



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014139552, 01.03.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.03.2013

Дата регистрации:
15.08.2017

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
02.03.2012 US 61/605,914;
08.03.2012 US 61/608,255;
23.10.2012 US 61/717,404

(43) Дата публикации заявки: 20.04.2016 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 15.08.2017 Бюл. № 23

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 30.09.2014

(86) Заявка РСТ:
US 2013/028630 (01.03.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/130981 (06.09.2013)

Адрес для переписки:
119019, Москва, Гоголевский бульвар, 11, 3 этаж,
Гоулингз Интернэшнл Инк.

(72) Автор(ы):

ГУРНЕТТ-БАНДЕР Аннэ (US),
АРРЕКУБИЕТА Карлос (US),
ЛОВИ Израэль (US)

(73) Патентообладатель(и):

РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЗ, ИНК.
(US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2008014733 A1, 07.02.2008. RU
2008144913 A, 27.05.2010.

(54) ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К ТОКСИНАМ CLOSTRIDIUM DIFFICILE

(57) Реферат:

Изобретение относится к биохимии. Описаны полностью человеческие антитела, которые связываются либо с токсином А, либо с токсином В Clostridium difficile, или как с токсином А, так и с токсином В. Также описаны композиции, содержащие указанные антитела, и способам их применения. Антитела по настоящему изобретению пригодны для нейтрализации токсинов из C. difficile, таким образом, обеспечивая средства лечения заболевания и симптомов, связанных с инфекцией C. difficile, в

том числе средство для лечения диареи или псевдомембранозного колита, вызванного C. difficile. Антитела также могут ограничивать тяжесть и/или продолжительность основного заболевания или могут ограничивать количество, продолжительность и/или тяжесть рецидивов или обострений заболевания, объясняемого присутствием C. difficile. Антитела по настоящему изобретению также могут быть пригодны для диагностики инфицирования C. difficile. 9 н. и 25 з.п. ф-лы, 5 ил., 10 табл., 11 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 16/12 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2014139552, 01.03.2013**

(24) Effective date for property rights:
01.03.2013

Registration date:
15.08.2017

Priority:

(30) Convention priority:
02.03.2012 US 61/605,914;
08.03.2012 US 61/608,255;
23.10.2012 US 61/717,404

(43) Application published: **20.04.2016** Bull. № 11

(45) Date of publication: **15.08.2017** Bull. № 23

(85) Commencement of national phase: **30.09.2014**

(86) PCT application:
US 2013/028630 (01.03.2013)

(87) PCT publication:
WO 2013/130981 (06.09.2013)

Mail address:
119019, Moskva, Gogolevskij bulvar, 11, 3 etazh,
Goulingz Interneshnl Ink.

(72) Inventor(s):

GURNETT-BANDER Anne (US),
ARRECUBIETA Carlos (US),
LOWY Israel (US)

(73) Proprietor(s):

REGENERON FARMASYUTIKAZ, INK. (US)

(54) HUMAN ANTIBODIES TO CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXINS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: completely human antibodies that bind either to toxin A, or to toxin B Clostridium difficile, or both to toxin A and toxin B. Formulations containing these antibodies and methods for their application are also described. The antibodies of the present invention are useful for neutralisation of toxins from C. difficile, thus providing agents for treatment of disease and symptoms associated with C. difficile

infection, including an agent for treatment of diarrhea or pseudomembranous colitis caused by C. difficile. Antibodies may also limit the severity and/or duration of the underlying disease or limit the amount, duration and/or severity of disease relapse or exacerbation due to the presence of C. difficile.

EFFECT: antibodies of this invention may also be suitable for infection diagnosis.

34 cl, 5 dwg, 10 tbl, 11 ex

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к человеческим антителам и к антиген-связывающим фрагментам человеческих антител, которые специфично связываются с токсином А и/или токсином В *Clostridium difficile*, композициям, содержащим такие антитела, и терапевтическим способам применения таких антител.

Предшествующий уровень техники

Clostridium difficile (*C. difficile*) является грамположительной, анаэробной, спорообразующей бактерией, которая является основной причиной приобретаемого в стационарном лечебном заведении заболевания желудочно-кишечного тракта у людей, приводящее в результате к появлению симптомов, варьирующих до тяжелой диареи и колита. Полагают, что лечение антибиотиками широкого спектра действия, такими как ампициллин, амоксициллин, цефалоспорины, фторхинолоны и клиндамицин, может привести в результате к нарушению нормальной кишечной флоры, что затем обеспечит возможность колонизации *C. difficile* в кишечнике (Kelly and Lamont, (1998), *Ann. Rev. Med.* 49:375-90). Лечение инфекций *C. difficile* может включать прекращение или модификацию применения антибиотиков широкого спектра действия и нуждается в начале лечения при помощи конкретных противоклостридиальных антибиотиков, таких как, например, ванкомицин, метронидазол или фидаксомицин.

Диарея и воспаление, наблюдаемые у страдающих от инфекции *C. difficile* больных, считается последствием продуцирования бактерией двух токсинов, энтеротоксина (токсин А) и цитотоксина (токсин В). Токсины А и В *C. difficile* являются глюкозилтрансферазами с высокой молекулярной массой, которые ингибируют членов семейства Rho ГТФаз. Токсин А имеет молекулярную массу 308 кДа, а токсин В имеет молекулярную массу 270 кДа. Как токсин А, так и токсин В дезактивируют малые ГТФазы, такие как Rho, Rac и Cdc42, путем глюкозилирования треонинового остатка. Ингибирование таких ГТФаз обуславливает выключение каскадов передачи сигналов, приводящее к деполимеризации цитоскелета, транскрипции генов определенных стресс-зависимых протеинкиназ, понижению синтеза фосфатидилинозитолбисфосфата и возможно даже к потере клеточной полярности. Утрата цитоскелетной структуры в результате приводит к округлению стенок, и такая утрата структуры может обуславливать реакцию несовместимости с *C. difficile*. В анализах округления клеток токсин В является по меньшей мере в 1000 раз более токсичным, чем токсин А.

Токсины А и В *C. difficile* являются на 63% гомологичными по аминокислотному содержанию и имеют сходные третичные структуры (Davies, АН, (2011), *Biochem. J.*, 436:517-526). С-концевая треть каждого токсина состоит из последовательностей, называемых «клостридиальные повторяющиеся олигопептиды» (CROP), которые в высокой степени антигенны. Оставшиеся N-концевые две трети токсинов А и В являются менее сходными друг с другом в отношении гомологии последовательностей, однако, именно эта часть каждого белка обладает глюкозилтрансферазной активностью.

Подтверждение о роли токсина А и/или токсина В в появлении диареи и воспаления после инфицирования *C. difficile* проистекают из результатов наблюдений в животных моделях. Например, введение пероральных доз токсинов симулирует заболевание (Kelly and Lamont, (1998), *Ann. Rev. Med.* 49:375-90). Мутантные штаммы с недостатком токсина А и В характеризуются уменьшенной или измененной вирулентностью (Lyras D, O'Connor JR, Howarth PK et al., *Nature* 458(7242), 1176-1179 (2009); Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP, *Nature* 15, 467(7316), 711-713 (2010).). Кроме того, было показано, что применение поликлональных антител по отношению к токсинам защищало хомяков от заболевания (Gianasca et al., (1999), *Infect. Immun.* 66(2): 527-38).

В клинических условиях исследования показали, что имеет место корреляция между наличием антител к токсину А или токсину В и защитой от ассоциированной с *C. difficile* диареи и рецидивов заболевания (Warny, M. et al., (1994), *Inf. Immun.* 62(2): 384-389; Kyne, L. et al. (2001), *Lancet* 357:189-193; Leav, B.A., (2010), *Vaccine* 28(4):965-969). Разработка антитела к токсину связана с асимптоматическими носителями (Kyne, L. et al. (2000), *NEJM* 342(6), 390-397). Вместе с тем клинические испытания с применением комбинации антител к токсину А и к токсину В *C. difficile* в сочетании с метронидазолом или ванкомицином приводили в результате к уменьшению частоты рецидивирующей инфекции *C. difficile* (Lowy, I. et al., (2010), *NEJM* 362(3):197-205).

Моноклональные антитела к токсину А *C. difficile* были описаны у Wilkins, et al. в патенте США №4879218. Кроме того, Rothman et al. описали мышинное моноклональное антитело, которое дает перекрестную реакцию с токсинами А и В *C. difficile*. Вместе с тем Coughlin et al. описали моноклональное антитело, специфичное к токсину В *C. difficile*, которое не давало перекрестную реакцию с токсином А. Были описаны другие антитела к токсинам *C. difficile* (см., например, US 7151159, US 7625559, US 8236311, US 8257709, патентные публикации США №№2009/0087478; US 2010/0233182, US 2010/0233181, US 2012/0288508, US 2012/012160, US 2011/0020356, US 2012/0121607, EP 1766093 B1, EP 1024826 B1, EP 1568378 A1, EP 2305303 A2, EP 2305293 A2, EP 2405940 A1, EP 2261253 A2, WO 2006/121422, WO 2011/130650, WO 2010/094970, WO 2009/108652, WO 2011/063346 и WO 2005/058353).

Краткое описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к полностью человеческим моноклональным антителам (mAb) и к их антиген-связывающим фрагментам, которые специфично связываются либо с токсином А, либо с токсином В, продуцируемыми *Clostridium difficile* (*C. difficile*), или которые связываются как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile* (т.е. человеческим моноклональным антителам, которые дают перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В). Такие антитела могут быть пригодны для нейтрализации токсичности, ассоциированной либо с токсином А, либо с токсином В, либо с обоими, и фактически могут служить для уменьшения тяжести первичного ассоциированного с *C. difficile* состояния или заболевания, или уменьшения количества, продолжительности или тяжести рецидива заболевания, или ослабления по меньшей мере одного симптома, связанного с ассоциированным с *C. difficile* состоянием или заболеванием. Такие антитела можно применять отдельно или в сочетании со вторым средством, пригодным для лечения ассоциированного с *C. difficile* состояния или заболевания. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, специфичные к токсину А, токсину В или обоим, можно давать в терапевтических целях в сочетании со вторым средством для уменьшения тяжести первичного ассоциированного с *C. difficile* состояния или заболевания, или для уменьшения количества, продолжительности или тяжести рецидива заболевания, или ослабления по меньшей мере одного симптома, связанного с ассоциированным с *C. difficile* состоянием или заболеванием. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела можно применять профилактически в качестве самостоятельного терапевтического средства для защиты пациентов, которые подвержены риску развития ассоциированного с *C. difficile* состояния или заболевания. Например, некоторые группы пациентов могут быть подвержены риску развития вызванного *C. difficile* состояния или заболевания, включая пожилых пациентов или пациентов, которые имеют хронические и/или сопутствующие первопричинные медицинские состояния, которые могут вызывать у них предрасположенность к возникновению инфекции *C. difficile*. Другие подверженные

рisku группы пациентов включают пациентов, которых госпитализировали на протяжении длительных периодов времени и которые принимают антибиотики широкого спектра действия, которые могут нарушить нормальную кишечную флору и которые могут вызывать у них предрасположенность к возникновению инфекции *C. difficile*.

- 5 Недавно полученные данные указывают на то, что пациенты, принимающие ингибиторы протонного насоса (PPI), подвержены риску развития ассоциированной с *C. difficile* диареи (Yearsley, K. et al. (2006), *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24(4):613-619; Lowe, DO, et al. *Clin. Infect. Dis.* (2006), 43(10):1272-1276). Другие группы пациентов, подверженных риску развития инфекции *C. difficile*, включают пациентов, которые проходят любой
- 10 тип иммуносупрессивной терапии, такой как без ограничения противоопухолевое лекарственное средство, общая лучевая терапия для лечения определенных видов злокачественных опухолей или лекарственное средство или схема приема лекарственного средства для предупреждения отторжения ткани или органа после трансплантации. Пациенты, которые получают трансплантат гемопоэтических стволовых клеток (HSCT),
- 15 могут быть подвержены особенно высокому риску развития инфекции *C. difficile* по причине длительных госпитализаций, приема антибиотиков широкого спектра действия и связанного с химиотерапией нарушения барьеров слизистых кишечника (Thibault, A. et al., ((1991), *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 12:345-8; Anand, A. et al. (1993), *Clin. Infect. Dis.* 17:109-13). Пациенты, которые получают трансплантат цельного органа, также
- 20 могут подвергаться риску развития инфекции *C. difficile*. В группу риска включены страдающие от аутоиммунного заболевания пациенты или пациенты на диализе. Последние исследования показали, что пациенты, которые получали либо аутологические, либо аллогенные HSCT, подвергались не только большему риску развития инфекции *C. difficile*, но также такие пациенты подвергались более высокому
- 25 риску развития желудочно-кишечной реакции "трансплантат против хозяина" (GI-GVHD) (Alonso, CD., et al. (2012), *Clin Inf. Dis.* 54:1053-1063). В то время как настоящее исследование четко показало, что инфекции *C. difficile* представляли собой частое раннее осложнение после HSCT, точное взаимоотношение или взаимосвязь между инфекциями *C. difficile* (CDI) и GVHD, вовлекающими в патологический процесс GI-тракт, необходимо исследовать более подробно. У любых таких групп пациентов может
- 30 быть положительный результат от лечения при помощи антител по настоящему изобретению, при получении отдельно или в сочетании со вторым средством, таким как метронидазол, ванкомицин или фидаксомицин.

- Антитела по настоящему изобретению могут иметь полную длину (например,
- 35 антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антиген-связывающую часть (например, фрагмент Fab, F(ab')₂ или scFv) и могут быть модифицированы с затрагиванием функциональности, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., (2000), *J. Immunol.* 164:1925-1933).

- Соответственно, согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к
- 40 выделенному полностью человеческому моноклональному антителу или его антиген-связывающему фрагменту, которые связываются либо с токсином А, либо с токсином В, или которые связываются или вступают в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В *Clostridium difficile*, причем:

- а) выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично
- 45 связываются с токсином А *Clostridium difficile*, содержат три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности варибельного участка тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 98, 114, 130, 146 и 162; и три

определяющих комплементарность участка легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности вариабельного участка легкой цепи (LCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 106, 122, 138, 154 и 170;

5 б) выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В *Clostridium difficile*, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности HCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338 и 354; и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности LCVR,
10 выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346 и 362; и

с) выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент, которые связываются или вступают в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В *Clostridium difficile*, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в аминокислотной
15 последовательности HCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 34, 50, 66 и 82; и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 42, 58, 74 и 90.

Согласно одному варианту осуществления человеческое моноклональное антитело, которое связывается/вступает в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с
20 токсином В *C. difficile*, специфично связывается с карбоксиконцевым связывающимся с рецептором доменом (CBD) как токсина А (CBD-A: SEQ ID NO: 375), так и токсина В (CBD-B:SEQ ID NO: 376) *C. difficile*.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются/вступают в перекрестную
25 реакцию как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile*, связываются с токсином А и токсином В с K_D , равной или меньше 10^{-7} М.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются/вступают в перекрестную
30 реакцию как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile*, содержат три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариабельного участка тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 34, 50, 66 и 82; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариабельного участка легкой цепи (LCVR), выбранной
35 из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 42, 58, 74 и 90. Способы и методики определения CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны из уровня техники и могут быть применены для определения CDR в раскрываемых в настоящем описании указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR.

Иллюстративные условные обозначение, которые можно применять для определения границ CDR, включают, например, обозначение по Kabat, обозначение по Chothia и
40 AbM-обозначение. В общих чертах, обозначение по Kabat основано на вариабельности последовательности, обозначение по Chothia основано на расположении структурных петельных участков, и AbM-обозначение является нечто средним между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest,"
45 National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); A1-Lazikani et al., (1997), J. Mol. Biol. 275: 927-948; and Martin et al., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56:9268-9272. Находящиеся в общем доступе базы данных также доступны для определения последовательностей CDR в антителе.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или

его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются/вступают в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile*, содержат HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 34, 50, 66 и 82.

5 Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются/вступают в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile*, содержат LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 42, 58, 74 и 90.

10 Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются/вступают в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile*, содержат (а) HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 34, 50, 66 и 82; и (b) LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 42, 58, 74 и 90.

15 Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются/вступают в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile*, содержат:

(а) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 36, 52, 68 и 84;

(b) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 38, 54, 70 и 86;

(с) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 40, 56, 72 и 88;

25 (d) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 44, 60, 76 и 92;

(f) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 46, 62, 78 и 94; и

(g) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, 48, 64, 80 и 96.

30 Согласно одному варианту осуществления человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются/вступают в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile*, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 20, 22 и 24, соответственно, и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 28, 30 и 32, соответственно.

35 Согласно одному варианту осуществления человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются/вступают в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile*, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 36, 38 и 40, соответственно, и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 44, 46 и 48, соответственно.

45 Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются/вступают в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile*, содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26, 34/42, 50/58, 66/74 и 82/90.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или

его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются/вступают в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile*, содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 18/26 и 34/42.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются/вступают в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В, связываются с:

эпитопом внутри карбоксиконцевого связывающегося с рецептором домена как токсина А, так и токсина В *Clostridium difficile*, причем антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26 и 34/42; или

эпитопом, находящимся за пределами карбоксиконцевого связывающегося с рецептором домена как токсина А, так и токсина В *Clostridium difficile*, причем антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50/58, 66/74 и 82/90.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к полностью человеческому моноклональному антителу или его антиген-связывающему фрагменту, которые связываются/вступают в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile*, причем у антитела или его фрагмента наблюдают одну или несколько из следующих характеристик: (i) содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 34, 50, 66 и 82, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (ii) содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 42, 58, 74 и 90, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (iii) содержит домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 40, 56, 72 и 88, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности и домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, 48, 64, 80 и 96, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (iv) содержит домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 36, 52, 68 и 84, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 38, 54, 70 и 86, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 44, 60, 76 и 92, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 46, 62, 78 и

94, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (v) связывается с токсином А и с токсином В с K_D , равной или менее 10^{-9} М.

Согласно одному варианту осуществления полностью человеческое моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются/вступают в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile*, содержат последовательность HCDR1, характеризующуюся формулой $X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8$ (SEQ ID NO: 381), где X^1 представляет собой Gly, X^2 представляет собой Phe, Val или Ile, X^3 представляет собой Thr, Ala или Ser, X^4 представляет собой Phe или Leu, X^5 представляет собой Ser, Arg или Asn, X^6 представляет собой Gly, Thr, Asp или Ser, X^7 представляет собой His или Tyr и X^8 представляет собой Gly, или Glu; последовательность HCDR2, характеризующуюся формулой $X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8$ (SEQ ID NO: 382), где X^1 представляет собой Ile, X^2 представляет собой Leu, Ser или Asp, X^3 представляет собой Tyr, Phe или Ser, X^4 представляет собой Asp или Ser, X^5 представляет собой Gly, X^6 представляет собой Ser, Gly, Asp или Thr, X^7 представляет собой Ser, His или Ile и X^8 представляет собой Glu, Gln или Ile; последовательность HCDR3, характеризующуюся формулой $X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-X^{15}-X^{16}-X^{17}$ (SEQ ID NO: 383), где X^1 представляет собой Ala или Val, X^2 представляет собой Lys или Arg, X^3 представляет собой Gly или Glu, X^4 представляет собой Ser или Arg, X^5 представляет собой Ile, Asp или Tyr, X^6 представляет собой Leu, Ser или Asp, X^7 представляет собой Asn, Ser, Gln или His, X^8 представляет собой Arg, Tyr или Ser, X^9 представляет собой Pro или Gly, X^{10} представляет собой Phe или Tyr, X^{11} представляет собой Asp, Gly или Tyr, X^{12} представляет собой Tyr, X^{13} представляет собой Phe, Leu или отсутствует, X^{14} представляет собой Gly или отсутствует, X^{15} представляет собой Met или отсутствует, X^{16} представляет собой Asp или отсутствует, X^{17} представляет собой Val или отсутствует; последовательность LCDR1, характеризующуюся формулой $X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}$ (SEQ ID NO: 384), где X^1 представляет собой Gln, X^2 представляет собой Ser или Glu, X^3 представляет собой Ile, Val или Thr, X^4 представляет собой Leu или Asp, X^5 представляет собой Phe, Lys или Asn и X^6 представляет собой Ser или Trp, X^7 представляет собой Ser или отсутствует, X^8 представляет собой Asn, Asp или отсутствует, X^9 представляет собой Asn или отсутствует, X^{10} представляет собой Lys или отсутствует, X^{11} Ile, Asn или отсутствует, X^{12} представляет собой Tyr или отсутствует; последовательность LCDR2, характеризующуюся формулой $X^1-X^2-X^3$ (SEQ ID NO: 385), где X^1 представляет собой Trp, Lys или Arg, X^2 представляет собой Ala или Thr и X^3 представляет собой Ser; и последовательность LCDR3, характеризующуюся формулой $X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9$ (SEQ ID NO: 386), где X^1 представляет собой Gln или His, X^2 представляет собой Gln

или Glu, X³ представляет собой Tyr, X⁴ представляет собой Tyr или Asn, X⁵ представляет собой Thr или Ser, X⁶ представляет собой Leu, Ala или Tyr, X⁷ представляет собой Pro, Phe или Ser, X⁸ представляет собой Leu, Phe или Arg и X⁹ представляет собой Thr или Ala.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к выделенному человеческому моноклональному антителу или его антиген-связывающему фрагменту, которые специфично связываются с токсином A Clostridium difficile, причем антитело содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей HCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 98, 114, 130, 146 и 162; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 106, 122, 138, 154 и 170.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином A Clostridium difficile, содержат HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 98, 114, 130, 146 и 162.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином A Clostridium difficile, содержат LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 106, 122, 138, 154 и 170.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином A Clostridium difficile, содержат (a) HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 98, 114, 130, 146 и 162; и (b) LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 106, 122, 138, 154 и 170.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином A Clostridium difficile, содержат:

(a) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 100, 116, 132, 148 и 164;

(b) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 102, 118, 134, 150 и 166;

(c) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 104, 120, 136, 152 и 168;

(d) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 108, 124, 140, 156 и 172;

(e) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 110, 126, 142, 158 и 174; и

(f) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 112, 128, 144, 160 и 176.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином A Clostridium difficile, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 148, 150 и 152, соответственно, и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 156, 158 и 160, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или

его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином A Clostridium difficile, содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154 и 162/170.

5 Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином A Clostridium difficile, содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146/154.

10 Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином A Clostridium difficile, связываются с:

эпитопом внутри карбоксиконцевого связывающегося с рецептором домена токсина A Clostridium difficile, причем антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/15 10, 98/106, 130/138, 146/154 и 162/170; или

эпитопом, находящимся за пределами карбоксиконцевого связывающегося с рецептором домена токсина A Clostridium difficile, причем антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 114/122.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к 20 полностью человеческому моноклональному антителу или его антиген-связывающему фрагменту, которые специфично связываются с токсином A C. difficile, причем у антитела или его фрагмента наблюдают одну или несколько из следующих характеристик: (i) содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 98, 114, 130, 146 и 162, или по существу сходной с ней 25 последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (ii) содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 106, 122, 138, 154 и 170, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по 30 меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (iii) содержит домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 104, 120, 136, 152 и 168, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и 35 домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 112, 128, 144, 160 и 176, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (iv) 40 содержит домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 100, 116, 132, 148 и 164, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 102, 118, 134, 150 и 166, или по существу сходной с ней 45 последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 108, 124, 140, 156 и 172, или по существу сходной с ней

последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 110, 126, 142, 158 и 174, или по существу сходной с ней

последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (v) демонстрирует K_D , равную или мене 10^{-9} М; (vi) демонстрирует нейтрализацию токсина А (при концентрации 32 пМ) с IC50, варьирующей в диапазоне от приблизительно 7 пМ до приблизительно 65 пМ в анализе жизнеспособности клеток.

Согласно одному варианту осуществления полностью человеческое моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином А *C. difficile*, содержат последовательность HCDR1, характеризующуюся формулой $X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8$ (SEQ ID NO: 387), где X^1 представляет собой Gly или Arg, X^2 представляет собой Phe, X^3 представляет собой Asn или Thr, X^4 представляет собой Phe, X^5 представляет собой Gly, Ser, Asn или Thr, X^6 представляет собой Thr, Ser, Asn или Asp, X^7 представляет собой His, Tyr или Phe и X^8 представляет собой Asp, Val, Ala или Tyr; последовательность HCDR2, характеризующуюся формулой

$X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8$ (SEQ ID NO: 388), где X^1 представляет собой Leu или Ile, X^2 представляет собой Thr, Gly, Ser или Trp, X^3 представляет собой Ser, Thr, Gly, представляет собой Phe, X^4 представляет собой Thr, Val, Tyr, Val, Asp или Gly, X^5 представляет собой Gly, X^6 представляет собой Gly, Asp, Ser или Ala, X^7 представляет собой Ser, Thr, Asn или Ala и X^8 представляет собой Ala, Thr, Glu, Lys или отсутствует; последовательность HCDR3, характеризующуюся формулой

$X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-X^{15}-X^{16}-X^{17}-X^{18}-X^{19}-X^{20}-X^{21}-X^{22}-X^{23}-X^{24}$ (SEQ ID NO: 389), где X^1 представляет собой Ala, X^2 представляет собой Lys или Arg,

X^3 представляет собой Thr, Asp или Ser, X^4 представляет собой Phe, Arg, His, Ala или Leu, X^5 представляет собой Asn, Gly или Lys, X^6 представляет собой Trp, Gly, Asp или Ile, X^7 представляет собой Asn, Ala или Phe, X^8 представляет собой Ser, Asn, Tyr, Gly или Asp, X^9 представляет собой Tyr, Ile, Ala, Thr, Glu или Leu, X^{10} представляет собой Phe,

Tyr, Ser, Gly или отсутствует, X^{11} представляет собой Asp, Ser, Gly или отсутствует, X^{12} представляет собой Tyr, Phe, Ser, Pro или отсутствует, X^{13} представляет собой Tyr, Leu или отсутствует, X^{14} представляет собой Tyr, Phe или отсутствует, X^{15} представляет собой Gly, Asn, Asp или отсутствует, X^{16} представляет собой Met, Arg, Tyr или отсутствует, X^{17} представляет собой Asp или отсутствует, X^{18} представляет собой Tyr, Val или отсутствует, X^{19} представляет собой Tyr или отсутствует, X^{20} представляет собой Tyr или отсутствует, X^{21} представляет собой Gly или отсутствует, X^{22} представляет собой Met или отсутствует, X^{23} представляет собой Asp или отсутствует, X^{24} представляет собой Val или отсутствует; последовательность LCDR1, характеризующуюся формулой

$X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7$ (SEQ ID NO: 390), где X^1 представляет собой Gln, X^2 представляет

собой Ser, Asp или Thr, X³ представляет собой Ile или Val, X⁴ представляет собой Ser, X⁵ представляет собой Thr, Asn или Ser, X⁶ представляет собой Tyr, Trp, Phe или Ser, и X⁷ представляет собой Tyr или отсутствует; последовательность LCDR2,

5 характеризующуюся формулой X¹-X²-X³ (SEQ ID NO: 391), где X¹ представляет собой Gly, Ala, Lys или Thr, X² представляет собой Ala, Thr или Val и X³ представляет собой Ser; и последовательность LCDR2, характеризующуюся формулой X¹-X²-X³-X⁴-X⁵-X⁶-X⁷-X⁸-X⁹-X¹⁰ (SEQ ID NO: 392), где X¹ представляет собой Gln или
10 отсутствует, X² представляет собой Gln, Lys или отсутствует, X³ представляет собой Tyr, Asn или отсутствует, X⁴ представляет собой Gly, Asn, Thr, Tyr, His или отсутствует, X⁵ представляет собой Asn, Ser или отсутствует, X⁶ представляет собой Ser, Ala, Tyr, Asp, Trp или отсутствует, X⁷ представляет собой Leu, Pro, Ser или отсутствует, X⁸
15 представляет собой Tyr, Phe, Arg, Pro или отсутствует, X⁹ представляет собой Thr, Tyr или отсутствует и X¹⁰ представляет собой Thr.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к выделенному человеческому моноклональному антителу или его антиген-связывающему
20 фрагменту, которые специфично связываются с токсином В Clostridium difficile, причем антитело содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей HCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338 и 354; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных
25 последовательностей LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346 и 362.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В Clostridium difficile, содержат HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной
30 из группы, состоящей из SEQ ID NO: 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338 и 354.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В Clostridium difficile, содержат LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной
35 из группы, состоящей из SEQ ID NO: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346 и 362.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В Clostridium difficile, содержат (а) HCVR с аминокислотной последовательностью,
40 выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338 и 354; и (b) LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346 и 362.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В Clostridium difficile, содержат:

(а) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340 и 356;

(b) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342 и 358;

(с) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344 и 360;

5 (d) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348 и 364;

(е) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350 и 366; и

10 (f) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352 и 368.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В *Clostridium difficile*, содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 276, 278 и 280, соответственно, и аминокислотные
15 последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 284, 286 и 288, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В *Clostridium difficile*, содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/
20 250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346 и 354/362.

Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В *Clostridium difficile*, содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 274/282.

25 Согласно одному варианту осуществления выделенное человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В *Clostridium difficile*, связываются с:

эпитопом внутри карбоксиконцевого связывающегося с рецептором домена токсина В *Clostridium difficile*, причем антитело содержит пару аминокислотных
30 последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 178/186; или

эпитопом, находящимся за пределами карбоксиконцевого связывающегося с рецептором домена токсина В *Clostridium difficile*, причем антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282 и 290/298.

35 Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к полностью человеческому моноклональному антителу или его антиген-связывающему фрагменту, которые специфично связываются с токсином В *C. difficile*, причем у антитела или его фрагмента наблюдают одну или несколько из следующих характеристик: (i) содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы,
40 состоящей из SEQ ID NO: 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338 и 354, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (ii) содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298,
45 314, 330, 346 и 362, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (iii) содержит домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 184, 200, 216,

232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344 и 360, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352 и 368, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (iv) содержит домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340 и 356, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342 и 358, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348 и 364, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350 и 366, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (v) демонстрирует K_D , равную или менее 10^{-9} М; (vi) демонстрирует нейтрализацию токсина В (при концентрации 0,03 пМ) с IC_{50} , варьирующей в диапазоне от приблизительно 25 пМ до приблизительно 320 пМ в анализе жизнеспособности клеток.

Согласно одному варианту осуществления полностью человеческое моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В *C. difficile*, содержат последовательность HCDR1, характеризующуюся формулой $X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}$ (SEQ ID NO: 393), где X^1 представляет собой Gly, X^2 представляет собой Phe, Asp или Tyr, X^3 представляет собой Thr, Asn, Ser или Val, X^4 представляет собой Phe или Val, X^5 представляет собой Ser, Arg, Lys, Glu или Thr, X^6 представляет собой Ser, Ile, Asp или Arg, X^7 представляет собой Phe, Tyr или Asn, X^8 представляет собой Gly, Ala, Ser или Tyr; X^9 представляет собой Ala или отсутствует, и X^{10} представляет собой Ala или отсутствует; последовательность HCDR2, характеризующуюся формулой $X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9$ (SEQ ID NO: 394), где X^1 представляет собой Ile или Thr, X^2 представляет собой Ser, Gly, Tyr или Asn, X^3 представляет собой Thr, Gly, Tyr, Trp, Pro или Ser, X^4 представляет собой Asp, Ser, Asn, Arg, Lys или Asp, X^5 представляет собой Gly, Ser или Thr, X^6 представляет собой Ser, Asp, Gly, Lys или Asn, X^7 представляет собой Lys, Arg, Asn, Ser, Trp или Gly, X^8 представляет собой Lys, Thr, Ile или Tyr, X^9 представляет собой His или отсутствует;

последовательность HCDR3, характеризующуюся формулой

$X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-X^{15}-X^{16}$ (SEQ ID NO: 395), где X^1

представляет собой Ala или Val, X^2 представляет собой Arg, Lys, Thr или Ser, X^3

5 представляет собой Val, Gly, Asp, Arg или Tyr, X^4 представляет собой Gly, Trp, Arg, Lys

или Asn, X^5 представляет собой Glu, Tyr, Arg, Ser или Trp, X^6 представляет собой Leu,

Tyr, Ser, Pro или Asn, X^7 Leu, Asp, Tyr, Ser или Asp, X^8 представляет собой Asn, Ser, Phe,

Lys, Arg, Asp или Gly, X^9 представляет собой Tyr, Gly, Phe, Asp, Trp или Val, X^{10}

10 представляет собой Ser, Tyr, Asn, Asp или отсутствует, X^{11} представляет собой Tyr, Leu,

Val, Gly или отсутствует, X^{12} представляет собой Tyr, Leu, Phe, Val или отсутствует, X^{13}

представляет собой Asn, Gly, Asp, Phe или отсутствует, X^{14} представляет собой Tyr, Met,

Asp или отсутствует, X^{15} Asp, Tyr или отсутствует, и X^{16} представляет собой Val или

15 отсутствует; последовательность LCDR1, характеризующуюся формулой

$X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7$ (SEQ ID NO: 396), где X^1 представляет собой Gln, Leu, or Arg, X^2

представляет собой Gly, Asp или Ser, X^3 представляет собой Ile или Val, X^4 представляет

собой Arg, Ser, Gly или Tyr, X^5 представляет собой Ser или Asn, X^6 представляет собой

20 Trp, His, Asn, Phe, Ser или Asp, и X^7 представляет собой Tyr или отсутствует;

последовательность LCDR2, характеризующуюся формулой $X^1-X^2-X^3$ (SEQ ID NO: 397),

где X^1 представляет собой Ala, Ser, Asp или Gly, X^2 представляет собой Ala или Thr, и

25 X^3 представляет собой Ser; и последовательность LCDR3, характеризующуюся формулой

$X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9$ (SEQ ID NO: 398), где X^1 представляет собой Gln, His или

Leu, X^2 представляет собой Gln, X^3 представляет собой Ala, Tyr, Arg, Asp, His или Val,

X^4 представляет собой Tyr, Gly, Asn, Ser, Ile или Lys, X^5 представляет собой Ser, Leu,

30 Pro, Ile, Asn, Thr или Gly, X^6 представляет собой Phe, Tyr, Trp или Ser, X^7 представляет

собой Pro, X^8 представляет собой Leu, Pro, Phe, Val или Tyr, и X^9 представляет собой

Thr.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к

35 выделенному антителу или его антиген-связывающему фрагменту, которые конкурируют

за специфичное связывание с токсином А и/или токсином В *C. difficile* с антителом или

антиген-связывающим фрагментом, содержащим определяющие комплементарность

участки (CDR) варибельного участка тяжелой цепи (HCVR), причем HCVR имеет

аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID

40 NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306,

322, 338 и 354; и CDR варибельного участка легкой цепи (LCVR), причем LCVR имеет

аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID

NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314,

330, 346 и 362.

Согласно соответствующему варианту осуществления настоящее изобретение

45 относится к выделенному антителу или его антиген-связывающий фрагменту, которые

конкурируют за специфичное связывание с токсином А и/или токсином В *C. difficile* с

антителом или антиген-связывающим фрагментом, содержащим CDR тяжелой и легкой

цепи, которые содержатся в парах последовательностей тяжелой и легкой цепей,

выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26, 34/42, 146/154 и 274/282.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антиген-связывающему фрагменту, которые связываются с одним эпитопом на токсине А и/или токсине В *C. difficile* как антитело или антиген-связывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность участки (CDR) 5 варибельного участка тяжелой цепи (HCVR), причем HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338 и 354; и CDR 10 варибельного участка легкой цепи (LCVR), причем LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346 и 362.

Согласно соответствующему варианту осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антиген-связывающему фрагменту, которые связываются с одним эпитопом на токсине А и/или токсине В *C. difficile* как антитело 15 или антиген-связывающий фрагмент, содержащие CDR тяжелой и легкой цепи, которые содержатся в парах последовательностей тяжелой и легкой цепей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26, 34/42, 146/154, 274/282.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по настоящему изобретению антитела могут взаимодействовать или связываться с, аминокислотными остатками 20 468-863 карбоксиконцевого связывающегося с рецептором домена продуцируемого *Clostridium difficile* токсина А, последовательность которого показана в SEQ ID NO: 375. Этот участок соответствует аминокислотным остаткам, находящимся в диапазоне остатков 2315-2710 из SEQ ID NO: 378 (токсин А полной длины). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по настоящему изобретению антитела могут 25 взаимодействовать или связываться с эпитопом на карбоксиконцевом связывающемся с рецептором домене, продуцируемого *Clostridium difficile* токсина А, причем эпитоп выбран из группы, состоящей из остатков 468-488 из SEQ ID NO: 375, остатков 510-530 из SEQ ID NO: 375, остатков 602-610 из SEQ ID NO: 375, остатков 644-703 из SEQ ID NO: 375, остатков 724-794 из SEQ ID NO: 375, остатков 799-814 из SEQ ID NO: 375 и остатков 30 858-863 из SEQ ID NO: 375. Такие остатки соответствуют аминокислотным последовательностям, обнаруженным в последовательности полной длины токсина А, имеющей SEQ ID NO: 378, с определенными участками, выявленными как остатки 2315-2335 из SEQ ID NO: 378, остатков 2357-2377 из SEQ ID NO: 378, остатков 2449-2457 из SEQ ID NO: 378, остатков 2491-2550 из SEQ ID NO: 378, остатков 2571-2641 из SEQ ID NO: 378, остатков 2646-2661 из SEQ ID NO: 378 и остатков 2705-2710 из SEQ ID NO: 378. 35 Согласно одному варианту осуществления антитело, которое связывается или взаимодействует с эпитопом в карбоксиконцевом связывающемся с рецептором домене продуцируемого *Clostridium difficile* токсина А, выбранным из группы, состоящей из остатков 468-488 из SEQ ID NO: 375, остатков 510-530 из SEQ ID NO: 375, остатков 602-40 610 из SEQ ID NO: 375, остатков 644-703 из SEQ ID NO: 375, остатков 724-794 из SEQ ID NO: 375, остатков 799-814 из SEQ ID NO: 375 и остатков 858-863 из SEQ ID NO: 375, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 146/154. Согласно одному варианту осуществления антитело, которое связывается или взаимодействует с эпитопом в карбоксиконцевом связывающемся с рецептором домене 45 продуцируемого *Clostridium difficile* токсина А, выбранным из группы, состоящей из остатков 468-488 из SEQ ID NO: 375, остатков 510-530 из SEQ ID NO: 375, остатков 602-610 из SEQ ID NO: 375, остатков 644-703 из SEQ ID NO: 375, остатков 724-794 из SEQ ID NO: 375, остатков 799-814 из SEQ ID NO: 375 и остатков 858-863 из SEQ ID NO: 375,

комбинировано со вторым антителом, которое специфично связывается с токсином В Clostridium difficile, в фармацевтической композиции. Согласно одному варианту осуществления второе антитело, которое взаимодействует или связывается с токсином В Clostridium difficile, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 274/282.

В соответствии со вторым аспектом настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела к токсину А и/или к токсину В или их фрагменты. Также настоящее изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии, содержащим нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению, и клеткам-хозяевам, в которые были введены такие векторы, в качестве способов получения антител посредством культивирования клеток хозяев в условиях, позволяющих происходить продукции антител, и выделения полученных антител.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, содержащему HCVR, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289, 305, 321, 337 и 353, или практически идентичной последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологию с ней.

Согласно одному варианту осуществления HCVR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 33, 145 и 273.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его фрагмент дополнительно содержит LCVR, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297, 313, 329, 345 и 361, или практически идентичной последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологию с ней.

Согласно одному варианту осуществления LCVR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 41, 153 и 281.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение также относится к антителу или антиген-связывающему фрагменту антитела, содержащему домен HCDR3, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 215, 231, 247, 263, 279, 295, 311, 327, 343 и 359, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и домен LCDR3, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 223, 239, 255, 271, 287, 303, 319, 335, 351 или 367, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, дополнительно содержащему домен HCDR1, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 211, 227, 243, 259, 275, 291, 307, 323, 339 и 355, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и домен HCDR2, кодируемый нуклеотидной

последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 213, 229, 245, 261, 277, 293, 309, 325, 341 и 357, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и домен LCDR1, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 203, 219, 235, 251, 267, 283, 299, 315, 331, 347 и 363, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и домен LCDR2, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 221, 237, 253, 269, 285, 301, 317, 333, 349 или 365, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

В соответствии с третьим аспектом настоящее изобретение относится к человеческому антителу или антиген-связывающему фрагменту, специфичному к токсину А и/или токсину В *C. difficile*, содержащему HCVR, кодируемый сегментами нуклеотидной последовательности, происходящими от V_H, D_H и J_H последовательностей зародышевой линии, и LCVR, кодируемый сегментами нуклеотидной последовательности, происходящими от V_K и J_K последовательностей зародышевой линии, с комбинациями, которые показаны в Таблице 2.

Настоящее изобретение относится к антителам с модифицированными профилями гликозилирования. В некоторых областях применения может быть пригодна модификация, удаляющая нежелательные сайты гликозилирования, или, например, удаление фукозного фрагмента для повышения функции антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277: 26733). В других областях применения для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC) можно выполнить модификацию гликозилирования.

В соответствии с четвертым аспектом настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно выделенное полностью человеческое моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются либо с токсином А, либо с токсином В *C. difficile*, или которые связываются как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile*, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное полностью человеческое моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются только с токсином А *C. difficile*, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное полностью человеческое моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который специфично связывается только с токсином В *C. difficile*, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей два полностью человеческих моноклональных антитела или их антиген-связывающие фрагменты, одно из которых специфично связывается с токсином А, а другое специфично связывается с токсином В *C. difficile*, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической

композиции, содержащей одно полностью человеческое моноклональное антитело с двойным связыванием (антитело, которое связывается как с токсином А, так и с токсином В) и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей два полностью человеческих связывающих моноклональных антитела с двойным связыванием (антитело, которое связывается как с токсином А, так и с токсином В) и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Двойные антитела, применяемые в фармацевтической композиции, могут распознавать и/или связывать один эпитоп на токсине А или токсине В, могут распознавать и/или связывать различные эпитопы на токсине А или токсине В. Следует понимать, что для достижения необходимых результатов в группе нуждающихся в такой терапии пациентов в фармацевтической композиции можно применять любую описанную в настоящем документе комбинацию антител. Например, в композиции можно применять два антитела, которые распознают и/или связывают только токсин А. Альтернативно, в композиции можно применять два антитела, которые распознают и/или связывают только токсин В. Согласно одному варианту осуществления в композиции можно комбинировать одно антитело, которое распознает/связывает только токсин А или токсин В, с антителом с двойным связыванием. Согласно одному варианту осуществления одно антитело, которое распознает/связывает только токсин А можно комбинировать с одним антителом, которое распознает/связывает только токсин В, и эту комбинацию можно применять для композиции.

Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит полностью человеческое моноклональное антитело, которое связывается с карбоксиконцевым связывающимся с рецептором доменом как токсина А, так и токсина В *C. difficile*, имеющее любую одну или несколько из описанных в настоящем документе характеристик. Антитело, которое связывается с карбоксиконцевым связывающимся с рецептором доменом как токсина А, так и токсина В *C. difficile* связывается как с токсином А, так и с токсином В с K_D равной или менее 10^{-7} М.

Согласно одному варианту осуществления композиция содержит антитело, которое связывается как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile* и имеет пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26, 34/42, 50/58, 66/74 и 82/90.

Согласно одному варианту осуществления композиция содержит антитело, которое связывается как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile* и имеет пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26 и 34/42.

Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно антитело, которое связывается с токсином *Clostridium difficile*, причем антитело выбрано из следующих:

а) выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином А *Clostridium difficile*, причем антитело содержит три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей варибельного участка тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 98, 114, 130, 146 и 162; и три определяющих комплементарность участка легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей варибельного участка легкой цепи (LCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 106, 122, 138, 154 и 170;

б) выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В *Clostridium difficile*, причем антитело содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей HCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338 и 354; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346 и 362; и

с) выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент, которые связываются/вступают в перекрестную реакцию как с токсином А, так и с токсином В *Clostridium difficile*, причем антитело содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей HCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 34, 50, 66 и 82; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 42, 58, 74 и 90.

Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит выделенное первое полностью человеческое моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином А *Clostridium difficile*, как описано в настоящем документе, и выделенное второе полностью человеческое моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В *Clostridium difficile*, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Согласно одному варианту осуществления композиция содержит по меньшей мере одно антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином А *Clostridium difficile*, и по меньшей мере одно антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В *Clostridium difficile*, причем:

а) антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином А, содержат три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей вариабельного участка тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 98, 114, 130, 146 и 162; и три определяющих комплементарность участка легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей вариабельного участка легкой цепи (LCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 106, 122, 138, 154 и 170; и причем

б) антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В, содержат три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей HCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338 и 354; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346 и 362.

Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит:

а) выделенное первое полностью человеческое моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином А *Clostridium difficile*, содержащие HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 98, 114, 130, 146 и 162; и LCVR с

аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 106, 122, 138, 154 и 170; и

б) выделенное второе полностью человеческое моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В *Clostridium difficile*, содержащие HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338 и 354; и LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346 и 362.

10 Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит выделенное первое полностью человеческое моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином А *C. difficile*, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154 и 162/170; и
15 выделенное второе полностью человеческое моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В *C. difficile*, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346 и 354/362.

20 Согласно другому варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит выделенное первое полностью человеческое моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином А *C. difficile*, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 146/154; и выделенное второе полностью человеческое антитело или его антиген-
25 связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В *C. difficile*, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 274/282.

Согласно соответствующему варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит:

30 а) выделенное первое человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином А *Clostridium difficile*, содержащие HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 148, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 150, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 152, LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 156, LCDR2
35 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 158, LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 160;

б) выделенное второе человеческое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В *Clostridium difficile*, содержащие HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 276, HCDR2 с аминокислотной
40 последовательностью SEQ ID NO: 278, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 280, LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 284, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 286, LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 288; и

с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

45 Согласно одному варианту осуществления антитела по настоящему изобретению или композиции, содержащие одно или несколько антител по настоящему изобретению, можно применять для нейтрализации либо токсина А, либо токсина В, либо как токсина А, так и токсина В любого штамма *Clostridium difficile*.

Согласно одному варианту осуществления антитела по настоящему изобретению или композиции, содержащие одно или несколько антител по настоящему изобретению, можно применять для нейтрализации токсина А и/или В гипервирулентного штамма *Clostridium difficile*.

5 Согласно одному варианту осуществления антитела по настоящему изобретению или композиции, содержащие одно или несколько антител по настоящему изобретению, можно применять для нейтрализации токсина А и/или В штамма BI/NAP1/027.

Согласно одному варианту осуществления антитела по настоящему изобретению или композиции, содержащие одно или несколько антител по настоящему изобретению, можно применять для нейтрализации токсина А и/или В штамма BI/NAP1/027, причем 10 штамм BI/NAP1/027 выбран из группы, состоящей из VA5, VA17, 6336 и 6443.

Согласно одному варианту осуществления композицию антител, содержащую первое антитело, которое специфично связывается с токсином А, можно вводить отдельно в виде отдельной композиции, и композицию антител, содержащую второе антитело, 15 которое специфично связывается с токсином В, также можно вводить в виде отдельной композиции. Каждую композицию можно получить для введения пациенту в отдельных шприцах, или устройствах для введения, или ампулах. При раздельном составлении в виде двух композиций обе композиции можно доставлять раздельно, причем одну композицию антител вводят непосредственно перед другой композицией антител. 20 Альтернативно, две композиции антител можно смешивать вместе незадолго до введения и вводить одновременно.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию антитела или антиген-связывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению и второго 25 терапевтического средства.

Вторым терапевтическим средством может быть низкомолекулярное лекарственное средство, белок/полипептид, антитело, молекула нуклеиновой кислоты, такая как антисмысловая молекула, или siRNA. Второе терапевтическое средство может иметь искусственное или естественное происхождение.

30 Вторым терапевтическим средством может быть любое средство, которое преимущественно скомбинировано с антителом или его фрагментом по настоящему изобретению, например, пробиотик, антибиотик, анатоксин, вакцина от *C. difficile* или второе отличное антитело к токсину А и/или токсину В *C. difficile*.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вторым терапевтическим 35 средством может быть средство, которое способствует препятствованию возникновения или уменьшению любого возможного побочного эффекта(ов), связанного с антителом или антиген-связывающим фрагментом антитела по настоящему изобретению, при появлении такого побочного эффекта(ов).

Также будет понятно, что антитела и фармацевтически приемлемые композиции по 40 настоящему изобретению можно использовать в разновидностях комбинированной терапии, иначе говоря, антитела и фармацевтически приемлемые композиции можно вводить одновременно, перед или после одного или нескольких других необходимых терапевтических средств или медицинских процедур. При конкретной комбинации терапий (терапевтических средств или процедур) для использования в комбинированной 45 схеме будут учтены совместимость необходимых терапевтических средств и/или процедур и подлежащего достижению необходимого терапевтического эффекта. Также будет понятно, что при помощи используемых разновидностей терапии можно достичь необходимый эффект для одного нарушения (например, антитело можно вводить

одновременно с другим средством, применяемым для лечения такого же заболевания) или можно достичь различные эффекты (например, контроль любых отрицательных действий). Применяемые в настоящем описании дополнительные терапевтические средства, которые в норме вводят для лечения или предупреждения конкретного заболевания или состояния, являются пригодными для лечения такого заболевания, или состояния.

При совместном введении множества терапевтических средств дозировки можно соответствующим образом скорректировать, как известно из уровня техники.

Согласно пятому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния, или лечения по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанных с указанным состоянием или заболеванием, или предупреждения развития ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния у пациента, подверженного такому риску, причем способ предусматривает введение пациенту эффективного количества антитела или его антиген-связывающего фрагмента, которые связываются с токсином А и/или токсином В *C. difficile*; или фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество антитела или его антиген-связывающего фрагмента, которые связываются с токсином А и/или токсином В *Clostridium difficile*, с тем, чтобы ассоциированное с *Clostridium difficile* заболевание или состояние либо предупредить, либо уменьшить по тяжести и/или продолжительности, или предупредить или облегчить по меньшей мере один симптом или осложнение, связанные с указанным состоянием или заболеванием, или уменьшить его частоту и/или продолжительность или тяжесть рецидивов или обострений, вызванных *Clostridium difficile*.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению одного или нескольких антител по настоящему изобретению или фармацевтических композиций, содержащих одно или несколько антител по настоящему изобретению, при производстве лекарственного препарата для применения при лечении пациента, страдающего от ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния, или лечения по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанных с указанным состоянием или заболеванием, или предупреждения развития ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния у пациента, подверженного такому риску, причем ассоциированное с *Clostridium difficile* заболевание или состояние либо предупреждают, либо уменьшают по тяжести и/или продолжительности, или предупреждают или облегчают по меньшей мере один симптом или осложнение, связанные с указанным состоянием или заболеванием, или уменьшают его частоту и/или продолжительность или тяжесть рецидивов или обострений, вызванных *Clostridium difficile*. По меньшей мере один симптом или осложнение, связанные с ассоциированными с *Clostridium difficile* состоянием или заболеванием, могут быть выбраны из группы, состоящей из анорексии, боли в животе, вздутия живота, диареи с кровотечением или без него, обезвоживания, расстройства пищеварения, псевдомембранозного колита, полной или сегментной резекции толстого кишечника, сопровождающейся лихорадкой и системной инфекцией (сепсисом), смертельного исхода, обострения вызванного *Clostridium difficile* состояния или заболевания и отторжения трансплантированной ткани или органа.

Согласно одному варианту осуществления пациент, подлежащий лечению при помощи антител по настоящему изобретению или при помощи фармацевтических композиций, содержащих одно или несколько антител по настоящему изобретению, инфицирован

гипервирулентным изолятом *Clostridium difficile*, таким как принадлежащий группе BI/NAP1/027, или может подвергаться риску развития инфекции, вызванной гипервирулентным штаммом, как описано в настоящем документе.

5 Согласно соответствующему варианту осуществления антитела по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию, содержащую одно или несколько антител по настоящему изобретению, можно применять для нейтрализации токсинов, продуцируемых гипервирулентным штаммом *Clostridium difficile*, таким как без ограничения любой из принадлежащих группе штаммов BI/NAP1/027. В такие гипервирулентные штаммы включены клинические изоляты, обозначаемые в настоящем
10 документе VA5, VA17, 6336 и 6443, которые описаны в настоящем документе в Примере 10.

Согласно одному варианту осуществления пациент, подверженный риску развития ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния, который может получить благоприятный эффект от лечения при помощи антител по настоящему
15 изобретению или при помощи композиции, содержащей одно или несколько антител по настоящему изобретению, может быть выбран из пожилого пациента (возрастом ≥ 65), пациента, который имеет иммунную недостаточность в связи с первопричинной болезнью или в связи с введением иммуносупрессивных терапевтических средств, пациента, у которого есть некоторое первопричинное медицинское состояние, которое
20 может вызывать у него предрасположенность к возникновению инфекции *Clostridium difficile*, пациента, госпитализированного на протяжении длительного периода времени (одна неделя или более), пациента, которого лечили на протяжении продолжительного периода времени (≥ 14 дней) антибиотиками широкого спектра действия, пациента со злокачественной опухолью, проходящего трансплантацию пациента и пациента,
25 подвергаемого терапии средствами, такими как без ограничения ингибитор протонного насоса или ингибитор гистаминового рецептора H₂, которые применяют для лечения заболеваний или состояний желудочно-кишечного тракта для уменьшения или лечения кислотности желудочного сока, гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (GERD), язв желудка или тонкой кишки или изжоги.

30 Согласно одному варианту осуществления пациентом, подверженным риску развития ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния, является пациент со злокачественной опухолью. Согласно соответствующему варианту осуществления пациент со злокачественной опухолью проходит лечение при помощи противоопухолевого лекарственного средства или проходит лучевую терапию для
35 лечения злокачественной опухоли.

Согласно одному варианту осуществления пациентом, подверженным риску развития ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния, является проходящий трансплантацию пациент. Согласно соответствующему варианту осуществления
40 проходящим трансплантацию пациентом является пациент, получающий трансплантат гемопоэтических стволовых клеток или трансплантат твердой ткани или цельного органа. В соответствии с определенными вариантами осуществления проходящий трансплантацию пациент подвергается лечению иммуносупрессивным лекарственным средством или любым лекарственным средством, препятствующим отторжению трансплантата, или он является пациентом, который проходит лечение согласно схеме
45 приема лекарственного средства для предупреждения отторжения после трансплантации трансплантируемых ткани или органа.

