 120 125

Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys
130 135 140

Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr
145 150 155 160

Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe
165 170 175

Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala
180 185 190

Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu
 195 200 205
 Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln
 210 215 220
 Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser
 225 230 235 240
 Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr
 245 250 255
 Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu
 260 265 270
 Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln
 275 280 285
 Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu
 290 295 300
 Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala
 305 310 315 320
 Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys
 325 330 335
 Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr
 340 345 350
 Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg
 355 360 365
 Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala
 370 375 380
 Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu
 385 390 395 400
 Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu
 405 410 415
 Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr
 420 425 430

Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg
 435 440 445

Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
 450 455 460

Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu
 465 470 475 480

Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys
 485 490 495

Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu
 500 505 510

Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr
 515 520 525

Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys
 530 535 540

Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr
 545 550 555 560

Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu
 565 570 575

Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly
 580 585 590

Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly
 595 600 605

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Thr Ser Leu
 610 615 620

Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr Glu Ile Ala Lys Gly Leu Phe Asp
 625 630 635 640

Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu Leu Asn Ala Asn Lys Ile Asn
 645 650 655

Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp Leu Gln Asn Leu Asn Leu Leu
 660 665 670

Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr Ile Ser Lys Gly Leu Phe Ala
 675 680 685

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 690 695

<210> 11
 <211> 758
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> LRRD2-5

<400> 11

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys
 20 25 30

Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala
 35 40 45

Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn
 50 55 60

Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu
 65 70 75 80

Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr
 85 90 95

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

Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp
 115 120 125

Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys
 130 135 140

Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr
 145 150 155 160

Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe
 165 170 175
 Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala
 180 185 190
 Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu
 195 200 205
 Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln
 210 215 220
 Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser
 225 230 235 240
 Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr
 245 250 255
 Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu
 260 265 270
 Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln
 275 280 285
 Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu
 290 295 300
 Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala
 305 310 315 320
 Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys
 325 330 335
 Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr
 340 345 350
 Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg
 355 360 365
 Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala
 370 375 380
 Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu
 385 390 395 400

Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu
 405 410 415
 Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr
 420 425 430
 Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg
 435 440 445
 Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
 450 455 460
 Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu
 465 470 475 480
 Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys
 485 490 495
 Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu
 500 505 510
 Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr
 515 520 525
 Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys
 530 535 540
 Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr
 545 550 555 560
 Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu
 565 570 575
 Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly
 580 585 590
 Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly
 595 600 605
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Val Glu Ile
 610 615 620
 Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys Ala Ile Pro Ala Gly Ala Phe Thr
 625 630 635 640

Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile Asp Ile Ser Lys Asn Gln Ile Ser
645 650 655

Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln Gly Leu Lys Ser Leu Thr Ser Leu
660 665 670

Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr Glu Ile Ala Lys Gly Leu Phe Asp
675 680 685

Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu Leu Asn Ala Asn Lys Ile Asn
690 695 700

Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp Leu Gln Asn Leu Asn Leu Leu
705 710 715 720

Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr Ile Ser Lys Gly Leu Phe Ala
725 730 735

Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu His Leu Ala Gln Asn Pro Asp Tyr
740 745 750

Lys Asp Asp Asp Asp Lys
755

<210> 12
<211> 837
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> LRRD2-6

<400> 12

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys
20 25 30

Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala
35 40 45

Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn
50 55 60

Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu
65 70 75 80

Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr
 85 90 95
 Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala
 100 105 110
 Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp
 115 120 125
 Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys
 130 135 140
 Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr
 145 150 155 160
 Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe
 165 170 175
 Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala
 180 185 190
 Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu
 195 200 205
 Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln
 210 215 220
 Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser
 225 230 235 240
 Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr
 245 250 255
 Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu
 260 265 270
 Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln
 275 280 285
 Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu
 290 295 300
 Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala
 305 310 315 320
 23

Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys
 325 330 335

Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr
 340 345 350

Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg
 355 360 365

Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala
 370 375 380

Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu
 385 390 395 400

Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu
 405 410 415

Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr
 420 425 430

Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg
 435 440 445

Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
 450 455 460

Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu
 465 470 475 480

Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys
 485 490 495

Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu
 500 505 510

Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr
 515 520 525

Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys
 530 535 540

Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr
 545 550 555 560

Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu
 565 570 575

Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly
 580 585 590

Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly
 595 600 605

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Ser Cys Pro
 610 615 620

Ser Pro Cys Thr Cys Ser Asn Asn Ile Val Asp Cys Arg Gly Lys Gly
 625 630 635 640

Leu Met Glu Ile Pro Ala Asn Leu Pro Glu Gly Ile Val Glu Ile Arg
 645 650 655

Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys Ala Ile Pro Ala Gly Ala Phe Thr Gln
 660 665 670

Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile Asp Ile Ser Lys Asn Gln Ile Ser Asp
 675 680 685

Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln Gly Leu Lys Ser Leu Thr Ser Leu Val
 690 695 700

Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr Glu Ile Ala Lys Gly Leu Phe Asp Gly
 705 710 715 720

Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu Leu Asn Ala Asn Lys Ile Asn Cys
 725 730 735

Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp Leu Gln Asn Leu Asn Leu Leu Ser
 740 745 750

Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr Ile Ser Lys Gly Leu Phe Ala Pro
 755 760 765

Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu His Leu Ala Gln Asn Pro Phe Val Cys
 770 775 780

Asp Cys His Leu Lys Trp Leu Ala Asp Tyr Leu Gln Asp Asn Pro Ile
 785 790 795 800

25

Glu Thr Ser Gly Ala Arg Cys Ser Ser Pro Arg Arg Leu Ala Asn Lys
 805 810 815

Arg Ile Ser Gln Ile Lys Ser Lys Lys Phe Arg Cys Ser Asp Tyr Lys
 820 825 830

Asp Asp Asp Asp Lys
 835

<210> 13
 <211> 696
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> LRRD2-7

<400> 13

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ser Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr
 20 25 30

Glu Ile Ala Lys Gly Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu
 35 40 45

Leu Leu Asn Ala Asn Lys Ile Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln
 50 55 60

Asp Leu Gln Asn Leu Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln
 65 70 75 80

Thr Ile Ser Lys Gly Leu Phe Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 85 90 95

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 100 105 110

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 115 120 125

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 130 135 140

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
145 150 155 160

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
165 170 175

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
180 185 190

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
195 200 205

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
210 215 220

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
245 250 255

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
260 265 270

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
275 280 285

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
290 295 300

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
305 310 315 320

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
325 330 335

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
340 345 350

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
355 360 365

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
370 375 380

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 385 390 395 400
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 405 410 415
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 420 425 430
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 435 440 445
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 450 455 460
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 465 470 475 480
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 485 490 495
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 500 505 510
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 515 520 525
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 530 535 540
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 545 550 555 560
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 565 570 575
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 580 585 590
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 595 600 605
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 610 615 620

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
625 630 635 640

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
645 650 655

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
660 665 670

Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
675 680 685

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
690 695

<210> 14
<211> 758
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> LRRD2-8

<400> 14

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Ile Val Glu Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys
20 25 30

Ala Ile Pro Ala Gly Ala Phe Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Asn Gln Ile Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln
50 55 60

Gly Leu Lys Ser Leu Thr Ser Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr
65 70 75 80

Glu Ile Ala Lys Gly Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Leu Leu Asn Ala Asn Lys Ile Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln
100 105 110

Asp Leu Gln Asn Leu Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln
115 120 125

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

His Leu Ala Gln Asn Pro Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
 145 150 155 160

Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
 165 170 175

Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
 180 185 190

Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
 195 200 205

Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
 210 215 220

Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
 225 230 235 240

Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
 245 250 255

Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val
 260 265 270

Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr
 275 280 285

Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
 290 295 300

Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln
 305 310 315 320

Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
 325 330 335

Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
 340 345 350

Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
 355 360 365

Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
 370 375 380

Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 385 390 395 400

Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu
 405 410 415

Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro
 420 425 430

Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met
 435 440 445

Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp
 450 455 460

Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe
 465 470 475 480

Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu
 485 490 495

Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
 500 505 510

Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys
 515 520 525

Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu
 530 535 540

Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg
 545 550 555 560

Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val
 565 570 575

Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu
 580 585 590

Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn
 595 600 605

Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr
 610 615 620

Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
 625 630 635 640

Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr
 645 650 655

Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln
 660 665 670

Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
 675 680 685

Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
 690 695 700

Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
 705 710 715 720

Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
 725 730 735

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr
 740 745 750

Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 755

<210> 15
 <211> 837
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> LRRD2-9

<400> 15

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Ile Ser Cys Pro Ser Pro Cys Thr Cys Ser Asn Asn
 20 25 30

Ile Val Asp Cys Arg Gly Lys Gly Leu Met Glu Ile Pro Ala Asn Leu
 35 40 45

Pro Glu Gly Ile Val Glu Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys Ala
 50 55 60

Ile Pro Ala Gly Ala Phe Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile Asp
 65 70 75 80

Ile Ser Lys Asn Gln Ile Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln Gly
 85 90 95

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

Ile Ala Lys Gly Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu
 115 120 125

Leu Asn Ala Asn Lys Ile Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp
 130 135 140

Leu Gln Asn Leu Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr
 145 150 155 160

Ile Ser Lys Gly Leu Phe Ala Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu His
 165 170 175

Leu Ala Gln Asn Pro Phe Val Cys Asp Cys His Leu Lys Trp Leu Ala
 180 185 190

Asp Tyr Leu Gln Asp Asn Pro Ile Glu Thr Ser Gly Ala Arg Cys Ser
 195 200 205

Ser Pro Arg Arg Leu Ala Asn Lys Arg Ile Ser Gln Ile Lys Ser Lys
 210 215 220

Lys Phe Arg Cys Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe
 225 230 235 240

Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe
 245 250 255

Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val
 260 265 270

Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala
 275 280 285

Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys
 290 295 300

Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys
 305 310 315 320

Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp
 325 330 335

Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met
 340 345 350

Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu
 355 360 365

Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu
 370 375 380

Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala
 385 390 395 400

Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp
 405 410 415

Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu
 420 425 430

Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
 435 440 445

Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val
 450 455 460

Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
 465 470 475 480

Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn
 485 490 495

Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu
 500 505 510

Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
 515 520 525

Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val
 530 535 540

Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
 545 550 555 560

Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
 565 570 575

Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
 580 585 590

Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
 595 600 605

Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
 610 615 620

Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
 625 630 635 640

Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
 645 650 655

Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
 660 665 670

Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
 675 680 685

Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
 690 695 700

Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
 705 710 715 720

Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
 725 730 735

Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
 740 745 750

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
755 760 765

Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
770 775 780

Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
785 790 795 800

Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly
805 810 815

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys
820 825 830

Asp Asp Asp Asp Lys
835

<210> 16
<211> 711
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> LRRD2-10

<400> 16

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ser Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr
20 25 30

Glu Ile Ala Lys Gly Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu
35 40 45

Leu Leu Asn Ala Asn Lys Ile Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln
50 55 60

Asp Leu Gln Asn Leu Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln
65 70 75 80

Thr Ile Ser Lys Gly Leu Phe Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His
100 105 110

Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile
 115 120 125
 Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys
 130 135 140
 Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu
 145 150 155 160
 Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys
 165 170 175
 Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp
 180 185 190
 Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His
 195 200 205
 Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp
 210 215 220
 Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys
 225 230 235 240
 Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu
 245 250 255
 Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys
 260 265 270
 Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu
 275 280 285
 Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala
 290 295 300
 Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala
 305 310 315 320
 Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys
 325 330 335
 Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp
 340 345 350

Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys
 355 360 365

Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys
 370 375 380

Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu
 385 390 395 400

Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys
 405 410 415

Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met
 420 425 430

Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu
 435 440 445

Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys
 450 455 460

Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe
 465 470 475 480

Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu
 485 490 495

Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val
 500 505 510

Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu
 515 520 525

Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro
 530 535 540

Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu
 545 550 555 560

Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val
 565 570 575

Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
 580 585 590

Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu
595 600 605

Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg
610 615 620

Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro
625 630 635 640

Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala
645 650 655

Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala
660 665 670

Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
675 680 685

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
690 695 700

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
705 710

<210> 17
<211> 773
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> LRRD2-11

<400> 17

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Ile Val Glu Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys
20 25 30

Ala Ile Pro Ala Gly Ala Phe Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Asn Gln Ile Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln
50 55 60

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

Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu
 305 310 315 320

Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala
 325 330 335

Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp
 340 345 350

Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu
 355 360 365

Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
 370 375 380

Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val
 385 390 395 400

Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
 405 410 415

Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn
 420 425 430

Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu
 435 440 445

Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
 450 455 460

Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val
 465 470 475 480

Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
 485 490 495

Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
 500 505 510

Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
 515 520 525

Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
 530 535 540

Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
 545 550 555 560
 Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
 565 570 575
 Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
 580 585 590
 Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
 595 600 605
 Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
 610 615 620
 Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
 625 630 635 640
 Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
 645 650 655
 Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
 660 665 670
 Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
 675 680 685
 Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
 690 695 700
 Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
 705 710 715 720
 Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
 725 730 735
 Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly
 740 745 750
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys
 755 760 765
 Asp Asp Asp Asp Lys
 770

<210> 18
 <211> 852
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> LRRD2-12

<400> 18

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Ile Ser Cys Pro Ser Pro Cys Thr Cys Ser Asn Asn
 20 25 30

Ile Val Asp Cys Arg Gly Lys Gly Leu Met Glu Ile Pro Ala Asn Leu
 35 40 45

Pro Glu Gly Ile Val Glu Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys Ala
 50 55 60

Ile Pro Ala Gly Ala Phe Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile Asp
 65 70 75 80

Ile Ser Lys Asn Gln Ile Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln Gly
 85 90 95

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

Ile Ala Lys Gly Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu
 115 120 125

Leu Asn Ala Asn Lys Ile Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp
 130 135 140

Leu Gln Asn Leu Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr
 145 150 155 160

Ile Ser Lys Gly Leu Phe Ala Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu His
 165 170 175

Leu Ala Gln Asn Pro Phe Val Cys Asp Cys His Leu Lys Trp Leu Ala
 180 185 190

Asp Tyr Leu Gln Asp Asn Pro Ile Glu Thr Ser Gly Ala Arg Cys Ser
 195 200 205

Ser Pro Arg Arg Leu Ala Asn Lys Arg Ile Ser Gln Ile Lys Ser Lys
 210 215 220
 Lys Phe Arg Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys
 245 250 255
 Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala
 260 265 270
 Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn
 275 280 285
 Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu
 290 295 300
 Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr
 305 310 315 320
 Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala
 325 330 335
 Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp
 340 345 350
 Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys
 355 360 365
 Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr
 370 375 380
 Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe
 385 390 395 400
 Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala
 405 410 415
 Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu
 420 425 430
 Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln
 435 440 445

Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser
 450 455 460

Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr
 465 470 475 480

Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu
 485 490 495

Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln
 500 505 510

Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu
 515 520 525

Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala
 530 535 540

Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys
 545 550 555 560

Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr
 565 570 575

Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg
 580 585 590

Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala
 595 600 605

Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu
 610 615 620

Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu
 625 630 635 640

Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr
 645 650 655

Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg
 660 665 670

Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
 675 680 685

Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu
690 695 700

Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys
705 710 715 720

Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu
725 730 735

Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr
740 745 750

Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys
755 760 765

Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr
770 775 780

Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu
785 790 795 800

Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly
805 810 815

Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly
820 825 830

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp
835 840 845

Asp Asp Asp Lys
850