Согласно одному варианту осуществления антитело вводят в терапевтических целях (вводят после того, как инфекция была установлена, и дают в течение всего курса

лечения инфекции) пациенту, страдающему от ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния или страдающего по меньшей мере от одного симптома или осложнения, ассоциированного с таким состоянием или заболеванием. Согласно одному варианту осуществления антитело вводят в профилактических целях (вводят до развития инфекции) пациенту, подверженному риску развития ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния или подверженному риску развития по меньшей мере одного симптома или осложнения, ассоциированного с вызванным *Clostridium difficile* состоянием или заболеванием. Например, такие "пациенты, подверженные риску развития инфекции *Clostridium difficile*", включают пожилых (возрастом 65 лет или старше), или пациентов, которые имеют иммунную недостаточность в связи с болезнью или в связи с введением иммуносупрессивных терапевтических средств, или пациентов, у которых есть некоторое первопричинное медицинское состояние, которое может вызывать у них предрасположенность к возникновению инфекции *Clostridium difficile*, или пациентов, госпитализированных на протяжении длительных периодов времени (обычно одна неделя или дольше), или пациентов, которых лечили на протяжении длительного периода времени антибиотиками широкого спектра действия (обычно 14 дней или дольше), пациентов, подвергаемых терапии ингибиторами протонного насоса для лечения заболеваний и состояний желудочно-кишечного тракта. Другими пациентами, подверженными риску развития инфекции *Clostridium difficile*, являются такие пациенты, которым необходима трансплантация ткани или органа, которые могут проходить лечение при помощи иммуносупрессирующих лекарственных средств для предупреждения отторжения ткани или органа. Такая группа пациентов включает людей, которым необходима трансплантация либо аутологических, либо аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Необходимая для таких пациентов длительная госпитализация, помимо назначения высоких доз средств для антибиотикотерапии с целью предупреждения других типов инфекций, может вызывать у этих пациентов предрасположенность к возникновению первичной инфекции *C. difficile*. Альтернативно, если нуждающийся в такой трансплантации пациент уже страдает от инфекции *C. difficile*, или у него появились симптомы инфекции *C. difficile*, то такой пациент может быть склонен к рецидиву или обострению такой инфекции при назначении высокой дозы средств для антибиотикотерапии, с последующей иммуносупрессивной терапией для предупреждения отторжения трансплантата. Кроме того, такие проходящие трансплантацию пациенты могут подвергаться не только риску появления инфекции *C. difficile*, но также и риску отторжения трансплантата в связи со связанной с желудочно-кишечным трактом реакцией трансплантат против хозяина (GI-GVHD), которая, по видимому, усиливается у проходящих трансплантацию пациентов, страдающих от инфекции *C. difficile* (см., Alonso, C.D. et al., (2012), Clin. Infect. Dis. 54, 1053-1063. Взаимосвязь между инфекцией *C. difficile* и GVHD, вовлекающими GI-тракт, в настоящее время не ясна, но очевидно, что такая группа пациентов будет получать благоприятный эффект от терапии антителами к токсину А и/или к токсину В по настоящему изобретению. В то же время предусмотрено, что такую группу пациентов можно лечить терапевтически (после начала инфекции), также предполагают, что такие пациенты будут получать благоприятный эффект от профилактического (доинфекционного) введения любого из антител по настоящему изобретению. Пациентам, которые являются претендентами на лечение при помощи антител по настоящему изобретению, можно вводить композиции, содержащие одно или несколько антител, любым подходящим для введения путем доставки, включая без ограничения внутривенную инъекцию или подкожную

инъекцию.

Согласно одному варианту осуществления фармацевтическую композицию, содержащую антитела по настоящему изобретению, вводят пациенту в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами, пригодными для лечения

5 инфекции *C. difficile*.

Согласно одному варианту осуществления одно или несколько терапевтических средств можно выбрать из группы, состоящей из анатоксина, пробиотика, вакцины против *C. difficile* (например, инактивированных токсинов А и В, таких как без ограничения АСМ-CDIFF™), антибиотика (например, метронидазола, ванкомицина

10 или фидаксомицина), другого отличного антитела к токсину А и/или В *C. difficile* и любого другого паллиативного средства терапии, пригодного для уменьшения тяжести заболевания от *C. difficile*, или для уменьшения частоты рецидивов вызванного *C. difficile* заболевания, или для ослабления по меньшей мере одного симптома, связанного с ассоциированным с *C. difficile* состоянием или заболеванием.

Согласно другому варианту осуществления один симптом или одно осложнение, связанные с ассоциированным с *C. difficile* состоянием или заболеванием, выбраны из группы, состоящей из диареи, псевдомембранозного колита, обострения/рецидива вызванного *Clostridium difficile* состояния или заболевания и отторжения

15 трансплантированной ткани или органа.
Другие варианты осуществления станут понятны при рассмотрении последующего подробного описания.

Краткое описание чертежей

На фигуре 1 показаны структуры доменов токсина А и токсина В *Clostridium difficile* (см. Davies АН, et al., Biochem. J. (2011), 436:517-526).

На фигуре 2 приведен график, показывающий результаты анализов обострения у хомячков как процент хомячков, выживших после лечения клиндамицином и ванкомицином после заражения *C. difficile*, и влияние лечения при помощи mAb к токсину А и токсину В. Все антитела давали подкожно один раз в день на дни 3-6. Антителами

25 положительного контроля являются антитела сравнения, антитела к токсину А (контроль I) и антитела к токсину В (контроль II). Всем животным давали ванкомицин в виде пероральной дозы в количестве 10 мг/кг на дни 1-3. (• с пунктирной линией: контроль PBS; Δ с пунктирной линией: отрицательный изотипический контроль в количестве 10 мг/кг; □ со сплошной линией: контроль I/контроль II в количестве 5 мг/кг каждого (5/5); ♦ со сплошной линией: Н1Н3330Р/Н1Н3347Р в количестве 5 мг/кг

35 каждого (5/5)).

На фигуре 3 приведен график, показывающий результаты анализов обострения у хомячков как процент хомячков, выживших после лечения клиндамицином и ванкомицином после заражения *C. difficile*, и влияние mAb к токсину А и токсину В. Все антитела давали подкожно один раз в день 3. Антителами положительного контроля являются антитела сравнения, антитела к токсину А (контроль I) и антитела к токсину В (контроль II). Всем животным давали ванкомицин в виде пероральной дозы в

40 количестве 10 мг/кг на дни 1-3. (Δ с пунктирной линией: отрицательный изотипический контроль в количестве 10 мг/кг; □ со сплошной линией: контроль I/контроль II в количестве 5 мг/кг каждого (5/5); ♦ со сплошной линией: Н1Н3330Р/Н1Н3347Р в количестве 5 мг/кг каждого (5/5); ○ со сплошной линией: контроль I/контроль II в количестве 2 мг/кг каждого (2/2); □ со сплошной линией: Н1Н3330Р/Н1Н3347Р в количестве 2 мг/кг каждого (2/2)).

На фигуре 4 приведен график, на котором показаны результаты по выживаемости

в модели острой инфекции *C. difficile* у хомяков. Результаты показаны в виде процента хомяков, выживших при заражении *C. difficile* (день 0) после лечения клиндамицином (день -1). Все антигены давали подкожно каждые 4 дня, начиная от дня -3, до дня 0. Антигены вводили в количестве 50 мг/кг каждого (50/50), 16,6 мг/кг каждого (16,6/16,6), 5,5 мг/кг каждого (5,5/5,5) и 1,85 мг/кг каждого (1,85/1,85). (∇ со сплошной линией: неинфицированные; • с пунктирной линией: контроль PBS; Δ с пунктирной линией: отрицательный изотипический контроль в количестве 100 мг/кг; ◆ со сплошной линией: H1N3330P/H1N3347P в количестве 50 мг/кг каждого (50/50); ○ со сплошной линией: H1N3330P/H1N3347P в количестве 16,6 мг/кг каждого (16,6/16,6); | со сплошной линией: H1N3330P/H1N3347P в количестве 5,5 мг/кг каждого (5,5/5,5); + со сплошной линией: H1N3330P/H1N3347P в количестве 1,85 мг/кг каждого (1,85/1,85).

На фигуре 5 приведен график, на котором показаны результаты по выживаемости в модели острой инфекции *C. difficile* у хомяков. Результаты показаны в виде процента хомяков, выживших при заражении *C. difficile* (день 0) после лечения клиндамицином (день -1). Все антигены давали подкожно каждые 4 дня, начиная от дня -3, до дня 0. Антигены вводили в количестве 20 мг/кг каждого (20/20) или в количестве 5 мг/кг каждого (5/5). (∇ со сплошной линией: неинфицированные; • с пунктирной линией: контроль PBS; Δ с пунктирной линией: отрицательный изотипический контроль в количестве 40 мг/кг; □ со сплошной линией: контроль I/контроль II в количестве 20 мг/кг каждого (20/20); ☒ со сплошной линией: контроль I/контроль II в количестве 5 мг/кг каждого (5/5); ◆ со сплошной линией: H1N3330P/H1N3347P в количестве 20 мг/кг каждого (20/20); ◇ со сплошной линией: H1N3330P/H1N3347P в количестве 5 мг/кг каждого (5/5)).

Подробное описание настоящего изобретения

Перед описанием настоящих способов необходимо понять, что настоящее изобретение не ограничено конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Также следует понять, что применяемая в настоящем описании терминология приведена только с целью описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, то все применяемые в настоящем документе технические и научные термины имеют такое же значение, которое обычно понимается рядовым специалистом в настоящей области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что при осуществлении на практике или испытании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в настоящем документе, далее описаны предпочтительные способы и материалы.

Определения

Термин "токсин А" (также называемый как "tcdA") относится к белку токсина А, продуцируемому *Clostridium difficile* (также называемой в настоящем документе как "*C. difficile*"). Аминокислотная последовательность "токсина А" представлена в GenBank под номером доступа CAA63564, а также называется в настоящем документе как SEQ ID NO: 378. Токсин А кодируется нуклеиновой кислотой, обозначенной в настоящем документе как SEQ ID NO: 377, а также находится в GenBank под номером доступа AM180355.

Термин "токсин В" (также называемый как "tcdB") относится к белку токсина В,

продуцируемому *Clostridium difficile*. Аминокислотная последовательность "токсина В" представлена в GenBank под номером доступа CAJ67492, а также называется в настоящем документе как SEQ ID NO: 380. Токсин В кодируется нуклеиновой кислотой, обозначенной в настоящем документе как SEQ ID NO: 379, а также находится в GenBank

под номером доступа AMI 80355.

"Карбоксиконцевой связывающийся с рецептором домен токсина А и токсина В *Clostridium difficile*" относится к части токсина А и токсина В *C. difficile*, который является ответственным за связывание с клеткой-мишенью, таким образом обеспечивая последующий опосредованный рецептором эндоцитоз. Описанная в настоящем документе аминокислотная последовательность карбоксиконцевого связывающегося с рецептором домена токсина А показана в SEQ ID NO: 375. Аминокислотная последовательность карбоксиконцевого связывающегося с рецептором домена токсина В показана в SEQ ID NO: 376. Различные домены токсина А и токсина В *C. difficile* проиллюстрированы на фигуре 1 и дополнительно описаны в работе Davies et al. (Davies, АН, et al., Biochem. J. (2011), 436:517-526).

Обозначение "BI/NAP1/027" для *Clostridium difficile* относится к высоковирулентной группе изолятов *Clostridium difficile*, которых ассоциируют с повышением заболеваемости и смертности по всей территории Европы и Северной Америки (Loo, VG, et al., (2005), N Engl J Med, 353:2442-9; McDonald, LC et al. (2006), Emerg Infect Dis, 12:409-15; McDonald, LC, et al., (2005), N Engl J Med, 353:2433-41; Redelings, MD, et al., (2007), Emerg Infect Dis 13:1417-9). Обозначение "BI/NAP1/027" дополнительно относится к штамму North American pulsed-field type I (NAP1), риботипа 027 и группы BI по результатам анализа с применением рестрикционной эндонуклеазы. Изначально он был определен в 1980х годах, но изначально его не определяли как устойчивый к более новым фторхинолоновым средствам, и до 2000 года он не носил эпидемический характер (Warny, M. et al., (2005), Lancet 366:1079-84; Kelly, CP, et al., N Engl J Med 359:1932-40). Штамм "BI/NAP1/027" *Clostridium difficile* также характеризуется повышенной продукцией токсина А и токсина В, присутствием дополнительного токсина (бинарный токсин), и повышенной устойчивостью к фторхинолонам (McDonald, LC, et al., (2005), N Engl J Med, 353:2433-41; Warny, M. et al., (2005), Lancet 366:1079-84).

Применяемый в настоящем документе термин "антитело" предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, в состав которых входят четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, взаимосвязанные дисульфидными связями (т.е., "молекул целого антитела"), а также его мультимеров (например, IgM) или его антиген-связывающих фрагментов. В состав каждой тяжелой цепи входят переменный участок тяжелой цепи ("HCVR" или "V_H") и константный участок тяжелой цепи (в его состав входят домены C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). В состав каждой легкой цепи входят переменный участок легкой цепи ("LCVR или "V_L") и константный участок легкой цепи (C_L). Участки V_H и V_L дополнительно можно подразделить на участки гипервариабельности, называемые определяющие комплементарность участки (CDR), чередующиеся с участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками (FR). В состав каждого V_H и V_L входят три CDR и четыре FR, располагающиеся от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению FR антитела (или его антиген-связывающего фрагмента) могут быть идентичными с человеческими последовательностями зародышевой линии или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем.

Аминокислотную консенсусную последовательность можно определить на основе анализа расположенных параллельно последовательностей двух или более CDR.

Также возможна замена одного или нескольких остатков CDR или исключение одного или нескольких CDR. В научной литературе описаны антитела, для функции связывания у которых не важны один или два CDR. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139) анализировали контактные участки между антителами и их антигенами на основе опубликованных кристаллических структур и пришли к выводу, что фактически приблизительно только от одной пятой до одной трети остатков CDR контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил множество антител, в которых один или два CDR не имели аминокислот, контактирующих с антигеном (см. также Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно определить на основании результатов предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не являются необходимыми), исходя из участков CDR по Kabat, лежащих за пределами CDR Chothia, посредством молекулярного моделирования и/или опытным путем. Если CDR или его остаток(остатки) исключены, то он обычно замещен на аминокислоту, занимающую соответствующее положение в другой последовательности человеческого антитела или консенсусной последовательности таких последовательностей. Положения для замены в CDR и аминокислотах для замены можно также подобрать опытным путем. Эмпирические замены могут быть консервативными или неконсервативными заменами.

Раскрываемые в настоящем документе полностью человеческие моноклональные антитела к токсину А и/или к токсину В могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR участках вариабельных доменов тяжелых и легких цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко выявить путем сравнения раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из находящихся в общем доступе баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение относится к антителам и к их антиген-связывающим фрагментам, которые получены из любой из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей, причем одна или несколько аминокислот в одном или нескольких каркасных и/или CDR участках являются мутировавшими по соответствующему остатку(остаткам) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или по соответствующему остатку(остаткам) другой последовательности человеческой зародышевой линии, или по консервативной аминокислотной замене соответствующего остатка(остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательности собирательно называются в настоящем документе как "мутации зародышевой линии"). Рядовой специалист в настоящей области, исходя из раскрываемых в настоящем документе последовательностей вариабельных участков тяжелых и легких цепей, легко может получить многочисленные антитела и антиген-связывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В соответствии с определенными вариантами осуществления все каркасные и/или CDR остатки в доменах V_H и/или V_L являются мутировавшими обратно до остатков, обнаруживаемых в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. Согласно другим вариантам осуществления только определенные остатки являются мутировавшими обратно до исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутировавшие остатки,

обнаруживаемые в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или мутировавшие остатки, обнаруживаемые только в CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько каркасных и/или CDR остатков являются мутировавшими в соответствующие остатки отличной последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой исходно было получено антитело). Вместе с тем, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных и/или CDR участках, в которой, например, некоторые отдельные остатки являются мутировавшими в соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или являются мутировавшими в соответствующий остаток отличной последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антиген-связывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко протестировать на предмет одного или нескольких необходимых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или увеличенные антагонистические или агонистические биологические свойства (при соответствующих обстоятельствах), уменьшенная иммуногенность и т.д. Настоящее изобретение относится к антителам и антиген-связывающим фрагментам, которые, в целом, получены таким способом.

Настоящее изобретение также относится к полностью человеческим моноклональным антителам к токсину А и/или к токсину В, содержащим варианты любой из раскрываемых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющих одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение относится к антителам к токсину А и к токсину В, имеющим аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из раскрываемых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR.

Применяемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" подразумевают как включающий антитела, имеющие переменные и константные участки, полученные из иммуноглобулиновых последовательностей человеческой зародышевой линии. Человеческие mAb по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые иммуноглобулиновой последовательностью человеческой зародышевой линии (например, мутации, введенные в результате неспецифического или сайт-направленного мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Тем не менее, применяемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" не подразумевают как включающий mAb, у которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих (например, мыши), были пришиты на человеческие последовательности FR.

Термин "специфично связывается с" или "связывается специфично с" или т.п. означает, что антитело или его антиген-связывающий фрагмент формирует с антигеном комплекс, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфичное связывание можно охарактеризовать равновесной константой диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно 1×10^{-6} М или менее (например, K_D с меньшим значением указывает на более прочное связывание). Способы определения,

специфично ли связываются две молекулы, хорошо известны в настоящей области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Как описано в настоящем документе, антитела были определены с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, которые специфично связываются либо с токсином А, либо специфично с токсином В из *C. difficile*, в то время как было определено, что другие специфично связываются с карбоксиконцевым связывающимся с рецептором доменом как токсина А, так токсина и В. Кроме того, в контексте настоящего документа мультиспецифические антитела, которые связываются с токсином А или токсином В и одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифическую молекулу, которая связывается с двумя различными участками токсина А или токсина В, тем не менее считают антителами, которые "специфично связывают".

Термин антитело с "высокой аффинностью" относится к mAb, имеющим аффинность связывания с токсином А или токсином В, выражаемую как K_D , составляющую по меньшей мере 10^{-8} М; предпочтительно 10^{-9} М; более предпочтительно 10^{-10} М, еще более предпочтительно 10^{-11} М, еще более предпочтительно 10^{-12} М, которую измеряют с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, или с помощью ELISA на аффинность в растворе.

Под термином "медленная скорость диссоциации", " K_{off} " или " k_d " подразумевают антитело, которое диссоциирует от токсина А, или токсина В, или обоих с константой скорости реакции $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или менее, предпочтительно $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или менее, которую измеряют с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™.

Применяемые в настоящем документе термины "антиген-связывающая часть" антитела, "антиген-связывающий фрагмент" антитела и т.п. включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывается с антигеном с формированием комплекса. Применяемые в настоящем документе термины "антиген-связывающая часть" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с токсином А, или токсином В, или обоими.

Согласно конкретным вариантам осуществления, антитело или фрагменты антитела по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как антибиотик, второе антитело к токсину А или В, или вакцина от *C. difficile*, или анатоксин, или любым другим терапевтическим фрагментом, пригодным для лечения вызванного *C. difficile* заболевания или состояния.

Применяемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" предназначен для обозначения антитела, которое практически не контактирует с другими антителами (Ab), имеющими отличные антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфично связывается с токсином А или токсином В, или его фрагмент, которые практически не контактируют с Ab, которые специфично связывают антигены, отличные от токсина А или токсина В).

Применяемые в настоящем документе термины "блокирующее антитело" или "нейтрализующее антитело", (или "антитело, которое нейтрализует активность токсина А и/или токсина В") предназначены для обозначения антитела, связывание которого с токсином А и/или токсином В приводит в результате к ингибированию по меньшей мере одной биологической активности токсина А и/или токсина В. Например, антитело по настоящему изобретению может способствовать предупреждению первичного

заболевания, вызванного *C. difficile*. Альтернативно, у антитела по настоящему изобретению можно наблюдать способность предупреждать рецидив или обострение вызванного *C. difficile* заболевания или по меньшей мере один симптом, вызванный инфекцией *C. difficile*, включая диарею или псевдомембранный колит. Такое ингибирование биологической активности токсина А и/или токсина В можно оценить путем измерения одного или нескольких показателей биологической активности токсина А и/или токсина В при помощи одного или более из нескольких стандартных анализов *in vitro* (таких как описанный в настоящем документе анализ нейтрализации) или *in vivo* анализов, известных из уровня техники (например, животные модели для проверки защиты от заражения *C. difficile* после введения одного или нескольких описанных в настоящем документе антител).

Применяемый в настоящем документе термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать в реальном времени биомолекулярные взаимодействия путем определения изменений концентраций белка в матрице биосенсора, например при помощи системы BIACORE™ Pharmacia Biosensor АВ, Уппсала, Швеция и Пискатауэй, Нью-Джерси).

Применяемый в настоящем документе термин " K_D " предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфичным антиген-связывающим сайтом в вариабельном участке молекулы антитела, известном как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Термин "эпитоп" также относится к сайту на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки. Он также относится к участку антигена, который связывается антителом. Эпитопы можно определить как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы обычно представляют собой подгруппу структурных эпитопов и имеют такие остатки, которые вносят непосредственный вклад в аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, т.е. состоящими из нелинейных аминокислот. В соответствии с определенными вариантами осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые являются химически активными поверхностными группировками таких молекул, как аминокислоты, сахарными боковыми цепями, фосфорильными группами или сульфонильными группами и, в соответствии с определенными вариантами осуществления, могут иметь характеристики, касающиеся трехмерной структуры, и/или характеристики удельного заряда.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный" в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента указывает на то, что при оптимальном выравнивании при помощи соответствующих нуклеотидных вставок или делеций с другой нуклеиновой кислотой (или комплементарной ей нитью) имеет место идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере у приблизительно 90%, и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований согласно результатам измерения при помощи любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, которые обсуждаются ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, характеризующаяся существенной идентичностью с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может в определенных случаях кодировать полипептид, имеющих такую же или по существу сходную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "по существу сходный" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, таком как посредством программ GAP или BESTFIT, с применением штрафов за открытие гэпов по умолчанию, имеют по меньшей мере 90% идентичность последовательности, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичность последовательности. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются по консервативным аминокислотным заменам. "Консервативная аминокислотная замена" является заменой, при которой аминокислотный остаток заменен на другой аминокислотный остаток, имеющий боковую цепь (группа R) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена практически не будет изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга по консервативным заменам, процент или степень сходства можно скорректировать до надлежащей по консервативной природе замены. Способы осуществления такой корректировки хорошо известны специалистам в настоящей области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol Biol.* 24: 307-331. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами включают: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серии и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат; и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативным замещением является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия RAM250, раскрытой в работе Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443 45. "Умеренно консервативное" замещение представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия RAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов обычно измеряют при помощи программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет сходные последовательности при помощи измерений сходства присвоенного различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно применять с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG Version 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать при помощи FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами, программы в GCG Version 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) выводит результаты выравнивания и процентную идентичность последовательности для участков с наилучшим совпадением между запрашиваемой и поисковой последовательностями (Pearson (2000) *supra*). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности

BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402.

Согласно конкретным вариантам осуществления антитело или фрагмент антитела для применения согласно способу по настоящему изобретению может быть

5 моноспецифическим, биспецифическим или мультиспецифическим. Мультиспецифические антитела могут быть специфичными к различным эпитопам одного целевого полипептида или могут содержать антиген-связывающие домены, специфичные к эпитопам более одного целевого полипептида. Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно применять в контексте настоящего

10 изобретения, включает применение первого домена C_H3 иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_H3 Ig, причем первый и второй домены C_H3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере по одной аминокислоте, и причем по меньшей мере одно аминокислотное отличие уменьшает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом без аминокислотного отличия. Согласно одному варианту

15 осуществления первый домен C_H3 Ig связывается с белком А, а второй домен Ig C_H3 содержит мутацию, которая уменьшает или ликвидирует связывание белка А, такую как модификация H95R (согласно нумерации экзонов IMGT; H435R согласно нумерации EU). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT;

20 Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить во втором C_H3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае mAb IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае mAb IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K,

25 E419Q и V422I согласно EU) в случае mAb IgG4. Описанные выше варианты формата биспецифических антител предусмотрены объемом настоящего изобретения.

Под фразой "терапевтически эффективное количество" подразумевают количество, которое производит необходимый эффект у того, кому его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и может быть установлено специалистом в настоящей

30 области техники при помощи известных методик (см., например, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

Общее описание настоящего изобретения

Clostridium difficile является грамположительной, спорообразующей, продуцирующей токсины бактерией, которая является основной причиной нозокомиальной,

35 ассоциированной с антибиотиками диареи и колита у людей (Bartlett, J.G. et al. (1978), N. Engl. J. Med. 298:531-534; Kyne, L., et al. (2001), Clin. N. Am. 30:753-777). Нарушение среды в толстом кишечнике, возникающее в результате введения антибиотиков широкого спектра действия, приводит к колонизации кишечника бактериями (Johnson, S.C. et al. (1990), Lancet 336:97-100). У большого процента такой группы пациентов, которые

40 становятся колонизированными *C. difficile*, развивается диарея, которая в определенных случаях приводит к псевдомембранозному колиту, который, как полагают, является последствием продукции *C. difficile* двух экзотоксинов, токсина А и токсина В. Лечение состоит из прекращения употребления вызывающего реакцию антибиотика, или изменений дозировки вызывающего реакцию антибиотика, или отсутствие изменения

45 вызывающего реакцию антибиотика с последующим введением метронидазола, ванкомицина или фидаксомицина. В то время как такая схема лечения обычно является успешной, у многих пациентов наблюдается обострение при прекращении терапии (Fekety, R., (1997), Am. J. Gastroenterology, 92:739-750). Вместе с тем, во многих случаях

бактерия *C. difficile* становится устойчивой к применяемой терапии, таким образом приводя к неудачным исходам лечения и в некоторых случаях повышенным процентам смертности (Dworczynski, A. et al. (1991), Cytobios. 65:149-153; Fekety, R. et al. (1993), JAMA, 269:71-75). Поэтому, существует потребность в более эффективных терапиях для борьбы с этим заболеванием и/или для предупреждения рецидива этого заболевания у пациентов, колонизированных *C. difficile*. Кроме того, существует потребность лечения пациентов, которые подвержены риску развития инфекции *C. difficile* посредством профилактического введения эффективного средства. В группу подверженных риску пациентов включены пожилые, в частности, пациенты возрастом 65 лет и старше, несмотря на то, что пациенты моложе 65 лет могут подвергаться более серьезному риску в зависимости от наличия любого первопричинного заболевания, которое может вызывать у них предрасположенность к инфицированию *C. difficile*. Пациенты, которые были инфицированы *C. difficile* ранее, могут подвергаться более серьезному риску возникновения рецидивов. Другие подверженные риску пациенты включают пациентов, которые предрасположены к инфекции *C. difficile* в связи с первопричинным медицинским состоянием, или пациентов, которых госпитализировали на протяжении длительного периода времени (по меньшей мере одна неделя или дольше) и/или которые проходят долгосрочное лечение (≥ 14 дней) при помощи антибиотиков широкого спектра действия, а также пациентов, которые принимают ингибиторы протонного насоса для лечения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (GERD), язв желудка и тонкой кишки и воспаления пищевода. Такие средства включают декслансопразол, эзомепразол, лансопразол, омепразол, натрия пантопразол или натрия рабепразол. Другие средства, которые находятся на стадии исследования для продажи пациенту, подверженному риску развития инфекции *C. difficile*, включают блокаторы H₂-гистаминовых рецепторов, такие как циметидин, фамотидин, низатидин и ранитидин. В других исследованиях отмечали возрастную заболеваемость ассоциированной с *C. difficile* диареей, более конкретно, увеличение пациентов возрастом старше 50 лет и повышение уровня смертности у пациентов возрастом старше 60 лет (Loo, VG, et al., (2005), N Engl J Med 353:2442-9). Фактически, это исследование было сопоставимо с результатами более раннего исследования, которое показало связанное с возрастом повышение встречаемости положительных анализов на токсин *C. difficile* (Karlström, O. et al. (1998), Clin Infect Dis 26:141-5).

Для удовлетворения потребности в более эффективной терапии против *C. difficile* было проведено множество исследований для определения того, можно ли антитела к токсину А и/или В, при применении отдельно или в качестве вспомогательной терапии, применять в качестве средства лечения такого заболевания или по меньшей мере в качестве средства предупреждения рецидива диареи или колита, ассоциированных с инфекцией *C. difficile*. (Corthier, et al. (1991), Infect. Immun. 59(3):1192-1195; Kink, J.A. and Willilams, J.A., (1998), Infect. Immun. 66(5):2018-2025; Lowy, I. et al. (2010), N. Engl. J. Med. 362(3):197-205; Babcock, G.J., et al.; (2006), Infection and Immunity, 74(11):6339-6347). Более конкретно, животные модели вызванной *C. difficile* инфекции применяли для исследования влияния антител к токсину А и/или токсину В *C. difficile* на первичную инфекции, а также на частоту обострения in vivo (Corthier, G. et al. (1991), Infect. Immun. 59(3):1192-1195; Kink, J.A. et al. (1998), Infect. Immun. 66(5):2018-2025; Babcock, G.J. et al. (2006), 74(11):6339-6347). Полученные результаты в животных моделях *C. difficile* показали значительный уровень защиты, таким образом побудив к дальнейшим клиническим испытаниям с применением антител к токсину А и к токсину В на больных заболеванием людях (Lowy, I., (2010), N. Engl. J. Med. 362(3):197-205).

У описанных в настоящем документе антител наблюдают специфичное связывание с токсином А и/или с токсином В *C. difficile*, и они могут быть пригодны для лечения пациентов, страдающих от вызванной *C. difficile* инфекции. Применение таких антител может представлять собой эффективное средство лечения пациентов, страдающих от первичной инфекции, вызванной *C. difficile*, или их можно применять для предупреждения обострения заболевания и сопутствующих симптомов, ассоциированных с заболеванием, или их можно применять для уменьшения тяжести диареи или колита, ассоциированных с первичной инфекцией или с рецидивом инфекции. Их можно применять отдельно или в качестве вспомогательной терапии с другими терапевтическими веществами или средствами, известными из уровня техники, для лечения инфекций *C. difficile*, такими как без ограничения антибиотикотерапия, например, при помощи метронидазола, ванкомицина или фидаксомицина. Их можно применять в сочетании с вакциной от *C. difficile*, или с применением анатоксина, или со вторым или третьим отличным антителом, специфичным к токсину А и/или В.

В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению комбинации антител по настоящему изобретению можно применять для лечения инфекции, обусловленной гипервирулентным штаммом *C. difficile*. Наиболее заметной группой гипервирулентных эпидемиологических изолятов на сегодняшний день является группа по названию "BI/NAP1/027". Ее ассоциируют со вспышками инфекций *C. difficile* по всей Европе и Северной Америке. Изоляты, которые подпадают под это определение, характеризуются повышенной продукцией токсина А и токсина В, наличием дополнительного токсина (бинарного токсина) и повышенной устойчивостью к фторхинолонам (McDonald, LC, et al., (2005), N Engl J Med 353:2433-41; Warny, ME, et al., (2005), Lancet 366:1079-84). Эту группу изолятов также можно называть как штаммы North American pulsed-field type 1 (NAP1), риботипа 027, группы BI. Эта группа штаммов содержит делецию в 18 пар оснований гена *tcdC*, и бинарный токсин, который она продуцирует, кодируется генами *cdtA* и *cdtB*. Согласно сообщениям эта группа продуцирует токсин А и токсин В в количествах, которые в 16 и 23 раза, соответственно, превышают количества у контрольных штаммов (Warny, ME, et al., (2005), Lancet 366:1079-84). Поскольку было показано, что антитела по настоящему изобретению нейтрализуют токсин, продуцируемый четырьмя различными клинически выделенными штаммами BI/NAP 1/027 *C. difficile* (VA5, VA17, 6336 и 6443), предусмотрено, что композиции, содержащие антитела по настоящему изобретению, можно вводить в терапевтических целях пациентам, страдающим от инфекции, вызванной указанными выше гипервирулентными штаммами *C. difficile*, или можно вводить в профилактических целях пациентам, которые подвержены риску развития инфекции, вызванной указанными в настоящем документе гипервирулентными штаммами, а также любыми другими клинически релевантными гипервирулентными штаммами. Средства, посредством которых определяют эти штаммы, известны специалистам в настоящей области техники, и такие способы могут включать гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) изолятов *C. difficile* (см., например, Fawley, WN, et al., (2002), J. Clin Microbiol 40:3546-7), ПЦР-анализы генов бинарных токсинов и частичных делеций гена *tcdC* (см., например, Goncalves, C. et al. (2004), J Clin Microbiol 42:1933-9; и Cohen, SH et al., (2000), J Infect Dis 181:659-63) и анализы с применением рестрикционной эндонуклеазы (см., например, Clabots, CR, et al., (1993), J Clin Microbiol 31:1870-5).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению получают от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как нативный, инактивированный токсин А (см. номер доступа в GenBank CAA63564

(SEQ ID NO: 378)) или токсин В (см. номер доступа в GenBank CAJ67492 (SEQ ID NO: 380)) *C. difficile*, или рекомбинантной, но инактивированной формой токсинов, или фрагментов токсинов, с последующей иммунизацией вторичным иммуногеном или иммуногенно активным фрагментом нативного токсина. Животных можно

5 иммунизировать либо только инактивированным токсином А, либо только инактивированным токсином В, либо одновременно как инактивированным токсином А, так и инактивированным токсином В. Токсины можно инактивировать либо до применения в качестве иммуногена с применением стандартных процедур получения анатоксинов, в том числе путем обработки формальдегидом, глутаральдегидом, пероксидом или обработкой кислородом (Relyveld, et al. *Methods in Enzymology*, 93:24, 10 1983, Woodrow and Levine, eds. *New Generation Vaccines*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1990). Другие средства инактивации заключаются в применении UDP-диальдегида (Genth et al., (2000), *Infect. Immun.* 68(3):1094-1101), который может содействовать сохранению нативной структуры токсина, по сравнению с другими способами инактивации, с 15 повышением, таким образом, вероятности начала продуцирования антител, которые более реактивны по отношению к нативному токсину.

Альтернативно, мутантные токсины от *C. difficile*, у которых наблюдали сниженную токсичность, можно получить с помощью стандартных рекомбинантных методик и применять в качестве иммуногенов (см., например, US 5085862, 5221618, 5244657, 20 5332583, 5358868 и 5433945). Такие мутанты могут содержать делеции или точечные мутации в активном сайте токсина.

Иммуноген может быть биологически активным и/или иммуногенным фрагментом нативного токсина А или токсина В или ДНК, кодирующей его активный фрагмент. Фрагмент может быть получен из N-концевого или С-концевого домена либо токсина 25 А, либо токсина В. Фрагмент может быть получен из любого из известных доменов токсина А или токсина В (см. фигуру 1), включая гликозилирующий ферментный домен (А), домен аутокаталитического процессинга (С), транслокационный домен (D) или связывающий домен (В). В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению иммуногеном является карбоксиконцевой связывающийся с рецептором домен токсина А, который соответствует аминокислотным остаткам от 30 приблизительно 1832 до 2710 из SEQ ID NO: 378. В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению иммуногеном является карбоксиконцевой связывающийся с рецептором домен токсина А, который показан в SEQ ID NO: 375. В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению иммуногеном является карбоксиконцевой связывающийся с рецептором домен токсина В, который соответствует аминокислотным остаткам от 35 приблизительно 1834 до 2366 из SEQ ID NO: 380. В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению иммуногеном является карбоксиконцевой связывающийся с рецептором домен токсина В, который показан в 40 SEQ ID NO: 376.

Аминокислотная последовательность полной длины токсина А из *C. difficile* показана как SEQ ID NO: 378.

Аминокислотная последовательность полной длины токсина В из *C. difficile* показана как SEQ ID NO: 380.

45 В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, которые специфично связываются с токсином А или токсином В *C. difficile* можно получить с помощью фрагментов вышеупомянутых участков или пептидов, которые выходят за пределы обозначенных участков на от приблизительно 5 до приблизительно 20

аминокислотных остатков за любой из N или C концов описанных в настоящем документе участков или за оба конца. В соответствии с определенными вариантами осуществления при получении специфичных к токсину А или токсину В антител можно применять любую комбинацию вышеупомянутых участков или их фрагментов. В соответствии с определенными вариантами осуществления для получения моноспецифичных, биспецифичных или мультиспецифичных антител можно применять любой один или несколько из вышеупомянутых участков токсина А или токсина В или их фрагментов.

Антиген-связывающие фрагменты антител

Если специально не указано иное, применяемый в настоящем документе термин "антитело" необходимо понимать как охватывающий молекулы антител, содержащих две иммуноглобулиновые тяжелые цепи и две иммуноглобулиновые легкие цепи (т.е. "целые молекулы антител"), а также их антиген-связывающие фрагменты. Применяемые в настоящем документе термины "антиген-связывающая часть" антитела, "антиген-связывающий фрагмент" антитела и т.п. включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывается с антигеном с формированием комплекса. Применяемые в настоящем документе термины "антиген-связывающая часть" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться либо с токсином А и/или токсином В С. difficile. Фрагмент антитела может включать фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fv, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенный CDR. Антиген-связывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, от целых молекул антител с применением любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генетической инженерии, предусматривающие манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующей вариabельные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна из, например, коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитело), или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и с ней можно проводить манипуляции химическими способами или при помощи методик молекулярной биологии, например, для организации одного или нескольких вариabельных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антиген-связывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариabельный участок антитела (например, выделенный определяющий комплементарность участок (CDR), такой как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Также применяемым в настоящем документе выражением "антиген-связывающий фрагмент" охвачены другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфичные антитела, антитело с одним доменом, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с пришитым CDR, диатела, триотела, тетратела, миниантитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), иммунопрепараты на основе модульного белка с малым размером молекул (SMIP) и вариabельные домены IgNAR акулы.

Антиген-связывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей

мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере один CDR, который является смежным с одной или несколькими каркасными последовательностями или находится в их пределах. В антиген-связывающих фрагментах, имеющих домен V_H , связанный с доменом V_L , V_H и V_L , домены могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменный участок может быть димерным и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно, антиген-связывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

В соответствии с определенными вариантами осуществления антиген-связывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом.

Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных или константных доменов, которые можно обнаружить в антиген-связывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv)

V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; и (xiv) V_L - C_L . В

любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любые из перечисленных выше иллюстративных конфигураций, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно соединены друг с другом, либо могут быть соединены при помощи полного или частичного шарнирного или линкерного участка. Шарнирный участок может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что в результате дает гибкую или полугибкую связи между смежными переменными и/или константными доменами в отдельной полипептидной молекуле. Кроме того, антиген-связывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) в любой из перечисленных выше конфигураций переменных и константных доменов в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной связи(связей)).

Как и в случае с целыми молекулами антител, антиген-связывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антиген-связывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере два различных переменных домена, причем каждый переменный домен способен специфично связываться с отдельным антигеном или с различным эпитопом на одном антигене. Любой мультиспецифический формат антитела, включая раскрываемые в настоящем документе иллюстративные биспецифические форматы антител, можно адаптировать для применения в контексте антиген-связывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с помощью доступных в настоящей области техники стандартных методик.

Получение человеческих антител

Способы создания человеческих антител в трансгенных мышах известны из уровня техники. Для создания человеческих антител, которые специфично связываются с токсином А и/или токсином В *C. difficile*, в контексте настоящего изобретения можно применять любые такие известные способы.

Благодаря технологии VELOCIMMUNE® (см., например, патентный документ US 6596541, Regeneran Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа создания моноклональных антител, химерные антитела с высокой аффинностью к токсину А и/или токсину В *C. difficile* являются изначально выделенными с

человеческим переменным участком и мышинным константным участком. Технология VELOCIMMUNE® предусматривает создание трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий локусы человеческих переменных участков тяжелых и легких цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышинных константных участков так, чтобы мышь в ответ на стимуляцию антигеном продуцировала антитело, содержащее человеческий переменный участок и мышинный константный участок. ДНК, кодирующую переменные участки тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей человеческие константные участки тяжелых и легких цепей. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Как правило, мышь VELOCIMMUNE® провоцируют представляющим интерес антигеном, а лимфатические клетки (такие как В-клетки) выделяют из мышей, которые экспрессируют антитела. Лимфатические клетки можно слить с линией миеломных клеток с получением бессмертных линий гибридомных клеток, и такие линии гибридомных клеток подвергают скринингу и отбирают для выявления линий гибридомных клеток, которые продуцируют антитела, специфичные к представляющему интерес антигену. ДНК, кодирующая переменные участки тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделить и присоединить к необходимым изотипическими константным участкам тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может продуцироваться в такой клетке, как клетка СНО. Альтернативно, ДНК, кодирующую антиген-специфические химерные антитела или переменные домены легких или тяжелых цепей, можно выделить непосредственно из антиген-специфических лимфоцитов.

Изначально химерные антитела с высокой аффинностью являются выделенными с человеческим переменным участком и мышинным константным участком. Так же, как и в приведенной ниже экспериментальной части, у антител определяют характеристики и их отбирают по необходимым характеристикам, включая аффинность, избирательность, эпитоп и т.д. Мышинные константные участки замещают необходимыми человеческими константными участками для создания полностью человеческого антитела по настоящему изобретению, например, дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Несмотря на то, что выбранный константный участок может варьировать в соответствии с конкретным применением, характеристики связывания антигена с высокой аффинностью и специфичности к мишени присущи переменному участку.

В целом, антитела по настоящему изобретению обладают очень высокоаффинными характеристиками, как правило, обладая K_D , составляющей от приблизительно 10^{-12} до приблизительно 10^{-9} М, при измерении посредством связывания с антигеном, либо иммобилизованным на твердой фазе, либо в жидкой фазе. Мышинные константные участки замещают необходимыми человеческими константными участками для создания полностью человеческих антител по настоящему изобретению. Несмотря на то, что выбранный константный участок может варьировать в соответствии с конкретным применением, характеристики связывания антигена с высокой аффинностью и специфичности к мишени присущи переменному участку.

Биоэквиваленты

Антитела к токсину А и к токсину В и фрагменты антител по настоящему изобретению охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать токсин А или токсин В. Такие варианты антитела и фрагменты антител содержат одну или несколько присоединений, делеций или замен аминокислот по

сравнению с исходной последовательностью, но характеризуются биологической активностью, которая фактически эквивалентна биологической активности описанных антител. Аналогичным образом, кодирующие антитела последовательности ДНК по
5 настоящему изобретению охватывают последовательности, которые содержат одну или несколько присоединений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрываемой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые фактически биоэквивалентны антителу или фрагменту антитела по настоящему изобретению.

Два антиген-связывающих белка, или антитела, считают биоэквивалентом, если,
10 например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, в скорости и степени абсорбции которых не наблюдают значительного различия при введении в одинаковой молярной дозе при сходных экспериментальных условиях, либо в однократной дозе, либо в многократной дозе. Некоторые антитела будут считать эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они
15 являются эквивалентными по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и их все еще можно считать биоэквивалентными, так как такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и учтены при введении меток, не являются существенным для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при затяжном приеме, и их считают незначительными в
20 медицинском плане для конкретной исследуемой готовой лекарственной формы.

Согласно одному варианту осуществления два антиген-связывающих белка являются биоэквивалентными, если они не имеют клинически существенных отличий по их безопасности, чистоте и активности.

Согласно одному варианту осуществления два антиген-связывающих белка являются
25 биоэквивалентами, если пациент может менять один или несколько раз эталонный продукт и биологический продукт без предположительного повышения риска отрицательных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или сниженную эффективность по сравнению с продолжительной терапией без такой замены.

Согласно одному варианту осуществления два антиген-связывающих белка являются
30 биоэквивалентными, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия по отношению к состоянию или условиям применения, при условии, что такие механизмы известны.

Биоэквивалентность можно продемонстрировать посредством способов *in vivo* и/
35 или *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают, например, (a) тестирование *in vivo* на людях или других животных, при котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме крови, сыворотке крови или другой биологической жидкости в зависимости от времени; (b) тестирование *in vitro*, для которого установлена корреляция и оно является достаточно прогнозируемым по отношению к данным биологической доступности *in vivo* у человека; (c) тестирование
40 *in vivo* на людях или других животных, при котором соответствующий быстрый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в зависимости от времени; и (d) строго контролируемое клиническое испытание, при котором устанавливают безопасность, эффективность, или биологическую доступность, или
45 биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител по настоящему изобретению можно сконструировать, например, посредством создания различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или

последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, цистеиновые остатки, несущественные для биологической активности, можно удалить или заменить на другие аминокислоты для предупреждения формирования нежелательных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. Согласно другому контексту, биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования у антител, например, мутации, которые исключают или удаляют участки гликозилирования.

Биологические характеристики антител

Как правило, антитела по настоящему изобретению могут функционировать, связываясь либо с токсином А, либо с токсином В *C. difficile*, либо как с токсином А, так и с токсином В *C. difficile* (антитела с перекрестной реактивностью), либо с фрагментом либо А, либо В.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению могут связываться с эпитопом, расположенным по меньшей мере в С-концевом связывающемся с рецептором домене токсина А и/или токсина В *C. difficile*. Согласно одному варианту осуществления антитела могут связываться с С-концевым участком токсина А, располагающимся от аминокислотного основания 1832 до 2710 карбоксиконцевого связывающегося с рецептором домена токсина А, который охватывает аминокислотные остатки 1832-2710 из SEQ ID NO: 378. В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению антитела могут связывать карбоксиконцевой связывающийся с рецептором домен токсина А, который показан в SEQ ID NO: 375. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по настоящему изобретению антитела могут взаимодействовать или связываться с, аминокислотными остатками 468-863 карбоксиконцевого связывающегося с рецептором домена продуцируемого *Clostridium difficile* токсина А, последовательность которого показана в SEQ ID NO: 375. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по настоящему изобретению антитела могут взаимодействовать или связываться с эпитопом на карбоксиконцевом связывающемся с рецептором домене, продуцируемого *Clostridium difficile* токсина А, причем эпитоп выбран из группы, состоящей из остатков 468-488 из SEQ ID NO: 375, остатков 510-530 из SEQ ID NO: 375, остатков 602-610 из SEQ ID NO: 375, остатков 644-703 из SEQ ID NO: 375, остатков 724-794 из SEQ ID NO: 375, остатков 799-814 из SEQ ID NO: 375 и остатков 858-863 из SEQ ID NO: 375. Согласно одному варианту осуществления антитело, которое связывается или взаимодействует с эпитопом в карбоксиконцевом связывающемся с рецептором домене продуцируемого *Clostridium difficile* токсина А, выбранным из группы, состоящей из остатков 468-488 из SEQ ID NO: 375, остатков 510-530 из SEQ ID NO: 375, остатков 602-610 из SEQ ID NO: 375, остатков 644-703 из SEQ ID NO: 375, остатков 724-794 из SEQ ID NO: 375, остатков 799-814 из SEQ ID NO: 375 и остатков 858-863 из SEQ ID NO: 375, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 146/154. Согласно одному варианту осуществления антитело, которое связывается или взаимодействует с эпитопом в карбоксиконцевом связывающемся с рецептором домене продуцируемого *Clostridium difficile* токсина А, выбранным из группы, состоящей из остатков 468-488 из SEQ ID NO: 375, остатков 510-530 из SEQ ID NO: 375, остатков 602-610 из SEQ ID NO: 375, остатков 644-703 из SEQ ID NO: 375, остатков 724-794 из SEQ ID NO: 375, остатков 799-814 из SEQ ID NO: 375 и остатков 858-863 из SEQ ID NO: 375, комбинировано со вторым антителом, которое специфично связывается с токсином В *Clostridium difficile*, в фармацевтической композиции. Согласно одному варианту

осуществления второе антитело, которое взаимодействует или связывается с токсином B Clostridium difficile, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 274/282.

В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению антитела могут связываться с карбоксиконцевым связывающимся с рецептором доменом токсина B, который соответствует аминокислотным остаткам 1834-2366 из SEQ ID NO: 380. В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению антитела могут связываться с карбоксиконцевым связывающимся с рецептором доменом токсина B, который показан в SEQ ID NO: 376.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению могут функционировать посредством блокировки или ингибирования токсичности, ассоциированной с токсином A C. difficile, связываясь с любым другим участком или фрагментом нативного белка полной длины токсина A, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID NO: 378, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, показанной в SEQ ID NO: 377.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению могут функционировать посредством блокировки или ингибирования токсичности, ассоциированной с токсином B C. difficile, связываясь с любым другим участком или фрагментом нативного белка полной длины токсина A, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID NO: 380, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, показанной в SEQ ID NO: 379.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению могут представлять собой биспецифические антитела. Биспецифические антитела по настоящему изобретению могут связывать один эпитоп в токсине A, а также могут связывать один эпитоп в токсине B. В соответствии с определенными вариантами осуществления биспецифические антитела по настоящему изобретению могут связывать два различных эпитопа в токсине A. В соответствии с определенными вариантами осуществления биспецифические антитела по настоящему изобретению могут связывать два различных эпитопа в токсине B. В соответствии с определенными вариантами осуществления биспецифические антитела по настоящему изобретению могут связываться с двумя различными сайтами в одном домене либо на одном из токсина A или токсина B, либо могут связываться с одним доменом как на токсине A, так и на токсине B.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к полностью человеческому моноклональному антителу или его антиген-связывающему фрагменту, которые связываются с карбоксиконцевым связывающимся с рецептором доменом как токсина A, так и токсина B C. difficile, причем у антитела или его фрагмента наблюдают одну или несколько из следующих характеристик: (i) содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 34, 50, 66 и 82, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (ii) содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 42, 58, 74 и 90, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (iii) содержит домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 40, 56, 72 и

88, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности и домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, 48, 64, 80 и 96, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (iv) содержит домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 36, 52, 68 и 84, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 38, 54, 70 и 86, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 44, 60, 76 и 92, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 46, 62, 78 и 94, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (v) связывается с токсином А и с токсином В с K_D , равной или меньше 10^{-9} М.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к полностью человеческому моноклональному антителу или его антиген-связывающий фрагменту, которые специфично связываются с токсином А (но не с токсином В) *C. difficile*, причем у антитела или его фрагмента наблюдают одну или несколько из следующих характеристик: (i) содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 98, 114, 130, 146 и 162, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (ii) содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 106, 122, 138, 154 и 170, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (iii) содержит домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 104, 120, 136, 152 и 168, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 112, 128, 144, 160 и 176, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (iv) содержит домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 100, 116, 132, 148 и 164, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; домен

HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 102, 118, 134, 150 и 166, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 108, 124, 140, 156 и 172, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 110, 126, 142, 158 и 174, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (v) демонстрирует K_D , равную или мене 10^{-9} М; (vi) демонстрирует нейтрализацию токсина А (при концентрации 32 пМ) с IC_{50} , варьирующей в диапазоне от приблизительно 7 пМ до приблизительно 65 пМ в анализе жизнеспособности клеток.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к полностью человеческому моноклональному антителу или его антиген-связывающий фрагменту, которые специфично связываются с токсином В (но не с токсином А) *C. difficile*, причем у антитела или его фрагмента наблюдают одну или несколько из следующих характеристик: (i) содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338 и 354, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (ii) содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346 и 362, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (iii) содержит домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344 и 360, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352 и 368, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (iv) содержит домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340 и 356, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342 и 358, или по существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348 и 364, или по существу

сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; и домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350 и 366, или по
 5 существу сходной с ней последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности; (v) демонстрирует K_D , равную или меньше 10^{-9} М; (vi) демонстрирует нейтрализацию токсина В (при концентрации 0,03 пМ) с IC_{50} ,
 10 варьирующей от приблизительно 25 пМ до приблизительно 320 пМ в анализе жизнеспособности клеток.

Определенные антитела к токсину А или к токсину В по настоящему изобретению способны связываться и нейтрализовать токсичность либо токсина А, либо токсина В, либо обоих *C. difficile*, по результатам определения посредством анализов *in vitro* или
 15 *in vivo*. Описанную в настоящем документе способность антител по настоящему изобретению связываться и нейтрализовать активность токсинов можно измерить при помощи любого стандартного способа, известного специалистам в настоящей области техники, включая анализы связывания или анализы нейтрализации токсичности (защита клеток от гибели).

Неограничивающими иллюстративными примерами анализов измерения *in vitro* связывающей активности являются анализы, проиллюстрированные в примерах 4, 5 и 6 из настоящего описания. В примерах 4 и 5 связывающие аффинности и константы скорости реакции человеческих антител к токсину А или к токсину В определяли с
 20 помощью поверхностного плазмонного резонанса, и измерения осуществляли на приборе T200 Biacore. В примере 6 исследования связывания осуществляли при помощи эксклюзионной хроматографии. В примере 7 биоанализ нейтрализации разрабатывали на клетках Веро для определения жизнеспособности клеток после обработки токсином А или В и антителами либо к токсину А, либо к токсину В.

Настоящее изобретение также относится к антителам к токсинам А и В и их антиген-
 30 связывающим фрагментам, которые связываются по меньшей мере с одним биологически активным фрагментом любого из следующих белков или пептидов: SEQ ID NO: 378 (токсин А полной длины), остатки с номерами 1832-2710 из SEQ ID NO: 378 (С-концевой домен токсина А); SEQ ID NO: 380 (токсин В полной длины), остатки 1834-2366 из SEQ ID NO: 380; SEQ ID NO: 375 (карбоксиконцевой связывающийся с рецептором домен токсина А) или SEQ ID NO: 376. Настоящее изобретение также относится к
 35 антителам, которые взаимодействуют или связываются с эпитопом на карбоксиконцевом связывающемся с рецептором домене продуцируемого *Clostridium difficile* токсина А, или их антиген-связывающему фрагменту, причем эпитоп содержится в остатках, расположенных от приблизительно остатка 468 до приблизительно 863 из SEQ ID NO: 375. Согласно одному варианту осуществления, эпитоп для антитела, которое
 40 связывается с токсином А, выбран из группы, состоящей из остатков 468-488 из SEQ ID NO: 375, остатков 510-530 из SEQ ID NO: 375, остатков 602-610 из SEQ ID NO: 375, остатков 644-703 из SEQ ID NO: 375, остатков 724-794 из SEQ ID NO: 375, остатков 799-814 из SEQ ID NO: 375 и остатков 858-863 из SEQ ID NO: 375. Любой из описанных в
 45 настоящем документе пептидов токсина А или токсина В или их фрагментов можно применять для создания антител к токсину А или токсину В.

Пептиды можно модифицировать с включением присоединений или замен определенных остатков для введения метки или с целью конъюгации с молекулами-

носителями, такими как, KLN. Например, цистеин можно добавить либо в N-, либо в C-конец пептида, или можно добавить линкерную последовательность с получением пептида для конъюгации, например, с KLN для иммунизации. Антитела, специфичные к токсину А или токсину В, могут не содержать дополнительные метки или фрагменты, или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. Согласно одному варианту осуществления меткой или фрагментом является биотин. При анализе связывания по расположению метки (при наличии) можно определить ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, то содержащий N-концевой биотин пептид будет ориентирован так, что C-концевое положение будет удаленным по отношению к поверхности.

Картирование эпитопов и родственные методики

Для определения того, "взаимодействует ли с одной или несколькими аминокислотами" антитело в полипептиде или белке можно применять различные методики, известные рядовым специалистам в настоящей области. Иллюстративные методики включают, например, стандартный эпитоп перекрестный конкурентный анализ, который можно осуществить, как описано в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY). Другие способы включают анализ при помощи сканирующего аланином мутагенеза, пептидный блот-анализ (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63), анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и NMR-анализ. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопов, экстракция эпитопов и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Protein Science* 9: 487-496). Другим способом, который можно применять для определения аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является водородно/дейтериевый обмен определяемый посредством масс-спектрометрии. В общих чертах, способ водород/дейтериевого обмена предусматривает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с помеченным дейтерием белком. Затем, комплекс белок/антитело переносят в вводу и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом с антителом, подвергаются обратному обмену дейтерия-на-водород с более медленной скоростью, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью границы раздела. В результате, аминокислоты, которые формируют часть границы раздела белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, таким образом, характеризуются относительно более высокой массой по сравнению с аминокислотами, не включенными в границу раздела. После диссоциации антитела белок-мишень подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, таким образом выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 75:256A-265A.

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки. В-клеточные эпитопы могут быть сформированы как из заменимых аминокислот, так и из незаменимых аминокислот, приведенных в соприкосновение в результате образования третичной структуры белка. Эпитопы, сформированные из заменимых аминокислот, обычно остаются под воздействием денатурирующих растворителей, при этом эпитопы, сформированные в результате образования третичной структуры, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает по меньшей мере 3 или, более характерно, по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Анализ антител на основе модификаций (МАР), также известное как анализ антител на основе структуры антигена (АSAP), является способом, с помощью которого классифицируют большое число моноклональных антител (mAb) к одному антигену в соответствии со схожестью профиля связывания для каждого антитела с поверхностями химически или ферментативно модифицированных антигенов (US 2004/0101920). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, либо явно отличающийся от эпитопа, представленного в другой категории, либо практически совпадающий с ним. Такая методика позволяет быстро отфильтровывать генетически идентичные антитела так, чтобы характеристику можно было сфокусировать на генетически отличных антителах. Применительно к скринингу гибридом МАР может облегчить определение редких гибридомных клонов, которые продуцируют mAb с необходимыми характеристиками. МАР можно применять для разделения антител по настоящему изобретению на группы антител, связывающих различные эпитопы.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к токсину А или к токсину В или его антиген-связывающие фрагменты связываются с эпитопом в любом одном из участков, проиллюстрированных на фигуре 1 или в SEQ ID NO: 378 или 380, или по меньшей мере одном из карбоксиконцевых связывающихся с рецептором доменов токсина А или токсина В, или с их фрагментом, причем карбоксиконцевой связывающийся с рецептором домен токсина А показан в SEQ ID NO: 375, а карбоксиконцевой связывающийся с рецептором домен токсина В показан как SEQ ID NO: 376.

Настоящее изобретение относится к антителам к токсину А или к токсину В, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе в таблице 1. Аналогичным образом, настоящее изобретение также относится к антителам к токсину А или к токсину В, которые конкурируют за связывания с токсином А или токсином В или фрагментом токсина А или В с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе в таблице 1.

Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом или конкурирует за связывание с эталонным антителом к токсину А или к токсину В антитело с помощью стандартных известных из уровня техники способов. Например, для определения того, связывается ли тестовое антитело с тем же эпитопом, что эталонное антитело к токсину А или к токсину В по настоящему изобретению, эталонному антителу позволяют связаться с белком или пептидом токсина А или В в насыщающих условиях. Затем оценивают способность тестового антитела связываться с молекулой токсина А или В. Если тестовое антитело способно связываться с токсином А или В после насыщающего связывания с эталонным антителом к токсину А или к токсину В, то можно прийти к заключению, что тестовое антитело связывается с отличным эпитопом, чем эталонное антитело к токсину А или к токсину В. С другой стороны, если тестовое антитело не способно связываться с молекулой токсина А или В после насыщающего связывания с эталонным антителом к токсину А или к токсину В, то тестовое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связываемый посредством эталонного антитела к токсину А или к токсину В по настоящему изобретению.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антителом к токсину А или к токсину В, осуществляют описанные выше методики связывания в двух адаптациях: согласно первой адаптации эталонному антителу позволяют связаться с молекулой токсина А или В в насыщающих условиях с последующей оценкой

связывания тестового антитела с молекулой токсина А или В; согласно второй адаптации тестовому антителу позволяют связаться с молекулой токсина А или В в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой токсина А или В. Если в случае обеих адаптаций только первое (насыщающее) антитело способно

5 связываться с молекулой токсина А или В, то можно прийти к заключению, что тестовое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с токсином А или В. Рядовому специалисту в настоящей области техники будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, не обязательно может связываться с идентичным эпитопом, что и эталонное антитело, а может стерически

10 блокировать связывание эталонного антитела посредством связывания совпадающего или смежного эпитопа.

Два антитела связываются с одинаковым или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. А именно, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого

15 по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, согласно результатам измерения в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Альтернативно, два антитела характеризуются одинаковыми эпитопами, если фактически все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или исключают связывание одного антитела, уменьшают или

20 исключают связывание другого. Два антитела характеризуются перекрывающимися эпитопами, если несколько аминокислотных мутаций, которые уменьшают или исключают связывание одного антитела, уменьшают или исключают связывание другого.

Затем, можно осуществить дополнительный стандартный эксперимент (например, анализы на мутации пептида и связывание) для подтверждения того, является ли

25 наблюдаемое отсутствие связывания тестового антитела фактическим следствием связывания с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или является ли стерическое блокирование (или другое явление) ответственным за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого рода можно осуществить при помощи ELISA, RIA,

30 поверхностного плазмонного резонанса, потоковой цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, который доступен в настоящей области техники.

Иммуноконъюгаты

Настоящее изобретение относится к человеческому моноклональному антителу к

35 токсину А или к токсину В, конъюгированному с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как средство, которое может уменьшить тяжесть первичной инфекции, вызванной *C. difficile*, или облегчить по меньшей мере один симптом, ассоциированный с инфекцией *C. difficile*, включая диарею или колит, или их тяжесть. Таким средством может быть второе отличное антитело либо к токсину А, либо к

40 токсину В, либо к обоим *C. difficile*, или анатоксин, или вакцина против *C. difficile*. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом к токсину А или к токсину В, будет принимать в учет подлежащее лечению состояние и подлежащий достижению необходимый терапевтический эффект. Альтернативно, если необходимый терапевтический эффект предназначен для лечения последствия или

45 симптомов, ассоциированных с инфекцией *C. difficile* или любым другим состоянием, полученным в результате такой инфекции, таким как без ограничения псевдомембранозный колит, то может быть предпочтительно конъюгирование средства, подходящего для лечения последствия или симптомов состояния или для ослабления

любых побочных эффектов антител по настоящему изобретению. Примеры подходящих средств для формирования иммуноконъюгатов известны в настоящей области техники, см., например, WO 05/103081.

Мультиспецифические антитела

5 Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфичными к различным эпитопам одного целевого полипептида или могут
10 содержать антиген-связывающие домены, специфичные к более чем одному целевому полипептиду. См., например, Tutt et al, 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Антитела по настоящему изобретению могут быть связаны или совместно экспрессироваться с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально
15 связаны (например, посредством образования химической связи, генетическим слиянием, нековалентным связыванием или иначе) с одной или несколькими другими молекулярными структурами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с получением биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания. Например, настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам, причем одно плечо иммуноглобулина является специфичным к токсину A *C. difficile*, или его фрагменту, а другое плечо
20 иммуноглобулина является специфичным к токсину B *C. difficile* или второй терапевтической мишени, или конъюгировано с терапевтическим фрагментом. В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению одно плечо иммуноглобулина является специфичным к эпитопу на С-концевом домене токсина A или его фрагменте, а другое плечо иммуноглобулина является специфичным
25 к эпитопу на С-концевом домене токсина B или его фрагменте.

Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно применять в контексте настоящего изобретения, включает применение первого домена C_{H3} иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_{H3} Ig, причем первый и второй домены C_{H3} Ig отличаются друг от друга по меньшей мере по одной аминокислоте, и причем по
30 меньшей мере одно аминокислотное отличие уменьшает связывание биспецифического антитела с белком A по сравнению с биспецифическим антителом без аминокислотного отличия. Согласно одному варианту осуществления первый домен C_{H3} Ig связывается с белком A, а второй домен C_{H3} Ig содержит мутацию, которая уменьшает или делает
35 невозможным связывание белка A, такую как модификация H95R (согласно нумерации экзонов IMGT; H435R согласно нумерации EU). Второй C_{H3} может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить во втором C_{H3} , включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I
40 согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае антител IgG4. Описанные выше варианты формата биспецифических антител предусмотрены объемом настоящего изобретения.

45 Терапевтическое введение и лекарственные формы

Настоящее изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим антитела к токсину A или к токсину B или к их антиген-связывающим фрагментам по настоящему изобретению. Введение терапевтических композиций в соответствии с

настоящим изобретением будут производить с подходящими носителями, наполнителями и другими средствами, которые включены в лекарственные формы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, стойкости и т.п. Большое количество соответствующих лекарственных форм можно найти в известном всем фармакологам фармакологическом справочнике: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Такие составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, жидкость (катионную или анионную), содержащую везикулы (такие как LIPOFECTIN™), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбционные пасты, эмульсии по типу масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полужидкие гели и полужидкие смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза каждого антитела по настоящему изобретению может варьировать в зависимости от возраста и размера субъекта, которому будут ее вводить, целевого заболевания, условий, пути введения и т.п. При применении антител по настоящему изобретению для лечения у пациента с инфекцией *C. difficile*, или для лечения у пациента одного или нескольких симптомов, ассоциированных с инфекцией *C. difficile*, таких как диарея или колит, ассоциированные с инфекцией *C. difficile*, или для предупреждения обострения заболевания, или для снижения тяжести заболевания, предпочтительно введение каждого из антител по настоящему изобретению внутривенно или подкожно в норме за однократную дозу, составляющую от приблизительно 0,01 до приблизительно 30 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, или от приблизительно 0,1 до приблизительно 15 мг/кг массы тела, или от приблизительно 0,02 до приблизительно 7 мг/кг массы тела, или от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 мг/кг массы тела, или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела, или приблизительно 1 мг/кг массы тела, или приблизительно 3,0 мг/кг массы тела, или приблизительно 10 мг/кг массы тела, или приблизительно 20 мг/кг массы тела. В случае необходимости можно вводить многократные дозы. В зависимости от тяжести состояния частоту введения и длительность лечения можно откорректировать. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты по настоящему изобретению можно вводить в качестве изначальной дозы, составляющей по меньшей мере от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 5 до приблизительно 300 мг, или от приблизительно 10 до приблизительно 150 мг, до приблизительно 100 мг или до приблизительно 50 мг. В соответствии с определенными вариантами осуществления после изначальной дозы может следовать введение второй или нескольких последующих доз антител или их антиген-связывающих фрагментов в количестве, которое может быть примерно таким же или меньше, чем в изначальной дозе, причем последующие дозы разделены по меньшей мере 1-3 днями, по меньшей мере одной неделей, по меньшей мере 2 неделями, по меньшей мере 3 неделями, по меньшей мере 4 неделями, по меньшей мере 5 неделями, по меньшей мере 6 неделями, по меньшей мере 7 неделями, по меньшей мере 8 неделями, по меньшей мере 9 неделями, по меньшей мере 10 неделями, по меньшей мере 12 неделями или по меньшей мере 14 неделями.

Известны различные системы доставки, и их можно применять для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, например, инкапсуляция в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см.,

например, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают без ограничения внутрикожный, чрезкожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути.

Композицию можно вводить любым подходящим путем, например, при помощи инфузии или инъекции ударной дозы вещества, посредством всасывания через эпителиальные или слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки или тонкого кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или локальным.

Фармацевтическую композицию также можно доставлять в везикуле, в частности, липосоме (см., например, Langer (1990) Science 249:1527-1533).

В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. Согласно одному варианту осуществления можно применять помпу. Согласно другому варианту осуществления можно применять полимерные материалы. В соответствии с еще одним вариантом осуществления систему с контролируемым высвобождением можно поместить вблизи мишени композиции, для чего, таким образом, необходима лишь доля системной дозы.

Инъекционные формы могут включать готовые лекарственные формы для внутривенных, подкожных, интракутанных и внутримышечных инъекций, капельных внутривенных вливаний и т.д. Такие инъекционные формы можно получить посредством общеизвестных способов. Например, инъекционные формы можно получить, например, растворением, суспендированием или эмульгированием описанных выше антигена или его соли в стерильной водной среде или масляной среде, обычно применяемых для инъекций. Водной средой для инъекций являются, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.д., которые можно применять в комбинации с соответствующим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (аддукт полиоксиэтилена (50 моль) и гидрогенизованного касторового масла)] и т.д. Масляными средами являются, например, сезамовое масло, соевое масло и т.д., которые можно применять в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.п. Полученный таким образом инъекционный препарат предпочтительно заполняют в подходящую ампулу.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно при помощи стандартной иглы и шпигца. Кроме того, что касается подкожной доставки, то при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению с легкостью можно применять устройство для доставки по типу шприц-ручка. Такое устройство для доставки по типу шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки по типу шприц-ручка обычно используют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена и картридж опустел, пустой картридж можно легко выбросить и поместить новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию.

Устройство для доставки по типу шприц-ручка затем можно повторно использовать. В случае одноразового устройства для доставки сменный картридж отсутствует. Вернее, одноразовое устройство для доставки по типу шприц-ручка заполнено фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре устройства. После удаления из резервуара

фармацевтической композиции пустое устройство выбрасывают.

Для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению применяют разнообразные многодозовые шприц-ручки и автоинжекторные устройства для доставки. Примеры включают без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручка DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручка HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручка HUMALOG™, шприц-ручка HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручка BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лейке, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Франкфурт, Германия), не говоря уже о других. Примеры одноразовых устройств для доставки по типу шприц-ручка, применяемых для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), SURECLICK™ Autoinjector (Amgen, Таузенд-Оукс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, Иллинойс), не говоря уже о других.

Предпочтительно, описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения получают в готовых лекарственных формах в стандартной дозе, подобранной в соответствии с дозой активных ингредиентов. Такие готовые лекарственные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.п. Количество вышеизложенного включенного антитела обычно составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на готовую лекарственную форму в стандартной дозе; особенно в форме инъекции, предпочтительно, чтобы вышеизложенное антитело содержалось в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для каждой готовой лекарственной формы.

Схемы введения

В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению многократные дозы антитела к токсину А и/или В Clostridium difficile можно вводить субъекту через определенный период времени. Способы в соответствии с аспектом по настоящему изобретению предусматривают последовательное введение субъекту многократных доз антитела к токсину А и/или В. Применяемый в настоящем документе термин "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела к токсину А и/или В вводят субъекту в различный момент времени, например, в различные дни, разделенные предварительно заданным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение относится к способам, которые предусматривают последовательное введение пациенту однократной изначальной дозы антитела к токсину А и/или В с последующим введением одной или нескольких вторичных доз антитела к токсину А и/или В и необязательно с последующим введением одной или нескольких третичных доз антитела к токсину А и/или В.

Термины "изначальная доза," "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела к токсину А и/или В. Таким образом, "изначальной дозой" является доза, которую вводят в начале схемы лечения (также называемая как "исходная доза"), "вторичные дозы" являются дозами, которые вводят после изначальной дозы, и "третичные дозы" являются дозами, которые вводят после вторичных доз. Все из изначальной, вторичных и третичных доз могут содержать одинаковое количество антитела к токсину А и/или В, но в целом могут отличаться

друг от друга касательно частоты введения. Тем не менее, в соответствии с определенными вариантами осуществления количество антитела к токсину А и/или В, содержащееся в изначальной, вторичной и/или третичной дозах отличается одно от другого (например, повышено или понижено, по необходимости) в течение курса лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале схемы лечения в качестве "ударных доз", за которыми следуют последующие дозы, которые вводят не так часто (например, "поддерживающие дозы").

Согласно одному иллюстративному варианту осуществления по настоящему изобретению каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Применяемая в настоящем документе фраза "непосредственно предшествующая доза" означает в последовательности многократных введений дозу антитела к токсину А и/или В, которую вводят пациенту перед введением непосредственно следующей дозы в последовательности при отсутствии промежуточных доз.

Способы в соответствии с этим аспектом по настоящему изобретению могут предусматривать введение пациенту любого числа вторичных или третичных доз антитела к токсину А и/или В. Например, в соответствии с определенными вариантами осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом, в соответствии с определенными вариантами осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

Согласно вариантам осуществления, предусматривающим множественные вторичные дозы, каждую вторичную дозу можно вводить с такой же частотой, как и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту спустя 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом, согласно вариантам осуществления, предусматривающим множественные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с такой же частотой, как и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту спустя 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. Альтернативно, частота, с которой вводят пациенту вторичные и/или третичные дозы, может изменяться в ходе схемы лечения. Частота введения также может корректироваться в течение курса лечения лечащим врачом, в зависимости от индивидуальных потребностей пациента после клинического обследования.

Терапевтические применения антител

Благодаря их взаимодействию с токсином А и/или токсином В *C. difficile* антитела по настоящему изобретению пригодны для лечения первичного заболевания или состояния, вызванного *C. difficile*, или по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с заболеванием или состоянием, такого как диарея или колит, или для предупреждения обострения заболевания, или для уменьшения тяжести, продолжительности и/или частоты рецидивов заболевания. Антитела по настоящему изобретению можно рассматривать для профилактического применения среди пациентов,

подверженных риску развития или приобретения инфекции *C. difficile*. Такие пациенты включают пожилых (например, кого угодно в возрасте 65 лет или старше), или пациентов, которые имеют иммунную недостаточность в связи с болезнью или в связи с лечением иммуносупрессивными терапевтическими средствами, или пациентов, которые могут иметь определенное первопричинное медицинское состояние, которое может вызывать у них предрасположенность к возникновению инфекции *C. difficile* (например, пациентов со злокачественной опухолью, воспалительным заболеванием кишечника, пациентов перед трансплантацией печени с кумулятивным асцитом), или пациентов, которые госпитализированы на протяжении длительных периодов времени (например, в некоторых случаях этот период времени может варьировать всего лишь в пределах двух или трех дней, но в целом может составлять от одной недели до двух недель или дольше), делая их предрасположенными к приобретению нозокомиальных инфекций, или пациентов, которых лечат на протяжении длительного срока (≥ 14 дней) антибиотиками широкого спектра действия (в некоторых случаях больные могут приобрести инфекцию в течение 24 часов, если имеет место расстройство кишечника, но в других случаях это может занять намного больше времени, например, одну неделю или дольше), или пациентов, подвергаемых лечению ингибиторами протонного насоса для лечения расстройств желудочно-кишечного тракта. Полагают, что антитела по настоящему изобретению можно применять отдельно или в сочетании со вторым средством или третьим средством для лечения инфекции *C. difficile* или для облегчения по меньшей мере одного симптома или осложнения, ассоциированного с инфекцией *C. difficile*, такого как диарея или колит, ассоциированные с такой инфекцией или полученные в результате такой инфекции. Второе и третье средства можно доставлять одновременно с антителами по настоящему изобретению, или их можно вводить отдельно, либо до, либо после антител по настоящему изобретению.

Согласно еще одному варианту осуществление по настоящему изобретению настоящие антитела применяют для получения фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих от инфекции *C. difficile*, включая такие инфекции, которые обусловлены клинически релевантным гипервирулентным штаммом *Clostridium difficile*, или диареи и колита, ассоциированных с инфекцией *C. difficile*. Согласно еще одному варианту осуществления по настоящему изобретению настоящие антитела применяют для получения фармацевтической композиции для уменьшения тяжести первичной инфекции, вызванной *C. difficile*, или для уменьшения тяжести, продолжительности и/или числа рецидивов от *C. difficile*. Согласно следующему варианту осуществления по настоящему изобретению настоящие антитела применяют в качестве средства вспомогательной терапии с любым другим средством, пригодным для лечения инфекций *C. difficile*, включая пробиотики, антибиотики, анатоксины, вакцины или любое другое паллиативное средство терапии, известное специалистам в настоящей области техники.

Комбинированная терапия

Способы по настоящему изобретению в соответствии с определенными вариантами осуществления предусматривают введение субъекту одного или нескольких дополнительных терапевтических средств в комбинации с антителом к токсину А и/или токсину В *Clostridium difficile*. Применяемое в настоящем документе выражение "в комбинации с" означает, что дополнительные терапевтические средства вводят до, после или одновременно с фармацевтической композицией, содержащей антитела к токсину А и/или В. Термин "в комбинации с" также включает последовательное или сопутствующее введение антител к токсину А и/или В и второго терапевтического

средства.

Например, при введении "до" фармацевтической композиции, содержащей антитела к токсину А и/или В, дополнительное терапевтическое средство можно вводить приблизительно за 72 часа, приблизительно за 60 часов, приблизительно за 48 часов, 5 приблизительно за 36 часов, приблизительно за 24 часа, приблизительно за 12 часов, приблизительно за 10 часов, приблизительно за 8 часов, приблизительно за 6 часов, приблизительно за 4 часа, приблизительно за 2 часа, приблизительно за 1 час, приблизительно за 30 минут, приблизительно за 15 минут или приблизительно за 10 минут до введения фармацевтической композиции, содержащей антитела к токсину А 10 и/или В. При введении "после" фармацевтической композиции, содержащей антитела к токсину А и/или В, дополнительное терапевтическое средство можно вводить приблизительно через 10 минут, приблизительно через 15 минут, приблизительно через 30 минут, приблизительно через 1 час, приблизительно через 2 часа, приблизительно через 4 часа, приблизительно через 6 часов, приблизительно через 8 часов, 15 приблизительно через 10 часов, приблизительно через 12 часов, приблизительно через 24 часа, приблизительно через 36 часов, приблизительно через 48 часов, приблизительно через 60 часов или приблизительно через 72 часа после введения фармацевтической композиции, содержащей антитела к токсину А и/или В. Введение "одновременное" или с фармацевтической композицией, содержащей антитела к токсину А и/или В, означает, 20 что дополнительное терапевтическое средство вводят субъекту в виде отдельной готовой лекарственной формы в пределах менее 5 минут (до, после или в одно и то же время) от введения фармацевтической композиции, содержащей антитела к токсину А и/или В, или вводят субъекту в качестве однократной комбинированной дозированной лекарственной формы, содержащей как дополнительное терапевтическое средство, так 25 и антитела к токсину А и/или В.

Средства комбинированной терапии могут включать антитело к токсину А или к токсину В по настоящему изобретению и любое дополнительное терапевтическое средство, которое можно успешно комбинировать с антителом по настоящему изобретению или с биологически активным фрагментом антитела по настоящему 30 изобретению.

Например, второе или третье терапевтическое средство можно использовать для того, чтобы способствовать уменьшению бактериальной обсемененности в кишечнике, такое как антибиотик, который является бактериостатическим или бактерицидным по отношению к *C. difficile*. Иллюстративные антибиотики включают ванкомицин, 35 метронидазол или фидаксомицин. Антитела также можно применять в сочетании с другими разновидностями терапии, такими как анатоксины, вакцины, специфичные к *C. difficile*, или пробиотические средства, такие как *Saccharomyces boulardii*.

Диагностические применения антител

Антитела к токсину А или к токсину В по настоящему изобретению также можно 40 применять для обнаружения и/или измерения токсина А или В в образце, например, в диагностических целях. Предусмотрено, что подтверждение инфекции, которая, как полагают, обусловлена *C. difficile*, можно осуществить посредством измерения наличия либо токсина А, либо токсина В посредством применения любого одного или нескольких из антител по настоящему изобретению. Иллюстративные диагностические анализы 45 на токсин А или токсин В могут предусматривать, например, приведение в контакт образца, полученного от пациента, с антителом к токсину А или к токсину В по настоящему изобретению, причем антитело к токсину А или к токсину В помечено поддающейся обнаружению меткой или репортерной группой, или его применяют в

качестве захватывающего лиганда для избирательного выделения белка токсина А или токсина В из образцов пациента. Альтернативно, непомеченное антитело к токсину А или к токсину В можно применять для диагностических целей в комбинации со вторичным антителом, которое само по себе помечено для возможности обнаружения.

Поддающаяся обнаружению метка или репортерная группа могут представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин, или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно применять для обнаружения или измерения токсина А или токсина В в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

Образцы, которые можно применять в диагностических анализах на *C. difficile*, в соответствии с настоящим изобретением включают любой образец ткани или жидкости, получаемый от пациента, который содержит поддающиеся обнаружению количества белка либо токсина А или токсина В *C. difficile*, либо их фрагментов в нормальных или патологических условиях. Обычно уровни токсина А или токсина В в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не пораженного заболеванием или состоянием, ассоциированным с наличием *C. difficile*), будут измерять, изначально устанавливая исходный или стандартный уровень токсина А или токсина В *C. difficile*. Такой базовый уровень токсина А или токсина В затем можно сравнить с уровнями токсина А или токсина В, измеренными в образцах, полученных от людей, у которых подозревают наличие связанного с *C. difficile* заболевания или состояния или симптомов, ассоциированных с таким заболеванием или состоянием.

Примеры

Следующие примеры приведены с целью предоставления специалистам в настоящей области техники полного раскрытия и описания того, как осуществлять и применять способы и композиции по настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения рассматриваемого авторами объема настоящего изобретения. Были осуществлены попытки в обеспечении точности в отношении использованных цифр (например, количеств, температуры т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются частями по массе, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура приведена в градусах Цельсия, а давление соответствует или близко к атмосферному.

Пример 1. Создание человеческих антител к токсину А и/или токсину В *Clostridium difficile*

Для создания антител к токсину А и/или токсину В *C. difficile* можно использовать иммуноген, содержащий одно из приведенного далее. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению получали от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как нативный, инактивированный токсин А (см. под номером доступа в GenBank CAA63564 (SEQ ID NO: 378)) и/или токсин В полной длины (см. под номером доступа в GenBank CAJ67492 (SEQ ID NO: 380)) из *C. difficile* или рекомбинантной, но инактивированной формой токсинов, или фрагментов токсинов, или анатоксина, с последующей иммунизацией вторичным иммуногеном или иммуногенно активным фрагментом нативного токсина. Животных можно было иммунизировать либо только инактивированным токсином А, либо только инактивированным токсином В, либо одновременно как инактивированным токсином А, так и инактивированным токсином В. Токсины можно инактивировать до применения

в качестве иммуногена с применением стандартных процедур получения анатоксинов, в том числе путем обработки формальдегидом, глутаральдегидом, пероксидом или обработкой кислородом (Relyveld, et al. *Methods in Enzymology*, 93:24, 1983, Woodrow and Levine, eds. *New Generation Vaccines*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1990). Другие средства инактивации заключаются в применении UDP-диаальдегида (Genth et al., (2000), *Infect. Immun.* 68(3):1094-1101), который может содействовать сохранению нативной структуры токсина, по сравнению с другими способами инактивации, с повышением, таким образом, вероятности начала продуцирования антител, которые более реактивны по отношению к нативному токсину. Альтернативно, мутантные токсины от *C. difficile*, у которых наблюдали сниженную токсичность, можно получить с помощью стандартных рекомбинантных методик и применять в качестве иммуногенов (см., например, US 5085862, 5221618, 5244657, 5332583, 5358868 и 5433945). Такие мутанты могут содержать делеции или точечные мутации в активном сайте токсина.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела согласно настоящему изобретению получали от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как биологически активный и/или иммуногенный фрагмент нативного токсина А или токсина В или ДНК, кодирующей его активных фрагмент. В соответствии с определенными вариантами осуществления иммуногеном может быть пептид от N-конца или С-конца токсина А и/или токсина В, или фрагмент, полученный от N- или С-концевого пептида токсина А и/или токсина В. В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению иммуноген представлял собой связывающийся с рецептором карбоксиконцевой домен токсина А, который соответствовал аминокислотным остаткам от приблизительно 1832 до 2710 из SEQ ID NO: 378. В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению иммуногеном был карбоксиконцевой связывающийся с рецептором домен токсина А, который показан в SEQ ID NO: 375. В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению иммуногеном был карбоксиконцевой связывающийся с рецептором домен токсина В, который соответствовал аминокислотным остаткам от приблизительно 1834 до 2366 из SEQ ID NO: 380. В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению иммуногеном был карбоксиконцевой связывающийся с рецептором домен токсина В, который показан в SEQ ID NO: 376.

Соответственно, согласно одному варианту осуществления антитела согласно настоящему изобретению получали от мышей, иммунизированных либо инактивированным токсином А полной длины (анатоксином), либо инактивированным токсином В полной длины (анатоксином), либо обоими анатоксинами. Вместе с тем, согласно одному варианту осуществления антитела получали от мышей, иммунизированных полипептидом, содержавшим аминокислотные последовательности из карбоксиконцевого связывающегося с рецептором доменом токсина А *C. difficile*, или полипептидом, содержавшим аминокислотные последовательности из карбоксиконцевого связывающегося с рецептором доменом токсина В *C. difficile*, или обоими одновременно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, которые специфично связываются с токсином А или токсином В *C. difficile* можно получить с помощью фрагментов вышеупомянутых участков или пептидов, которые выходят за пределы обозначенных участков на от приблизительно 5 до приблизительно 20 аминокислотных остатков за любой из N или С концов описанных в настоящем документе участков или за оба конца. В соответствии с определенными вариантами

осуществления при получении специфичных к токсину А или токсину В антител можно применять любую комбинацию вышеупомянутых участков или их фрагментов. В соответствии с определенными вариантами осуществления для получения моноспецифичных, биспецифичных или мультиспецифичных антител можно применять

любой один или несколько из вышеупомянутых участков токсина А или токсина В или их фрагментов.

Белки полной длины или их карбокси-концевые фрагменты, которые применяли в качестве иммуногенов, как указано выше, вводили непосредственно с адьювантом для стимуляции иммунного ответа мышце VELOCIMMUNE[®], содержащей ДНК, кодирующей

вариабельные участки тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека. Иммунный ответ с продуцированием антител отслеживали с помощью иммунологического анализа на токсин А и/или токсин В *C. difficile*. При достижении необходимого иммунного ответа собирали спленоциты и сливали их с клетками миеломы

мышцы для сохранения их жизнеспособности и получения линий гибридомных клеток. Линии гибридомных клеток подвергали скринингу и отбору для выявления линий клеток, которые продуцируют специфичные антитела к токсину А и/или токсину В *C. difficile*. С помощью данной методики и с применением различных описанных выше иммуногенов получали несколько антител к токсину А и токсину В *C. difficile*, а также химерные антитела с перекрестной реактивностью (т.е., антитела, обладающие

человеческими вариабельными доменами и мышинными константными доменами); некоторые полученные таким образом иллюстративные антитела обозначали как Н1Н3067N, Н1Н3134N, Н1Н3117N, Н1М3123N, Н1М3121N и Н1М3124N.

Также антитела к токсину А и токсину В *C. difficile* выделяли непосредственно из положительных к антигену В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в патентном документе U.S. 2007/0280945A1. С помощью такого способа выделяли некоторые полностью человеческие антитела к токсину А и токсину В *C. difficile* (т.е., антитела, обладающие человеческими вариабельными доменами и человеческими константными доменами); полученные таким образом иллюстративные антитела обозначали следующим образом: Н1Н3328Р, Н1Н3324Р, Н1Н3325Р, Н1Н3330Р,

Н1Н3350Р, Н1Н3347Р, Н1Н3335Р, Н1Н3344Р, Н1Н3339Р, Н1Н3337Р, Н1Н3343Р, Н1Н3411Р, Н1Н3354Р, Н1Н3317Р, Н1Н3355Р, Н1Н3394Р и Н1Н3401Р.

Биологические свойства иллюстративных антител, полученных в соответствии со способами настоящего примера, подробно описаны в изложенных ниже примерах.

Пример 2. Аминокислотные последовательности вариабельных участков тяжелых и легких цепей

В таблице 1 изложены пары аминокислотных последовательностей вариабельных участков тяжелых и легких цепей выбранных антител, специфичных к токсину А и/или токсину В из *C. difficile* и их соответствующие идентификаторы антител. В настоящем документе антитела, как правило, обозначены согласно следующей номенклатуре:

приставка Fe (например "Н4Н", "Н1М", "Н2М"), с последующим числовым идентификатором (например "3117", как показано в таблице 1), с последующим суффиксом "Р" или "N". Таким образом, согласно настоящей номенклатуре антитело может быть обозначено, например, "Н1Н3117". Приставки Н4Н, Н1М и Н2М в используемых в настоящем документе обозначениях антител указывают на конкретный Fe участок антитела. Например, антитело "Н2М" имеет Fe мышинового IgG2, в то время как антитело "Н4Н" имеет Fe человеческого IgG4. Рядовому специалисту в настоящей области будет понятно, что антитело Н1М или Н2М можно преобразовать в антитело Н4Н, и наоборот, но в любом случае вариабельные домены (включающие CDR), которые

указаны с помощью показанных в таблице 1 числовых идентификаторов, остаются теми же. Антитела с одинаковыми числовыми обозначениями антител, но различающиеся по буквенному суффиксу N, В или Р, относятся к антителам, имеющим тяжелые и легкие цепи с идентичными последовательностями CDR, но с вариациями последовательностей в участках, которые выходят за пределы последовательностей CDR (т.е. находятся в каркасных участках). Таким образом, варианты N, В и Р конкретного антитела имеют идентичные последовательности CDR в своих переменных участках тяжелых и легких цепей, но отличались друг от друга по своим каркасным участкам.

Антитела сравнения

Контрольные антитела к токсину А и антитела к токсину В включали в приведенные далее примеры с целью сравнения. В примерах также использовали отрицательные контроли, совпадающие по изотипам. Одно контрольное антитело к токсину А обозначено в настоящем документе как контроль I, и оно представляло собой антитело к токсину А с последовательностями переменных доменов тяжелых и легких цепей антитела "3D8", которые изложены в патентных документах US7625559 и US2005/0287150. Одно антитело к токсину В обозначено в настоящем документе как контроль II, и оно представляло собой антитело к токсину В с последовательностями переменных доменов тяжелых и легких цепей антитела "124-152", которые изложены в патентных документах US7625559 и US2005/0287150. Другое антитело к токсину А обозначено в настоящем документе как контроль III, и оно представляло собой антитело к токсину А с последовательностями переменных доменов тяжелых и легких цепей антитела "3358", которые изложены в патентном документе US2009/0087478.

Таблица 1

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR3
H1H3117N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H3134N	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H3067N	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H3121N	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H3123N	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H3124N	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H3324P	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H3325P	114	116	118	120	122	124	126	128
H1H3328P	130	132	134	136	138	140	142	144
H1H3330P	146	148	150	152	154	156	158	160
H1H3350P	162	164	166	168	170	172	174	176
H1H3317P	178	180	182	184	186	188	190	192
H1H3335P	194	196	198	200	202	204	206	208
H1H3337P	210	212	214	216	218	220	222	224
H1H3339P	226	228	230	232	234	236	238	240
H1H3343P	242	244	246	248	250	252	254	256
H1H3344P	258	260	262	264	266	268	270	272
H1H3347P	274	276	278	280	282	284	286	288
H1H3354P	290	292	294	296	298	300	302	304
H1H3355P	306	308	310	312	314	316	318	320
H1H3394P	322	324	326	328	330	332	334	336
H1H3401P	338	340	342	344	346	348	350	352
H1H3411P	354	356	358	360	362	364	366	368

Пример 3. Анализ использования гена переменных участков

Для анализа структуры полученных антител клонировали и секвенировали нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные участки антител. Из последовательности нуклеиновой кислоты и прогнозируемой аминокислотной последовательности антитела выявляли использование гена для каждого переменного участка тяжелой цепи (HCVR) и переменного участка легкой цепи (LCVR). В таблице 2 изложена использование гена для выбранных антител в соответствии с настоящим изобретением.

Таблица 2

Антитело	Идентификатор антитела	HCVR			LCVR	
	HCVR/LCVR	V _H	D _H	J _H	V _K	J _K
H1H3067N	34/42	3-30	6-6	4	4-1	4
H1H3134N	18/26	3-33	3-10	4	4-1	3
H1H3117N	2/10	3-23	1-7	4	3-20	2
H1H3123N	66/74	3-48	4-11	6	1-5	1
H1H3121N	50/58	3-48	5-18	6	1-5	1
H1H3124N	82/90	3-48	3-22	6	1-5	1
H1H3328P	130/138	3-13	3-10	6	1-27	3
H1H3324P	98/106	3-13	3-10	6	1-27	3
H1H3325P	114/122	3-23	3-10	6	1-5	1
H1H3330P	146/154	3-33	1-7	4	1-39	5
H1H3350P	162/170	3-11	7-27	4	3-15	2
H1H3347P	274/282	3-23	1-26	4	1-16	3
H1H3335P	194/202	3-23	1-26	4	1-16	3
H1H3344P	258/266	3-23	2-15	4	1-16	3
H1H3339P	226/234	3-23	1-26	4	1-16	3
H1H3337P	210/218	3-23	1-26	5	1-16	3
H1H3343P	242/250	3-23	1-26	4	1-16	3
H1H3411P	354/362	3-23	1-1	6	1D-12	2
H1H3354P	290/298	6-1	2-8	4	3-11	2
H1H3317P	178/186	3-30	3-10	4	1D-12	4
H1H3355P	306/314	3-9	1-26	6	1-6	3
H1H3394P	322/330	1-2	2-2	4	3-20	4
H1H3401P	338/346	3-30	1-1	4	1D-12	2

Пример 4. Связывание антитела с токсином А и/или токсином В из *C. difficile* по результатам определения с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Аффинности связывания и константы скорости реакции человеческих моноклональных антител к токсину А и/или токсину В *Clostridium difficile* определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса при температуре 37°C (таблицы 3-5). Измерения проводили на приборе T200 Biacore.

Антитела, экспрессируемые как человеческие Fe IgG1 (AbPID приставка H1H) или гибридомные (AbPID приставка HxM), захватывали на поверхности датчика к человеческим или мышинным Fc, соответственно (формат для захвата Mab). Растворимый токсин А или В полной длины (TechLab), варьирующий от 5 до 10 нМ, вводили по поверхности с захваченным антителом. Ассоциацию антитело-антиген отслеживали в течение 150 секунд, в то время как диссоциацию в буфере отслеживали в течение 480 секунд. Кинетический анализ проводили для расчета K_D и периода полудиссоциации комплекса антиген/антитело с помощью программного обеспечения для оценки на Biacore T200 версии 1.0.

Как видно из таблиц 3-5, выделяли три типа антител: антитела, которые связывались как с токсином А, так и с токсином В ("молекулы с двойным связыванием", см. таблицу 3), антитела, которые связывались только с токсином А (таблица 4), и антитела, которые связывались только с токсином В (таблица 5). Выявляли некоторые антитела, которые

связывались как с токсином А, так и с токсином В, в том числе обозначенные H2M3121N, H2M3123N, H2M3124N, H1H3067N и H1H3134N, и таким образом их классифицировали как молекулы с двойным связыванием. Выделенные антитела к токсину А связывались с токсином в субнанолярном (нМ) диапазоне, аналогично подтипу, соответствующему Mab сравнения (контроль I; см. патент США US7625559 для последовательности сравнения клона 3D8 (Ab к токсину А) и клона 124-152 (Ab к токсину В)), в то время как лишь у нескольких молекул связывания токсина В наблюдали аффинности в диапазоне изотипа контроля II, соответствующего Mab сравнения (клон 124-152) (~200-300 пМ). Равновесные константы диссоциации связывания и периоды полудиссоциации рассчитывали из констант скорости реакции следующим образом: $K_D = k_d/k_a$; $T_{1/2} (\text{мин}) = (\ln 2/k_d)/60$

Таблица 3. Аффинности по Вiasore у mAb с двойным связыванием к *C. difficile* при температуре 37°C

Связывание при 37°C / формат для захвата Mab					
AbPID	Аналит (токсин)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (моляр.)	$T_{1/2}$ (мин.)
H2M3121N	Токсин А	9,69E+05	1,66E-04	1,72E-10	69
	Токсин В	6,11E+04	7,58E-05	1,24E-09	152
H2M3123N	Токсин А	1,23E+06	5,93E-04	4,81E-10	19
	Токсин В	3,97E+04	6,54E-05	1,65E-09	176
H2M3124N	Токсин А	1,14E+06	1,98E-04	1,74E-10	58
	Токсин В	3,31E+05	1,00E-06	3,02E-12	11550
H1H3067N	Токсин А	1,44E+05	3,45E-05	2,40E-10	335
	Токсин В	2,54E+03	6,43E-04	2,53E-07	18
H1H3134N	Токсин А	1,02E+05	2,82E-06	2,78E-11	4096
	Токсин В	2,99E+03	9,73E-04	3,25E-07	12

Таблица 4. Аффинности по Вiasore у mAb к токсину А *C. difficile* при температуре 37°C

Связывание при 37°C / формат для захвата Mab					
AbPID	Аналит	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (моляр.)	$T_{1/2}$ (мин.)
H1H3117N	Токсин А	4,38E+05	3,84E-05	7,93E-11	332
H1H3324P	Токсин А	2,51E+05	3,50E-06	1,39E-11	3297
H1H3325P	Токсин А	5,27E+05	5,51E-05	1,05E-10	209
H1H3328P	Токсин А	3,82E+05	3,66E-05	9,57E-11	316
H1H3330P	Токсин А	2,50E+05	1,37E-04	5,47E-10	85
H1H3350P	Токсин А	4,02E+05	4,05E-06	1,01E-11	2854
Контроль I	Токсин А	3,77E+05	3,24E-05	8,59E-11	58

Таблица 5. Аффинности по Biacore у mAb к токсину В *C. difficile* при температуре 37°C

AbPID	Аналит	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (моляр.)	T _{1/2} (мин.)
H1H3317P	Токсин В	6,50E+05	7,78E-05	1,20E-10	149
H1H3335P	Токсин В	1,77E+05	4,14E-04	2,34E-09	28
H1H3337P	Токсин В	2,41E+05	9,45E-04	3,93E-09	12
H1H3339P	Токсин В	2,76E+05	5,37E-04	1,95E-09	22
H1H3343P	Токсин В	2,84E+05	4,48E-04	1,58E-09	26
H1H3344P	Токсин В	2,04E+05	8,65E-04	4,24E-09	13
H1H3347P	Токсин В	3,39E+05	8,13E-04	2,40E-09	14
H1H3354P	Токсин В	NB	NB	NB	
H1H3355P	Токсин В	NB	NB	NB	
H1H3394P	Токсин В	4,86E+05	1,62E-04	3,33E-10	72
H1H3401P	Токсин В	4,20E+05	2,41E-04	5,74E-10	48
H1H3411P	Токсин В	2,35E+05	1,59E-04	6,77E-10	73
Контроль II	Токсин В	2,11E+06	4,59E-04	2,18E-10	25

NB = в условиях тестирования связывание отсутствовало

Пример 5. Определение связывающего домена для антител к токсинам А и В *Clostridium difficile* с применением поверхностного плазменного резонанса

Проводили исследования для определения того, связываются ли антитела к токсину А и/или токсину В *Clostridium difficile* с С-концевым связывающимся с рецептором доменом (C-term receptor-Binding Domain - CBD) каждого токсина. В этих исследованиях использовали два экспериментальных формата чипа Biacore. В первом случае использовали поверхности с захваченными антителами к *C. difficile*, на которые заливали 100 нМ Fc CBD токсина А (SEQ ID NO: 375) или Fc CBD токсина В (SEQ ID NO: 376), и регистрировали ответные сигналы (RU). Реагенты токсина на основе CBD приводили в соответствие с форматом как человеческих, так и мышинных Fc для обеспечения возможности проведения анализа антител с подходящими для такого формата как гибридными, так и человеческими Fc. В случае второго формата использовали поверхности с захваченными антигенами (CBD-Fc), на которые заливали 500 нМ mAb к *C. difficile*. В случае такого формата антитела с подходящими для такого формата гибридными или человеческими Fc заливали, соответственно, на захваченные антигены с человеческими и мышинными Fc. У обоих форматов ответный сигнал, который значимо превышал фоновый (>50 RU), рассматривали как связывание с CBD токсина А или В (см. таблицу 6). Как для антител к токсину А, так и для антител к токсину В получали эпитопы, которые находились в и вне CBD. Как контроль I (антитело 3D8 из US7625559 и US 2005/0287150), так и контроль II (антитело 124-152 из US7625559 и US 2005/0287150) картировали по отношению к CBD их соответствующих токсинов согласно ранее приведенной информации (данные не показаны; см. US 2005/0287150 и US7625559).

Таблица 6. Определение домена связывания с антителами к *C. difficile*

mAb	С-концевое связывание токсина А		С-концевое связывание токсина В		Связывание с доменом [#]
	Связывание (RU) 100 нМ CBD-A с захваченны ми mAb	Связывание (RU) 500 нМ mAb с захваченным и CBD-A	Связывание (RU) 100 нМ CBD-B с захваченны ми mAb	Связывание (RU) 500 нМ mAb с захваченны ми CBD-B	
H2aM306	-2	237	25	369	С-конц. А/В
H1M3117	-3	350	-1	21	С-конц. А

H2aM312	0	23	2	10	Без CBD
H2aM312	1	23	1	14	Без CBD
H2aM312	0	29	0	19	Без CBD
H1M3134	-1	195	23	394	С-конц. А/В
H1H3324P	269	224	19	-8	С-конц. А
H1H3325P	17	3	7	-8	Без CBD
H1H3328P	354	227	35	-6	С-конц. А
H1H3330P	441	515	40	-4	С-конц. А
H1H3335P	13	5	13	-6	Без CBD
H1H3337P	-17	8	-24	-2	Без CBD
H1H3339P	19	2	14	-2	Без CBD
H1H3343P	11	3	9	-4	Без CBD
H1H3344P	5	5	4	-2	Без CBD
H1H3347P	42	-13	44	7	Без CBD
H1H3354P	-19	-2	-24	-4	Без CBD

[#] Без CBD указывает на отсутствие связывания с С-концевым связывающимся с рецептором доменом токсина-А или -В.

Пример 6. Определение домена связывания с антителами к токсину А и В *Clostridium difficile* с применением эксклюзионной хроматографии

В качестве дополнительного способа определения того, связываются ли антитела к токсину А и/или В *Clostridium difficile* с С-концевым связывающимся с рецептором доменом (CBD), использовали эксклюзионную хроматографию (SEC). В нескольких словах, CBD токсина А (SEQ ID NO: 375) или CBD токсина В (SEQ ID NO: 376), в количестве ~500 нМ смешивали с избытком антитела в указанных молярных соотношениях (1:5 и 1:20; CBD:Mab) в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 5% глицерин, pH 7,4 (PBS/G), и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа.

Любое осаждение, которое можно было наблюдать спустя 1 час, регистрировали как +++ (сильное), ++ (умеренное), + (минимально) или - (не наблюдали). После центрифугирования (5 мин. при 16000×g) смесь антитела и CBD подвергали SEC-анализу с применением колонки с суперозой 6 (GE Healthcare) с PBS/G в качестве подвижной фазы. Пики белков, соответствовавшие комплексам, превышавшим отдельные антитело или CBD, интерпретировали как связывание с С-концевым доменом.

Из результатов видно, что связывание с CBD хорошо соответствовало связыванию, спрогнозированному для домена связывания, предполагаемому по результатам исследований с применением SPR (Biacore) и CBD (см. пример 5). Одним заметным исключением было H1H3134N, у которого связывание с CBD-A не наблюдали

посредством SEC, но значения K_D указывали на свойства двойного связывания у антитела.

Таблица 7. Домен связывания для антител к токсину А и В *Clostridium difficile*

mAb	Осаждение с CBD-A	Наблюдаемое посредством SEC связывание CBD-A	Осаждение с CBD-B	Наблюдаемое посредством SEC связывание CBD-B	Связывание домена посредством Biacore
H2M3067N	+++	Да	NT	NT	С-конц. А/В
H1M3117N	+++	Да	NT	NT	С-конц. А
H2M3121N	-	Нет	NT	NT	Без CBD
H2M3123N	-	Нет	NT	NT	Без CBD
H2M3124N	-	Нет	NT	NT	Без CBD
H1M3134N	-	Нет	NT	NT	С-конц. А/В
H1H3317P	NT	NT	-	Да	NT
H1H3324P	+	Да	NT	NT	С-конц. А
H1H3325P	-	Нет	NT	NT	Без CBD
H1H3328P	-	Да	NT	NT	С-конц. А
H1H3330P	-	Да	N.D.	N.D.	С-конц. А
H1H3335P	NT	NT	-	Нет	Без CBD
H1H3337P	NT	NT	-	Нет	Без CBD
H1H3339P	NT	NT	-	Нет	Без CBD
H1H3343P	NT	NT	-	Нет	Без CBD
H1H3344P	NT	NT	-	Нет	Без CBD
H1H3347P	NT	NT	-	Нет	Без CBD
H1H3350P	-	Да	NT	NT	NT
H1H3354P	NT	NT	-	Нет	Без CBD

NT= не тестировали TBD= необходимо провести

Без CBD указывает на отсутствие связывания с С-концевым связывающимся с рецептором доменом токсина -А или -В.

Пример 7. Определение нейтрализующей эффективности антител к токсину А и/или токсину В *Clostridium difficile*

Для определения нейтрализующей эффективности (IC_{50}) антител к *C. difficile* in vitro, проводили анализ на оценку жизнеспособности клеток. В нескольких словах, клетки

Веро ($1,25 \times 10^3$), культивированные в среде альфа-MEM, дополненной 10% FBS, высевали в 96-луночные микропланшеты и инкубировали в течение 16-18 часов при 37°C, в 5% CO_2 . Антитела к токсину *C. difficile* в различных концентрациях (0-66 нМ) добавляли к клеткам, а затем инкубировали с токсином А (32 или 25 пМ) или токсином В (0,03 пМ или 0,01 пМ) *C. difficile* в течение 48 часов. Использовали контроли, не содержавшие токсин (100% выживаемость), и контроли, содержавшие токсин, но без антитела (100% относительная смертность). Все разведения антитела проводили в трех повторах. После 2-дневной инкубации жизнеспособность клеток измеряли путем добавления соли тетразолия (WST-1; Roche Biochemicals), ожидания 4 часа для проявления цвета, а затем записи показаний поглощения света при 450 нм. Значения поглощения света анализировали с помощью 4-параметрического логистического уравнения по 11-точечной кривой реакции (GraphPad Prism).

Из результатов видно, что у десяти антител наблюдали нейтрализацию по отношению к токсину А со значениями IC_{50} , варьирующими от 7 пМ до 65 пМ при 25-32 пМ

постоянном токсине А (таблица 8А). Следует отметить, что у Н1Н330Р наблюдали нейтрализующую эффективность, равную эффективности контроля III (изотип, соответствующий антителу сравнения, клону 3358, который изложен в US2009/0087478), и эффективность, примерно в 20 раз больше, чем у контроля I (см US2005/0287150 для

5 клона 3D8). У нескольких нейтрализующих токсин-В антител наблюдали значимо большую эффективность, чем у контроля II (изотип, соответствующий антителу сравнения, см. клон 124-152 в патентном документе US2005/0287150), с IC₅₀, варьирующими от 25-120 пМ при 0,03 пМ постоянном токсине В (таблица 8В). У антител Н1М3067N и Н1М3134N, несмотря на то, что могли связываться как с токсином А, так

10 и с токсином В, наблюдали нейтрализующую активность в отношении токсина А. Несмотря на то, что причина этого пока еще не ясна, одним возможным объяснением этому результату может быть то, что несмотря на то, что антитела могут связываться со множеством сайтов в повторяющихся участках С-концевой части токсина, другие части домена этого же токсина все еще могут взаимодействовать с мембраной

15 млекопитающих, таким образом делая возможным вхождение токсина в клетку.

Таблица 8А. Нейтрализующая эффективность (IC₅₀) для выбранных mAb к токсину А

mAb	Испытание 1 (IC ₅₀) 32 пМ токсин А	Испытание 2 (IC ₅₀) 32 пМ токсин А	Испытание 3 (IC ₅₀) 32 пМ токсин А	Испытание 4 (IC ₅₀) 32 пМ токсина А	Испытание 5 (IC ₅₀) 25 пМ токсина А
Н1М3067N	64 пМ	44 пМ	NT	NT	NT
Н1М3117N	29 пМ	11 пМ	NT	NT	NT
Н2аМ3121N	65 пМ	35 пМ	NT	NT	NT
Н2аМ3123N	65 пМ	24 пМ	NT	NT	NT
Н2аМ3124N	41 пМ	21 пМ	NT	NT	NT
Н1М3134N	NT	NT	NT	38 пМ	NT
Н1Н3324Р	NT	NT	NT	33 пМ	NT

Н1Н3325Р	NT	NT	NT	33 пМ	NT
Н1Н3328Р	NT	NT	112 пМ	NT	NT
Н1Н3330Р	NT	NT	7 пМ	NT	7 пМ
Контроль I	NT	NT	NT	NT	199 пМ
Контроль	18 пМ	6 пМ	10 пМ	11 пМ	9 пМ

NT: не тестировали

Таблица 8В. Нейтрализующая эффективность (IC_{50}) для выбранных mAb к токсину А

mAb	Испытание 1 (IC_{50}) 0,1 пМ токсина В	Испытание 2 (IC_{50}) 0,1 пМ токсина В	Испытание 3 (IC_{50}) 0,03 пМ токсина В
H1M3067N	Нейтрализация		
H1M3134N	Нейтрализация		
H1H3317P	Нейтрализация	NT	NT
H1H3335P	730 пМ	380 пМ	120 пМ
H1H3337P	1730 пМ	980 пМ	320 пМ
H1H3339P	480 пМ	270 пМ	90 пМ
H1H3343P	280 пМ	200 пМ	50 пМ
H1H3344P	580 пМ	400 пМ	40 пМ
H1H3347P	130 пМ	90 пМ	25 пМ
H1H3350P	Нейтрализация	NT	NT
H1H3340P	NT	Нейтрализация	NT
H1H3411P	NT	8 пМ [#]	NT
Контроль II	1800 пМ	1500 пМ	290 пМ

[#] антитело лишь частично защищало (40-50%) при наиболее высокий концентрациях

NT: не тестировали

Пример 8. Создания биспецифического антитела

Создавали различные биспецифические антитела для применения при практическом осуществлении способов согласно настоящему изобретению. Например, специфичные к токсину А или токсину В *S. difficile* антитела создавали в формате биспецифической молекулы ("биспецифическая молекула"), в которой переменные участки, связывающиеся с различными доменами токсина А и/или В, соединяли вместе для придания специфичности к двум доменам и/или токсинам в одной связывающейся молекуле. Соответственно обозначенные биспецифические молекулы могли повышать общую эффективность нейтрализации токсина путем увеличения как специфичности, так и авидности связывания. Переменные участки со специфичностью к отдельным доменам, которые показаны на фигуре 1, (например, сегменты N-концевого домена, который представляет собой гликозилирующий ферментный домен (обозначенный как домен 'А'), или домен автокаталитического процессинга (обозначенный как домен 'С'), или транслокационный домен (обозначенный как домен 'D'), или карбоксиконцевой связывающийся с рецептором домен (обозначенный как домен 'В'), или которые могли связываться с различными участками в одном домене, образовывали пары на структурном каркасе, что позволяло каждому участку одновременно связываться с отдельными эпитопами или с различными участками одного домена. В одном примере биспецифической молекулы переменные участки тяжелых цепей (V_H) из молекулы связывания со специфичностью к одному домену рекомбинировали с переменными участками легких цепей (V_L) из ряда молекул связывания со специфичностью ко второму домену для выявления неродственных V_L -партнеров, которые могут образовывать пары с исходным V_H без нарушения исходной специфичности у такого V_H . Таким образом, отдельный V_L -сегмент (например, V_L1) можно комбинировать с двумя различными V_H -доменами (например, V_H1 и V_H2) для создания биспецифической

молекулы, состоящей из двух связывающих "плечей" (V_{H1} - V_{L1} и V_{H2} - V_{L1}).

Использование отдельного V_L сегмента уменьшало сложность системы и, таким образом, упрощало и повышало эффективность способов клонирования, экспрессии и очистки, использованных для создания биспецифической молекулы (см., например, USSN13/022759 и US2010/0331527).

Альтернативно, антитела, которые связываются как с токсином А так и/или с токсином В и второй мишенью, такой как без ограничения, например, второе отличное антитело к токсину А или токсину В, или анатоксин, или вакцина, можно получить в формате биспецифической молекулы с применением описываемых в настоящем документе методики или других, известных специалистам в настоящей области методик. Вариабельные участки антител, связывающиеся с различными участками токсина А, можно соединить с вариабельными участками, которые связываются с соответствующими сайтами, например, на токсине В, для придания специфичности к двум антигенам в одной связывающейся молекуле. Соответственно сконструированные биспецифические молекулы такой природы выполняют двойную функцию. Например, в случае биспецифического антитела, которое связывается как с токсином А, так и с токсином В, оно может лучше нейтрализовать одновременно как токсин А, так и токсин В без необходимости введения композиции, содержащей два отдельных антитела. Вариабельные участки со специфичностью к токсину А комбинировали с вариабельным участком со специфичностью к токсину В и образовывали пары на структурном каркасе, что позволяло каждому вариабельному участку связываться с отдельными антигенами.

Биспецифические молекулы связывания тестировали в отношении связывания и функциональной блокировки целевых антигенов, например, токсина А и токсина В, в любом из описанных выше для антител анализах. Например, для оценки биспецифического взаимодействия использовали стандартные способы измерения связывания растворимого белка, такие как Biacore, ELISA, эксклюзионная хроматография, многоугловое рассеивание лазерного света, прямая сканирующая калориметрия и другие способы. Связывание биспецифических антител как с токсином А, так и с токсином В определяли посредством ELISA-анализа связывания, при котором искусственные пептиды, представляющие собой различные токсины, наносили на лунки в титровальных микропланшетах, а связывание биспецифической молекулы определяли с помощью вторичного идентифицирующего антитела. Также проводили эксперименты по связыванию с применением экспериментов на основе поверхностного плазмонного резонанса, в которых взаимодействия при связывании пептида с антителом в реальном времени измеряли путем пропускания пептида или биспецифической молекулы по поверхности датчика, на котором были захвачены, соответственно, биспецифическая молекула или пептид. Функциональную блокировку *in vitro* как токсина А, так и токсина В биспецифической молекулой определяли с помощью любого биоанализа, такого как описываемый в настоящем документе анализ нейтрализации, или с помощью исследований иммунитета *in vivo* в соответствующих животных моделях, таких как описываемые в настоящем документе.

Пример 9. Оценка эффективности *in vivo* антител к токсину А и/или к токсину В против инфицирования *C. difficile* (CDI) в модели рецидива у хомяков (А) и в модели острого воспаления у хомяков (В)

Эффективность антител, специфичных к токсину А и/или токсину В из *C. difficile*, против инфицирования *C. difficile* оценивали у хомяков в двух различных описанных ниже моделях. Хомяки в присутствии клиндамицина восприимчивы к инфицированию *C. difficile* и обычно погибают в течение 2-4 дней после инфицирования.

(А) модель рецидива: Самцам сирийских золотых хомяков давали пероральную суспензию, содержащую смесь спор и бесспорных клеток *C. difficile* (всего 10^6), в день -1. Спустя двадцать четыре часа после инфицирования (день 0) животным делали однократную подкожную инъекцию клиндамицина (10 мг/кг). В дни 1-3 хомякам вводили перорально ванкомицин (10 мг/кг) один раз в день для ослабления инфекции. Антибиотик ванкомицин использовали с клинической точки зрения для лечения инфекции *C. difficile*. После последней дозы ванкомицина антитела ежедневно вводили подкожно в течение 4 дней (дни 3-6) или 1 дня (день 3) в соответствии с их группой лечения и дозировки (см. приведенные ниже таблицы 9А и 9В).

Проводили два различных испытания (см. фигуры 2 и 3) с применением модели рецидива в качестве замены оценки клинической эффективности. В обоих испытаниях сравнивали две комбинации антител:

1. антитела, обозначенные Н1Н3330РиН1Н3347Р;
2. антитела сравнения к токсину А (контроль I; см. патент США 7625559 для последовательности клона 3D8) и антитела сравнения к токсину В (контроль II; см. патент США 7625559 для последовательности клона 124-152).

В испытании 1 четыре дозы антитела вводили в количестве 5 мг/кг каждого антитела (общая доза 10 мг/кг). В испытании 2 одну дозу антитела давали в количестве либо 5 мг/кг, либо 2 мг/кг каждого антитела (всего либо 10 мг/кг, либо 4 мг/кг).

Таблица 9А. Схема испытания 1: модель рецидива. Комбинированные лечения Н1Н3330Р + Н1Н3347Р или антителом сравнения к токсину А + антителом сравнения к токсину В

Группа	лечение*	Доза (мг/кг х кол-во доз)	n
1	Антитело отрицательного контроля (иррелевантное)	10 x 4	14
2	Антитело сравнения к токсину А и антитело сравнения к токсину В	[5/5] x 4	23
3	(комбинация Н1Н3330Р + Н1Н3347Р)	[5/5] x 4	23
4	Без антитела		15

* Всем животным давали ванкомицин, как указано выше.

Таблица 9В. Схема испытания 2: модель рецидива. Комбинированные лечения Н1Н3330Р + Н1Н3347Р или антителом сравнения к токсину А + антителом сравнения к токсину В

Группа	лечение*	Доза (мг/кг x кол-во доз)	
1	Антитело отрицательного контроля (иррелевантное)	10 x 1	4
2	Антитело сравнения к токсину А and антитело сравнения к токсину В	[5/5] x 1	6
3	(комбинация Н1Н3330Р + Н1Н3347Р)	[5/5] x 1	6
4	Антитело сравнения к токсину А и антитело сравнения к токсину В	[2/2] x 1	6
5	(комбинация Н1Н3330Р + Н1Н3347Р)	[2/2] x 1	6

* Всем животным давали ванкомицин, как указано выше.

В ходе эксперимента животных осматривали два раза в день. Общие осмотры включали признаки смертельного исхода и заболеваемости, наличие диареи ("влажный хвост") и общий внешний вид (активность, общая реакция на взятие в руки, прикосновение, взлохмаченная шерсть). Животных, которые, согласно оценке, находились в предсмертном состоянии, умерщвляли. Используемыми критериями для оценки предсмертного состояния были продолжительные периоды (5 дней) потери массы, прогрессирование до истощенного состояния, продолжительная заторможенность (более 3 дней), признаки паралича, эрозии или травмы кожи, сгорбленная поза и вздутый живот. Наблюдения продолжали, при этом регистрировали смертельные случаи или умерщвление в течение периода до 18 дней после инициализации для модели рецидива.

(В) модель острого воспаления: Самцам сирийских золотых хомяков внутривенно вводили клиндамицин с дозой 10 мг/кг на день -1. На день 0 споры *C. difficile* разбавляли стерильным PBS с получением 100 спор /300 мкл и вводили путем перорального принудительного кормления. Антитела вводили каждый день в течение 4 дней, начиная на день -3 и продолжая до дня 0 подкожным путем. Доза антител показана на условных обозначениях к фигуре. Для схемы исследования см. также приведенную ниже таблицу 9С.

Таблица 9C. Испытание 3: модель острого воспаления. Комбинированные
лечения посредством Н1Н3330Р + Н1Н3347Р в различных дозах

Группа	Лечение	Доза (мг/кг x кол-во доз)	Кол-во животных
1	Неинфицированный контроль	-	5
2	Инфицированный контроль	PBS x 4	10
3	Антитело отрицательного контроля (иррелевантное)	[100] x 4	14
4	(комбинация Н1Н3330Р + Н1Н3347Р)	[50/50] x 4	14
5		[16/16] x 4	14
6		[5,5/5,5] x 4	14
7		1,85/1,85 x 4	14

Таблица 9D. Испытание 4: модель острого воспаления. Комбинированные
лечения посредством Н1Н3330Р + Н1Н3347Р в различных дозах

Группа	Лечение	Доза (мг/кг x кол-во доз)	Кол-во животных
1	Неинфицированный контроль	-	5
2	Инфицированный контроль	PBS x 4	10
3	Антитело отрицательного контроля (иррелевантное)	[100] x 4	14

4	(комбинация Н1Н3330Р + Н1Н3347Р)	[20/20] x 4	14
5		[5/5] x 4	14
6	Антитело сравнения к токсину А и антитело сравнения к токсину В	[20/20] x 4	14
7		[5/5] x 4	14

В ходе эксперимента животных осматривали два раза в день. Общие осмотры включали признаки смертельного исхода и заболеваемости, наличие диареи ("влажный хвост") и общий внешний вид (активность, общая реакция на взятие в руки, прикосновение, взлохмаченная шерсть). Животных, которые, согласно оценке, находились в предсмертном состоянии, умерщвляли. Используемыми критериями для оценки предсмертного состояния были продолжительные периоды (5 дней) потери массы, прогрессирование до истощенного состояния, продолжительная заторможенность (более 3 дней), признаки паралича, эрозии или травмы кожи, сгорбленная поза и вздутый живот. Наблюдения продолжали, при этом регистрировали смертельные случаи или умерщвление в течение периода до 10 дней для модели острого воспаления.

Результаты

Статистический анализ данных, полученных из моделей на хомяках, выполняли с применением логарифмического рангового критерия (критерия Кокса-Мантеля). Для парных сравнений для критичного значения Р применяли поправку по методу Бонферрони.

В первом испытании, которое представляло собой многодозовое исследование с помощью модели рецидива на хомяках, (см. фигуру 2), комбинированное лечение посредством Н1Н3330Р плюс Н1Н3347Р или комбинированное лечение посредством антитела сравнения, было видно повышение общей выживаемости по сравнению с изотопическим контролем или только ванкомицином (74-78% комбинация антител к токсину А и токсину В по сравнению с 27-43%) контрольными группами). В частности, ко дню 19 выживало 27% хомяков, получавших только PBS; выживало 43% получавших изотопический контроль; выживало 74% получавших комбинацию антител сравнения к токсину А плюс токсину В; и выживало 78% получавших комбинацию Н1Н3330Р (антитело к А) плюс Н1Н3347Р (антитело к В).

Во втором испытании, которое представляло собой однократное исследование с помощью модели рецидива на хомяках (см. фигуру 3), комбинированное лечение посредством либо Н1Н3330Р плюс Н1Н3347Р, либо антител сравнения повышало выживаемость по сравнению с изотипическим контролем (антитело отрицательного контроля), хотя различие между дозами 2 мг/кг и 5 мг/кг отсутствовало.

В первом исследовании на модели острого воспаления на хомяках (см. фигуру 4), при лечении посредством комбинации Н1Н3330Р плюс Н1Н3347Р наблюдали значимую защиту хомяков от смертельного исхода в зависимости от изменения титра по сравнению с отрицательными контролями ($p < 0,0001$ для всех групп по сравнению с изотипическими контролями). Дозы изменялись от 50 мг/кг до 1,85 мг/кг (каждого антитела, которое давали в виде комбинации), причем высокая доза обеспечивала защиту для всех животных до дня 7 по сравнению с днем 1 для наиболее низкой дозы.

В последующих исследованиях с применением модели острого воспаления у хомяков (см. фигуру 5), комбинированное лечение либо Н1Н3330Р плюс Н1Н3347Р, либо комбинацией антител сравнения значительно повышало выживаемость по сравнению с изотипическим контролем (фигура 5; изотипический контроль в количестве 40 мг/кг по сравнению с контроль I/контроль II в количестве 20 мг/кг каждого, $p < 0,0001$; изотипический контроль в количестве 40 мг/кг по сравнению с контроль I/контроль II в количестве 5 мг/кг каждого, $p = 0,0003$; изотипический контроль в количестве 40 мг/кг по сравнению с Н1Н3330Р/Н1Н3347Р в количестве 20 мг/кг каждого, $p < 0,0001$; изотипический контроль в количестве 40 мг/кг по сравнению с Н1Н3330Р/Н1Н3347Р в количестве 5 мг/кг каждого, $p < 0,0001$). Тем не менее, лечение комбинацией Н1Н3330Р плюс Н1Н3347Р защищало хомяков от смертельного исхода лучше контролей, представлявших собой антитело сравнения, при тестировании с низкой дозой, составлявшей 5 мг/кг каждого антитела ($p < 0,0001$), в то время как значимое отличие между комбинацией Н1Н3330Р плюс Н1Н3347Р и комбинацией антител сравнения с более высокой дозой, составлявшей 20 мг/кг каждого антитела ($p = 0,73$), отсутствовало. Из результатов явно видно преимущество низкой дозы в модели острого воспаления у хомяков, и можно предположить, что дозы антител Н1Н3330Р плюс Н1Н3347Р в клинической практике могут быть эффективны при более низких концентрациях по сравнению с антителами сравнения.

Пример 10. Влияние антител к токсину А и токсину В на блокировку цитотоксичности, вызванной культуральным супернатантом от нескольких гипервирулентных штаммов *S. difficile* группы BI: сравнение с mAb сравнения

Пациенты, инфицированные клинически гипервирулентными штаммами BI/NAP1/027, имеют более низкие показатели эффективности лечения, чем пациенты, инфицированные отличными от BI штаммами, при лечении либо фидаксомицином, либо ванкомицином (Petrella, LA, et al. (2012), *Clinical Infectious Diseases*, 55(3): 351-357). Вместе с тем штаммы BI/NAP 1/027 ассоциированы с более высокой частотой рецидивов CDI и более высоким ожидаемым процентом смертности по сравнению со штаммами-прототипами (Loo, VG, et al. (2005), *N Engl J Med*, 353:23; Petrella, LA, et al. (2012), *Clinical Infectious Diseases*, 55(3): 351-357. Эти гипервирулентные штаммы характеризуются повышением продукции токсинов А и В, наличием двухкомпонентного токсина и повышенной устойчивостью к фторхинолонам. Повышение продукции токсинов А и В наиболее вероятно вызвано приводящей к потере функции мутацией в *tcdC*, предполагаемый отрицательный регулятор экспрессии *tcdA* и *tcdB*, которая приводит к непрерывной продукции токсина на протяжении всего жизненного цикла.

Способность смеси Н1Н3330Р и Н1Н3347Р с молярным соотношением 1:1 нейтрализовать токсин из четырех клинически выделенных штаммов BI/NAP1/027 *S. difficile* тестировали в ходе клеточного анализа нейтрализации. Клинически выделенные гипервирулентные штаммы VA5 и VA17 получали от Case Western Reserve University, Кливленд, Огайо. Клинически выделенные гипервирулентные штаммы 6336 и 6443 получали из Dept. of Veterans Affairs, Edward Hines, Jr. Hospital, Хайнз, Иллинойс. В анализах нейтрализации использовали клетки Веро, линии эпителиальных клеток обезьяны почки, по причине их восприимчивости к обоим токсинам *S. difficile*. В течение 48 часов клетки инкубировали с различными количествами коктейля антител и фиксированным количеством культурального супернатанта, выделенного из нескольких штаммов *S. difficile*. Цитотоксичность определяли путем добавления реактива WST-1, химического индикатора окислительно-восстановительной реакции, который при восстановлении приводил к колориметрическому изменению;

метаболическая активность во время роста клеток восстанавливала WST-1, что в результате давало повышенное поглощение при 450 нм.

Культуральный супернатант из нескольких клинически выделенных штаммов ВІ характеризовался широким спектром цитотоксической активности на клетках Веро, со значениями EC_{50} для индукции клеточной цитотоксичности, варьирующими в диапазоне от 3700-кратного разведения для штамма VA5 до 88200-кратного разведения для штамма 6443. Смесь Н1Н3330Р и Н1Н3347Р в молярном соотношении 1:1 блокировала цитотоксичность, индуцированную культуральными супернатантами из всех протестированных штаммов группы ВІ с более чем в 34 раза лучшей нейтрализующей эффективностью по сравнению со смесью антитела сравнения к токсину А (контроль I; см. патент США 7625559 для последовательности клона 3D8) и антитела сравнения к токсину В (контроль II; см. патент США 7625559 для последовательности клона 124-152) в молярном соотношении 1:1. Из этих данных видно, что пара антител Н1Н3330Р/Н1Н3347Р могла нейтрализовать цитотоксичность культуры со значениями IC_{50} в пикомолярном диапазоне (31-45 пМ) для тестированных гипервирулентных штаммов ВІ по сравнению с коктейлем mAb сравнения (диапазон IC_{50} : 1200-1700 пМ; см. таблицу 10).

Таблица 10

Штамм	EC_{50} (кратность разведения)	Анализ нейтрализации			
		{супернатант I (кратность разведения)}	Н1Н3330Р/ Н1Н3347Р IC_{50} (пМ)	mAb сравнения, 1/2 IC_{50} (пМ)	Кратность пара/контроль
VA5	6900	4700	36	1400	39
VA17	3700	3000	31	1400	45
6336	15200	12100	45	1700	38
6443	88200	57500	35	1200	34

Пример 11. Картирование эпитопа антитела Н1Н3330Р к токсину А

Эпитоп С-концевого связывающегося с рецептором домена (CBD) токсина А (SEQ ID: 375), связываемый Н1Н3330Р, определяли с применением масс-спектрометрической методов протеомики. В нескольких словах, CBD токсина А подвергали расщеплению трипсином в течение 12-часового периода и образцы прогоняли на 10-14% градиентном SDS-PAGE с последующим переносом на нитроцеллюлозные мембраны и вестерн-блоттингом с применением либо антитела Н1Н3330Р, либо антитела контроля I (см. патент США 7625559 для последовательности антитела 3D8) в качестве первичных антител. Дополнительный анализ пептидных последовательностей, которые связывались с антителом Н1Н3330Р, проводили с применением 2D электрофореза с последующим MALDI-TOF MS-анализом. Ниже эти процедуры описаны более подробно.

Ограниченное расщепление трипсином токсина А

К рекомбинантному С-концевому связывающемуся с рецептором домену (CBD) токсина А (0,4 мкг/мкл в PBS) добавляли модифицированный по типу последовательности трипсин (Promega, кат. № V511C) в массовом соотношении 1:80 и инкубировали при 37°C в течение 0-12 часов. Фермент инактивировали путем добавления 2 объемов IX буфера для образца Laemmli и нагревали при 95°C в течение 5 минут.

Образцы хранили при -20°C до проведения анализа.

Вестерн-блоттинг

Сначала исследовали степень протеолиза с помощью 10-14% градиентного SDS-PAGE. Количество каждого загружаемого образца было эквивалентно 1 мкг
5 изначального CBD токсина А, а разделенные белки в геле визуализировали с помощью красителя кумасси SimplyBlue (Invitrogen, кат. № LC6065).

Образцы, расщепляемые на протяжении 0 часов и 12 часов, затем отбирали по разделению при 10-14% градиентном SDS-PAGE при помощи эквивалентного 50 нг изначального CBD токсина А, загруженного для каждого образца. Разделенные белки
10 переносили на нитроцеллюлозную мембрану и зондировали при помощи первичного антитела H1H3330P или антитела контроль 1 с концентрацией 1 мкг/мл в TBST (забуференный Tris солевой раствор, содержащий 0,05% Tween-20) в течение ночи при 4°C с последующим добавлением конъюгированного с HRP вторичного антитела к IgG человека (Pierce, кат. №31412; при 1:15000 разведении в TBST). Как антитела H1H3330P,
15 так и антитела контроль 1 имели константный домен IgG1 человека. Мембрану инкубировали с хемилюминесцентным субстратом (Perkin Elmer, кат. № NEL103E001EA) и получали изображение на рентгеночувствительной пленке.

2D гель-электрофорез

Для определения того, какие аминокислоты представлены в бэнде белка, присущему
20 в вестерн-блотах, полученных с применением антитела H1H3330P, проводили двухмерный (2D) гель-электрофорез с применением 12-часового расщепления трипсином CBD токсина А.

Расщепление трипсином в геле и пептидное картирование с помощью MALDI-TOF MS

2D-гель-анализ выявлял 4 белковых зоны, близко расположенных друг к другу в pH
25 (значения pI ~ 9) направлении, которые составляли 50 кДа бэнд, который визуализировали с помощью вестерн-блоттинга с применением H1H3330P. 4 белковых зоны с соответствующими молекулярными массами ~50 кДа из 2D-геля с применением 12-часового расщепления трипсином извлекали, обесцвечивали с помощью 50%
30 ацетонитрила, восстанавливали с помощью 65 mM DTT и алкилировали с помощью 135 mM йодацетамида. После обезвоживания с помощью ацетонитрила добавляли 20 мкл 2,5 нг/мкл модифицированного по типу последовательности трипсина (Promega, кат. № V5111) для покрытия всех бэндов геля и проводили расщепление в геле путем инкубации в течение ночи при 37°C.

Полученные пептиды обессоливали с помощью Ziptip C18 (Millipore, кат. № ZTC18S096) и анализировали с помощью MALDI-TOF-TOF MS Bruker UltrafleXtreme. Спектр обрабатывали с помощью программного обеспечения FlexAnalysis и производили
внутреннюю калибровку по пикам аутолитических трипсиновых фрагментов. Производили поиск перечней калибровочных пиков относительно собственной базы
40 данных, содержащей последовательность CBD токсина А, с погрешностью при измерении массы 10 ppm.

Результаты

Из результатов видно, что посредством блоттинга с помощью H1H3330P выявляли основной бэнд белка с массой около 50 кДа через 12 часов после расщепления
45 трипсином, в то время как не наблюдали бэнд белка с молекулярной массой около 50 кДа при проведении блоттинга с антителом контроль 1 через 12 часов после расщепления трипсином.

Для определения того, какие аминокислоты представлены в бэнде 50 кДа белка,

присущие в вестерн-блотах, полученных с применением H1H3330P, проводили двухмерный (2D) гель-электрофорез с применением описанного выше 12-часового расщепления трипсином. Как уже указано, 2D-гель-анализ выявлял 4 белковых зоны, близко расположенных друг к другу в pH (значения pI ~ 9) направлении, которые составляли 50 кДа бэнд, визуализированный с помощью вестерн-блоттинга с применением H1H3330P. Масс-спектрометрия этих 4 белковых пятен показала 17 совпадающих пептидов, охватывающих аминокислотные остатки 468-863 CBD токсина A (SEQ ID: 375). Этот фрагмент токсина A (аминокислоты, охватывающие остатки 468-863) имел прогнозируемую молекулярную массу 45 кДа и прогнозируемую изoelectric point 9,01, вполне соответствующую значениям, полученным в результате 2-D гель-электрофоретического анализа.

Из этого примера видно, что антитело к токсину A H1H3330P имело эпитоп, отличающийся от эпитопа контроля 1 (3D8 в US 7625559), и связывалось с CBD токсина A в пределах аминокислот 468-863. В пределах этого участка выявляли конкретные аминокислотные последовательности, которые взаимодействовали с антителом H1H3330P, и такими аминокислотными последовательностями были остатки 468-488 из SEQ ID NO: 375, остатки 510-530 из SEQ ID NO: 375, остатки 602-610 из SEQ ID NO: 375, остатки 644-703 из SEQ ID NO: 724-794 из SEQ ID NO: 375, остатки 799-814 из SEQ ID NO: 375 и остатки 858-863 из SEQ ID NO: 375.

(57) Формула изобретения

1. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином A *Clostridium difficile*, содержащие три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности варибельного участка тяжелой цепи (HCVR), выбранной из SEQ ID NO: 2, 98, 130, 146 и 162; и три определяющих комплементарность участка легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности варибельного участка легкой цепи (LCVR), выбранной из SEQ ID NO: 10, 106, 138, 154 и 170.

2. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 1, которые специфично связываются с токсином A *Clostridium difficile*, причем антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат: (a) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 146; и (b) LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 154.

3. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 1, которые специфично связываются с токсином A *Clostridium difficile*, причем антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из SEQ ID NO: 2/10, 98/106, 130/138, 146/154 и 162/170.

4. Выделенное антитело по любому из пп. 1 или 3 или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином A *Clostridium difficile*, причем антитело содержит:

(a) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 4, 100, 132, 148 и 164;

(b) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 6, 102, 134, 150 и 166;

(c) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 8, 104, 136, 152 и 168;

(d) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID

NO: 12, 108, 140, 156 и 172;

(е) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 14, 110, 142, 158 и 174; и

(f) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 16, 112, 144, 160 и 176.

5. Выделенное антитело по любому из пп. 1 или 3, или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином A *Clostridium difficile*, причем антитело содержит:

- (a) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 148;
- (b) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 150;
- (c) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 152;
- (d) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 156;
- (е) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 158; и
- (f) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 160.

6. Выделенное антитело по п. 2, которое взаимодействует или связывается с эпитопом внутри аминокислотных остатков 468-863 карбоксиконцевого связывающегося с рецептором домена продуцируемого *Clostridium difficile* токсина А, или его антиген-связывающий фрагмент, причем карбоксиконцевой связывающийся с рецептором домен токсина А содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 375.

7. Выделенное антитело по п. 2, которое взаимодействует или связывается с эпитопом внутри карбоксиконцевого связывающегося с рецептором домена продуцируемого *Clostridium difficile* токсина А, или его антиген-связывающий фрагмент, причем эпитоп выбран из группы, состоящей из остатков 468-488 из SEQ ID NO: 375, остатков 510-530 из SEQ ID NO: 375, остатков 602-610 из SEQ ID NO: 375, остатков 644-703 из SEQ ID NO: 375, остатков 724-794 из SEQ ID NO: 375, остатков 799-814 из SEQ ID NO: 375 и остатков 858-863 из SEQ ID NO: 375.

8. Фармацевтическая композиция для нейтрализации токсинов *Clostridium difficile*, содержащая эффективное количество одного или нескольких антител по любому из пп. 1-7 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

9. Фармацевтическая композиция по п. 8, причем композиция содержит по меньшей мере одно антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином А *Clostridium difficile*, и по меньшей мере одно антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В *Clostridium difficile*, причем:

а) антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином А, содержат три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей варибельного участка тяжелой цепи (HCVR), выбранной из SEQ ID NO: 2, 98, 130, 146 и 162; и три определяющие комплементарность участка легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей варибельного участка легкой цепи (LCVR), выбранной из SEQ ID NO: 10, 106, 138, 154 и 170; и причем

б) антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином В, содержат три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей HCVR, выбранной из SEQ ID NO: 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338 и 354; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей LCVR, выбранной из SEQ ID NO: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282,

298, 314, 330, 346 и 362.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 8 или 9, причем антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином A *Clostridium difficile*, содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 146/154, и причем антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином B *Clostridium difficile*, содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 274/282.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 8 или 9, содержащая:

а) выделенное первое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином A *Clostridium difficile*, содержащие HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 148, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 150, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 152, LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 156, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 158, LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 160;

б) выделенное второе антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином B *Clostridium difficile*, содержащие HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 276, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 278, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 280, LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 284, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 286, LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 288; и

с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 8 или 9, причем содержащиеся в композиции антитела эффективны при нейтрализации токсинов A и B из гипервирулентного штамма *Clostridium difficile*.

13. Фармацевтическая композиция по п. 12, причем гипервирулентный штамм *Clostridium difficile* представляет собой штамм BI/NAP1/027.

14. Фармацевтическая композиция по п. 13, причем штамм BI/NAP1/027 выбран из VA5, VA17, 6336 и 6443.

15. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином A *Clostridium difficile*, содержащие три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи (HCVR) SEQ ID NO: 114; и три определяющих комплементарность участка легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности вариабельного участка легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 122.

16. Фармацевтическая композиция для нейтрализации токсинов *Clostridium difficile*, содержащая эффективное количество одного или нескольких антител по п. 15 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

17. Фармацевтическая композиция по п. 16, дополнительно содержащая антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином B *Clostridium difficile*, при этом антитело содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей HCVR, выбранной из SEQ ID NO: 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338 и 354; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей LCVR, выбранной из SEQ ID NO: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346 и 362.

18. Способ лечения пациента, страдающего от ассоциированного с *Clostridium difficile* состояния или заболевания, или лечения по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанных с указанным состоянием или заболеванием, или предупреждения развития ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния у пациента, подверженного такому риску, причем способ предусматривает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 8-14 или 16-17, причем ассоциированное с *Clostridium difficile* состояние или заболевание либо предупреждают, либо уменьшают по тяжести и/или продолжительности, или предупреждают или облегчают по меньшей мере один симптом или осложнение, связанные с указанным состоянием или заболеванием, или уменьшают его частоту и/или продолжительность или тяжесть рецидивов или обострений, вызванных *Clostridium difficile*.

19. Способ по п. 18, причем по меньшей мере один симптом или осложнение, связанные с ассоциированными с *Clostridium difficile* состоянием или заболеванием, выбраны из группы, состоящей из анорексии, боли в животе, вздутия живота, диареи с кровотечением или без него, обезвоживания, расстройства пищеварения, псевдомембранозного колита, полной или сегментной резекции толстого кишечника, сопровождающейся лихорадкой и системной инфекции (сепсиса), смертельного исхода, обострения вызванного *Clostridium difficile* состояния или заболевания и отторжения трансплантированной ткани или органа.

20. Способ по п. 18 или 19, причем пациент, подверженный риску развития ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния, выбран из группы, состоящей из пожилого пациента (возрастом ≥ 65), пациента, который имеет иммунную недостаточность в связи с первопричинной болезнью или в связи с введением иммуносупрессивных терапевтических средств, пациента, у которого есть некоторое первопричинное медицинское состояние, которое может вызывать у него предрасположенность к возникновению инфекции *Clostridium difficile*, пациента, госпитализированного на протяжении длительного периода времени (по меньшей мере одна неделя), пациента, которого лечили на протяжении продолжительного периода времени (≥ 14 дней) антибиотиками широкого спектра действия, пациента со злокачественной опухолью, проходящего трансплантацию пациента и пациента, подвергаемого терапии средствами, такими как без ограничения ингибитор протонного насоса или ингибитор гистаминового рецептора H₂, которые применяют для лечения заболеваний или состояний желудочно-кишечного тракта для уменьшения или лечения кислотности желудочного сока, гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (GERD), язв желудка или тонкой кишки или изжоги.

21. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 8 или 9 или 16-17 для применения при лечении пациента, страдающего от ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния, или лечения по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанных с указанным состоянием или заболеванием, или предупреждения развития ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния у пациента, подверженного такому риску, причем ассоциированное с *Clostridium difficile* заболевание или состояние либо предупреждают, либо уменьшают по тяжести и/или продолжительности, или предупреждают или облегчают по меньшей мере один симптом или осложнение, связанные с указанным состоянием или заболеванием, или уменьшают его частоту и/или продолжительность или тяжесть рецидивов или обострений, вызванных *Clostridium difficile*.

22. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 8-14 или 16-17 при

производстве лекарственного препарата для применения при лечении пациента, страдающего от ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния, или лечения по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанных с указанным состоянием или заболеванием, или предупреждения развития ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния у пациента, подверженного такому риску, причем ассоциированное с *Clostridium difficile* заболевание или состояние либо предупреждают, либо уменьшают по тяжести и/или продолжительности, или предупреждают или облегчают по меньшей мере один симптом или осложнение, связанные с указанным состоянием или заболеванием, или уменьшают его частоту и/или продолжительность или тяжесть рецидивов или обострений, вызванных *Clostridium difficile*.

23. Применение по п. 22, причем пациент, подверженный риску развития ассоциированного с *Clostridium difficile* заболевания или состояния, выбран из пожилого пациента, пациента, который имеет иммунную недостаточность в связи с болезнью или в связи с введением иммуносупрессивных терапевтических средств, пациента, у которого есть некоторое первопричинное медицинское состояние, которое может вызывать у него предрасположенность к возникновению инфекции *Clostridium difficile*, пациента, госпитализированного на протяжении длительного периода времени, пациента, которого лечили на протяжении продолжительного периода времени антибиотиками широкого спектра действия, пациента, подвергаемого терапии ингибитором протонного насоса для лечения заболеваний или состояний желудочно-кишечного тракта, пациента со злокачественной опухолью и проходящего трансплантацию пациента.

24. Применение по п. 23, причем пациент со злокачественной опухолью проходит лечение при помощи противоопухолевого лекарственного средства или проходит лучевую терапию для лечения злокачественной опухоли.

25. Применение по п. 23, причем проходящим трансплантацию пациентом является пациент, получающий трансплантат гемопоэтических стволовых клеток или трансплантат твердой ткани или цельного органа.

26. Применение по п. 23 или 25, причем проходящий трансплантацию пациент подвергается лечению иммуносупрессивным лекарственным средством или любым лекарственным средством, препятствующим отторжению трансплантата, или он проходит лечение согласно схеме приема лекарственного средства для предупреждения отторжения после трансплантации трансплантируемых ткани или органа.

27. Применение по п. 22, причем фармацевтическая композиция вводится пациенту в комбинации со вторым терапевтическим средством.

28. Применение по п. 27, причем второе терапевтическое средство выбрано из анатоксина, вакцины против *Clostridium difficile*, антибиотика, другого отличного антитела к токсину А и/или В *Clostridium difficile* и любого другого паллиативного средства терапии, пригодного для ослабления по меньшей мере одного симптома, связанного с ассоциированным с *Clostridium difficile* заболеванием или состоянием.

29. Применение по п. 28, причем по меньшей мере один симптом или осложнение, связанные с ассоциированными с *Clostridium difficile* состоянием или заболеванием, выбраны из группы, состоящей из анорексии, боли в животе, вздутия живота, диареи с кровотечением или без него, обезвоживания, расстройства пищеварения, псевдомембранозного колита, полной или сегментной резекции толстого кишечника, сопровождающейся лихорадкой и системной инфекции (сепсиса), смертельного исхода, обострения вызванного *Clostridium difficile* состояния или заболевания и отторжения трансплантированной ткани или органа.

30. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп. 1-7.

31. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 30.

32. Выделенная клетка-хозяин для получения антитела или его антиген-связывающего фрагмента, которые специфично связываются с токсином A Clostridium difficile,

5 содержащая вектор экспрессии по п. 31.

33. Фармацевтическая композиция по п. 8, дополнительно содержащая второе антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином B Clostridium difficile.

34. Фармацевтическая композиция по п. 33, в которой второе антитело или его
10 антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с токсином B Clostridium difficile содержат HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 276, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 278, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 280, LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 284, LCDR2 с аминокислотной последовательностью
15 SEQ ID NO: 286, и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 288.

20

25

30

35

40

45

Перечень последовательностей

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Human Antibodies to Clostridium Difficile Toxins

<130> 7150A-WO

<140> To be assigned

<141> Filed herewith

<150> 61/605,914

<151> 2012-03-02

<150> 61/608,255

<151> 2012-03-08

<150> 61/717,404

<151> 2012-10-23

<160> 398

<170> FastSEQ for windows Version 4.0

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 1

gaggtgcaac tgttggagtc tgggggaggc ttggcacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caactttggc acccatgaca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg gactagagtg ggtctcaggt cttacaagta ctggtggtag cgcttcctcc 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa tattctgtat 240
 ttacaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaacgttt 300
 aactggaact cctactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 2

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

<220>
<223> synthetic

4

<400> 4
Gly Phe Asn Phe Gly Thr His Asp
1 5

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 5
cttacaagta ctggtggtag cgct 24

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 6
Leu Thr Ser Thr Gly Gly Ser Ala
1 5

<210> 7
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 7
gcgaaaacgt ttaactggaa ctctacttt gactac 36

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 8
Ala Lys Thr Phe Asn Trp Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 9
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 9

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtattagc acctactact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctgaccagc ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggac 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcaa cagtatggta actcactgta cacttttggc 300
caggggacca agctggagat caaa                                     324

```

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 10

```

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

```

<400> 12
Gln Ser Ile Ser Thr Tyr Tyr
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 13

ggtacatcc

9

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 14

Gly Thr Ser

1

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 15

caacagtatg gtaactcact gtacact

27

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 16

Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Leu Tyr Thr

1

5

<210> 17

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 17

caggtacaac tgggtggaatc tgggggagac gtggttcagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag catctggatt caccttcagt ggccacggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg gtctagagtg ggtggcactt atattgtatg atggaagtag tgaagactat 180
 acagactccg tgaagggccg cttaccgtc tccagagaca attccaagaa caccctgtat 240
 ttgcaaatga acagtctgag agccgaagac acggctgtct attactgtgc gcgagggagt 300
 attttaaadc gcccgtttga ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 18

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

Ala Arg Gly Ser Ile Leu Asn Arg Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 19
ggattcacct tcagtggcca cggc 24

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 20
Gly Phe Thr Phe Ser Gly His Gly
1 5

12

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 21

atattgtatg atggaagtag tgaa

24

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 22

Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Ser Glu

1

5

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 23
gcgcgaggga gtattttaaa tcgcccgttt gattac 36

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 24
Ala Arg Gly Ser Ile Leu Asn Arg Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 25
<211> 339
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 25

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtatttta ttcagttcca acaataagat ctacttagct 120
 tggttccagc agaaaccagg acagcctcct aaactactca tttactggac atctaccgg 180
 gaatccgggg tccttgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcact 240
 atcagtagtc tgcaggctga agatgtggca gtttactact gtcaacaata ttatactctt 300
 ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 26

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

15

100 105 110
Lys

<210> 27
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 27
cagagtattt ttttcagttc caacaataag atctac 36

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 28
Gln Ser Ile Leu Phe Ser Ser Asn Asn Lys Ile Tyr
1 5 10

16

<210> 29
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 29
 tggacatct

9

<210> 30
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 30
 Trp Thr Ser
 1

<210> 31
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

17

<220>

<223> Synthetic

<400> 31

caacaatatt atactcttcc attcact

27

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 32

Gln Gln Tyr Tyr Thr Leu Pro Phe Thr

1

5

<210> 33

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 33

cagatacagc tggaggagtc tgggggaggc gtggccagc ctggaaggc cctgagactc 60

tcctgtgtag cctctgggtt caccctcagt ggacatggca tgcactgggt ccgccaggt 120
 ccaggcaagg ggctggagt ggtggcattt atatcatttg atggagggtca tcaagactac 180
 acagacgccg cggagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgttgat 240
 ctggaaatgg tcagcctgag acctgcagac acggctatat attattgtgt gaaagggagc 300
 gactcgtcgc gaggttttgg ctactggggc cggggaatcc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 34

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 34

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

Ile Leu val Thr val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 35
gggttcaccc tcagtggaca tggc 24

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 36
Gly Phe Thr Leu Ser Gly His Gly
1 5

<210> 37

20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 37

atatcatttg atggaggtca tcaa

24

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 38

Ile Ser Phe Asp Gly Gly His Gln

1

5

<210> 39

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 39

gtgaaaggga gcgactcgtc gcgaggtttt ggctac 36

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 40

Val Lys Gly Ser Asp Ser Ser Arg Gly Phe Gly Tyr
1 5 10

<210> 41

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 41

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagggtttta ttcagttccg acaataagaa ctacttggt 120

tgggtaccagc tgaaaccagg tcagcctcct cacctactta tttactgggc atctattcgt 180
 gattccgggg tccctgaccg atttagtggc agcgggtctg ggacagattt cacgctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga ggatgtggca gtttactcct gtcataata ttatagtgt 300
 ccactcacct tcggcggagg gaccaaggtg gagatcaaa 339

<210> 42

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 42

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

<210> 43
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 43
cagagtgttt tattcagttc cgacaataag aactac 36

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 44
Gln Ser Val Leu Phe Ser Ser Asp Asn Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 9

24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 45

tgggcatct

9

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 46

Trp Ala Ser

1

<210> 47

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 47
catcaatatt atagtgtctcc actcacc 27

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 48
His Gln Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Thr
1 5

<210> 49
<211> 372
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 49
gagggtgcagc tgggtggagtc tggggggggac ttggtacaac ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggagt caccttcagg acatatgaaa tgaattgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gactggagtg gatttcacac attagtagca gtggtgatat tatatactat 180

acaaagtctg tgaagggccg attcaccatc tccagagata acgccaagaa ctactgttt 240
 ctgcaaatga caagtctgag agccgaggac acggctgtat attactgtgc gagagaaagg 300
 tacagtcaat acggttatta ttacttcgga atggatgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 50

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 50

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

27

115 120

<210> 51
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 51
ggagtcacct tcaggacata tgaa 24

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 52
Gly Val Thr Phe Arg Thr Tyr Glu
1 5

<210> 53
<211> 24

28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 53

attagtagca gtggtgatat tata

24

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 54

Ile Ser Ser Ser Gly Asp Ile Ile

1

5

<210> 55

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 55
gcgagagaaa ggtacagtca atacggttat tattacttcg gaatggatgt c 51

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 56
Ala Arg Glu Arg Tyr Ser Gln Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Phe Gly Met Asp
1 5 10 15
Val

<210> 57
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 57
gacatccaga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctataggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtca gaatactgat aagtggatgg cctggtatca gcagaaagca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctataag gcgtctatatt tagaaagtgg ggtcccttca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caacttatta ctgccaagaa tataatactt attttcgggc gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaccag a 321

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 58

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

31

<210> 59
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 59
cagaatactg ataagtgg 18

<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 60
Gln Asn Thr Asp Lys Trp
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> DNA

32

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 61

aaggcgtct

9

<210> 62

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 62

Lys Ala Ser

1

<210> 63

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 63

caagaatata atacttattt tcgggcg

27

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 64

Gln Glu Tyr Asn Thr Tyr Phe Arg Ala

1

5

<210> 65

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 65

gacgtgcagc tggaggagtc tgggggagac tttgtacaac ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggagt cgccttcaat gattatgaaa tgaattggat ccgccaggct 120

ccagggaaga gactggagtg gatttcacac attgatagta gtggtactat tatatattac 180

gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca gcgccaagaa ctactgttt 240

34

ctgcaaatgg acagtctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagaaagg 300
 tacagtcact acggatatta ctacttcggt atggatgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 66

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 66

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

<210> 67
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 67
ggagtcgcct tcaatgatta tgaa 24

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 68
Gly Val Ala Phe Asn Asp Tyr Glu
1 5

<210> 69
<211> 24
<212> DNA

36

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 69

attgatagta gtggtactat tata

24

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 70

Ile Asp Ser Ser Gly Thr Ile Ile

1

5

<210> 71

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

37

<400> 71

gcgagagaaa ggtacagtca ctacggatat tactacttcg gtatggatgt c 51

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 72

Ala Arg Glu Arg Tyr Ser His Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Phe Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 73

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 73

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gaattatgat aactgggttg cctggtatca gcagaaaaca 120

ggtaaagccc ctaacctcct gatctataag gcgtctactt tggaaagtgg ggtcccttca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcatcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caacttatta ctgccaagaa tataatactt attctcggac gttcggccaa 300
 ggcaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 74

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

<210> 75
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 75
cagaatattg ataactgg

18

<210> 76
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 76
Gln Asn Ile Asp Asn Trp
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Synthetic

<400> 77

aaggcgtct

9

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 78

Lys Ala Ser

1

<210> 79

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 79

caagaatata atacttattc tcggacg 27

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 80
Gln Glu Tyr Asn Thr Tyr Ser Arg Thr
1 5

<210> 81
<211> 372
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 81
gagatacaat tgatagagtc tgggggagac atggtacaac ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggaat ctcccttaat agttatgaaa tgaattgggt ccgccagact 120
ccagggatgg ggctggagtg gatttcacac ataagtagta gtggaacttc tatatattat 180
gcaaactctg tgaagggccg attcaccata ttcagagaca gcgccaagaa ctactgttg 240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggctatattt attactgtgc aagagaaaga 300

42

tacgatcact ccgggtatta ctacctcgga atggatgtct ggggcctagg gaccacggtc 360
accgtctcgt ca 372

<210> 82

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 82

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

43

<210> 83

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 83

ggaatctccc ttaatagtta tgaa

24

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 84

Gly Ile Ser Leu Asn Ser Tyr Glu

1

5

<210> 85

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 85

ataagtagta gtggaacttc tata

24

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 86

Ile Ser Ser Ser Gly Thr Ser Ile

1

5

<210> 87

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 87

45

gcaagagaaa gatacgatca ctccgggtat tactacctcg gaatggatgt c 51

<210> 88

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 88

Ala Arg Glu Arg Tyr Asp His Ser Gly Tyr Tyr Tyr Leu Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 89

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 89

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctttaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtca gaatattgat aactggatgg cctggatatca gcagaaagtt 120

gggaaagccc ctaaactctt gatatatagg gcgtctactt tagaaactgg ggtcccttca 180

aggttcggcg gcagtggatt tgggacagaa ttcactctca ccacagcag cctgcagcct 240
 ggtgattttg cgacttacta ctgccaagaa tataatagtt attttcggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 90

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 90

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

<210> 91
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 91
cagaatattg ataactgg

18

<210> 92
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 92
Gln Asn Ile Asp Asn Trp
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

48

<220>

<223> Synthetic

<400> 93

agggcgtct

9

<210> 94

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 94

Arg Ala Ser

1

<210> 95

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 95

caagaatata atagttattt tcggacg

27

<210> 96
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 96
 Gln Glu Tyr Asn Ser Tyr Phe Arg Thr
 1 5

<210> 97
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 97
 gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttacgaca tgcactgggt ccgccaagtt 120
 ataggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attggtactg ttggtgacac atactatgca 180
 ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaattc cttgtacctt 240
 caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agatcggggg 300
 ggtgcgaata tttatagttt ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360

50

accgtctcct ca

372

<210> 98

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 98

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

51

<210> 99
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 99
ggattcacct tcagtagtta cgac

24

<210> 100
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 100
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp
1 5

<210> 101
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 101

attggtactg ttggtgacac a

21

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 102

Ile Gly Thr Val Gly Asp Thr

1 5

<210> 103

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 103

gcaagagatc gggggggtgc gaatatttat agtttctact acggtatgga cgtc

54

<210> 104

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 104

Ala Arg Asp Arg Gly Gly Ala Asn Ile Tyr Ser Phe Tyr Tyr Gly Met

1 5 10 15

Asp Val

<210> 105

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 105

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgtat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtca ggacattagc aattatttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagttc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagatgttg caacttattt ctgtcaaaag tataacagtg ccccatcac tttcgccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa acga 324

<210> 106

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 106

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

<210> 107

55

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 107
 caggacatta gcaattat

18

<210> 108
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 108
 Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 109
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

56

<223> Synthetic

<400> 109

gctgcatcc

9

<210> 110

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 110

Ala Ala Ser

1

<210> 111

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 111

caaaagtata acagtgtcccc attcact

27

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 112

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Phe Thr

1

5

<210> 113

<211> 393

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 113

gagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttaac agttttgtca tgagctgggt ccgtcaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtgggt atggtggtag cacatactac 180
gcagactcca tgaagggccg gttcaccgtc tccagagaca attccaagaa tacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcac 300
aaggatttct atgcttcggg gagttatattt aaccgggact actactacgg tatggacgtc 360
tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc tca 393

<210> 114

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 114

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

59

<210> 115

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 115

ggattcacct ttaacagttt tgtc

24

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 116

Gly Phe Thr Phe Asn Ser Phe Val

1

5

<210> 117

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

60

<220>

<223> Synthetic

<400> 117

attagtgggtt atggtggttag caca

24

<210> 118

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 118

Ile Ser Gly Tyr Gly Gly Ser Thr

1

5

<210> 119

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 119

61

gcgaaagatc acaaggattt ctatgcttcg gggagttatt ttaaccggga ctactactac 60
ggtatggacg tc 72

<210> 120

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 120

Ala Lys Asp His Lys Asp Phe Tyr Ala Ser Gly Ser Tyr Phe Asn Arg
1 5 10 15
Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20

<210> 121

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 121

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgttgaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gattattagt agctggttg cctggtatca gcagaaacca 120

```

gggaaagccc ctaaggtcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaatatcaa acga                                     324

```

<210> 122

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 122

```

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

```

63

<210> 123
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 123
 cagagtatta gtagctgg

18

<210> 124
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 124
 Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 125
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 125

aaggcgtct

9

<210> 126

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 126

Lys Ala Ser

1

<210> 127

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 127

caacagtata atagttattc tcggacg 27

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 128
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Arg Thr
1 5

<210> 129
<211> 372
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 129
gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgacactc 60
tcctgcgcag cctctagatt caccttcagt aactacgaca tgcactgggt ccgccaagcc 120
acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attggtactg tcggtgacac atactatgca 180
ggctctgtga agggccgatt caccatctcc agagacgatg ccaagaattc cctttatctc 240
caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtttatt actgtgcaag agatcggggg 300

gggtcgggga cttatagttt ctattacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 130

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 130

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

67

<210> 131

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 131

agattcacct tcagtaacta cgac

24

<210> 132

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 132

Arg Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Asp

1

5

<210> 133

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

68

<220>

<223> Synthetic

<400> 133

attggtactg tcggtgacac a

21

<210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 134

Ile Gly Thr Val Gly Asp Thr

1

5

<210> 135

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 135

gcaagagatc ggggggggtgc ggggacttat agtttctatt acggtatgga cgtc 54

<210> 136
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 136
Ala Arg Asp Arg Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Ser Phe Tyr Tyr Gly Met
1 5 10 15
Asp Val

<210> 137
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 137
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtca ggacattagc aattatttag cctgggatca gcagaaacca 120
gggaaagtgc ctaaactcct gatctatgct gcttcactt tgcaatcagg ggtcccatct 180

cggttcagtg gtagtggatc tgggacagat ttactctca ccgtcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tataaccagtg cccattcac ttcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa acga 324

<210> 138

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 138

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

71

<210> 139
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 139
 caggacatta gcaattat

18

<210> 140
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 140
 Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 141
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

72

<220>

<223> Synthetic

<400> 141

gctgcttcc

9

<210> 142

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 142

Ala Ala Ser

1

<210> 143

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 143

caaaagtata ccagtgtccc attcact

27

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 144

Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Phe Thr

1

5

<210> 145

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 145

caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatgcc tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg gactggagtg ggtggcaatt atatggtttg atggaagtaa tgaagattat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa catggtatat 240
 ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagatctgcc 300
 aactggaact acgaaggggg acccctcttt gactactggg gccagggaac cctgggcacc 360

gtctcctca

369

<210> 146

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 146

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

75

<210> 147

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 147

ggattcacct tcagtagcta tgcc

24

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 148

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 149

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 149

atatggtttg atggaagtaa tgaa 24

<210> 150

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 150

Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu
1 5

<210> 151

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 151

gcgagatctg ccaactggaa ctacgaaggg ggacccctct ttgactac 48

<210> 152
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 152
Ala Arg Ser Ala Asn Trp Asn Tyr Glu Gly Gly Pro Leu Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 153
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 153
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgctt ctgtaggaga ccgagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gaccattagc acctttttaa attggtatca gcagaagcca 120
gggaaaggcc ctgaactcct gatctacact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcgctctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg cgacttacta ctgtcaacag aattacaatg accctcccac cttcggccaa 300
gggacacgac tggagattaa acga 324

<210> 154

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 154

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

<210> 155

<211> 18

<212> DNA

79

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 155

cagaccatta gcaccttt

18

<210> 156

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 156

Gln Thr Ile Ser Thr Phe

1

5

<210> 157

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

80

<400> 157

actgcatcc

9

<210> 158

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 158

Thr Ala Ser

1

<210> 159

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 159

caacagaatt acaatgaccc tcccacc

27

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 160

Gln Gln Asn Tyr Asn Asp Pro Pro Thr

1

5

<210> 161

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 161

```
cagggtgcagc  tgggtggagtc  tggggggaggc  ttggtcaagc  ctggaggggtc  cctgacactc  60
tcctgtgtag  cctctggatt  caccttcact  gactactaca  ttagttggat  ccgccaggct  120
ccggggaagg  gactggagtg  gatttcatac  attggtactg  gtggtgctgc  caaatactac  180
gcagactctg  ttaagggccg  attcaccgtc  tccagggaca  acgccaagaa  ctactgtat  240
ctactaatga  acaacctgag  agccgaggac  acggccgtat  attattgtgc  gagagatctg  300
gggatctttg  acttatgggg  ccagggaacc  ctggtcaccg  tctcctca  348
```

<210> 162

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 162

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1             5             10             15
Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
      20             25             30
Tyr Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
      35             40             45
Ser Tyr Ile Gly Thr Gly Gly Ala Ala Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50             55             60
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65             70             75             80
Leu Leu Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85             90             95
Ala Arg Asp Leu Gly Ile Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
      100            105            110
Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 163

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 163
ggattcacct tcactgacta ctac

24

<210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 164
Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 165
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 165

attggtactg gtggtgctgc caaa 24

<210> 166
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 166
Ile Gly Thr Gly Gly Ala Ala Lys
1 5

<210> 167
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 167
gcgagagatc tggggatctt tgactta 27

<210> 168
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 168

Ala Arg Asp Leu Gly Ile Phe Asp Leu

1 5

<210> 169

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 169

gaaattgtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgta gggccagtca gagtgttagt agtagtttag cctggtacca ccagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catccatggt gtttccacca gggccactgg tatcccagcc 180
aggttcagtg gcactgggtc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacag tatcataact ggcctccgta cacttttggc 300
caggggacca agctggagat caaacga 327

<210> 170

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 170

```

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

```

<210> 171

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 171
cagagtgtta gtagtagt 18

<210> 172
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 172
Gln Ser Val Ser Ser Ser
1 5

<210> 173
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 173
ggtgtttcc 9

<210> 174

<211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 174
 Gly Val Ser
 1

<210> 175
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 175
 caacagtatc ataactggcc tccgtacact

30

<210> 176
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 176

Gln Gln Tyr His Asn Trp Pro Pro Tyr Thr

1 5 10

<210> 177

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 177

```
cagggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttttggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgtcaatg atatcaaccg atggaagtaa gaaaaattat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc accagagaca attcaaagaa cacgctgtat 240
ttggaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attacgggtg gagagttggg 300
tactatgatt cggggagtta ttataactat tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 360
tca 363
```

<210> 178

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 178

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

<210> 179

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 179
ggattcacct tcagtagttt tggc 24

<210> 180
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 180
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
1 5

<210> 181
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 181
atatcaaccg atggaagtaa gaaa 24

<210> 182

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 182

Ile Ser Thr Asp Gly Ser Lys Lys

1

5

<210> 183

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 183

gtgagagttg ggtactatga ttcggggagt tattataact at

42

<210> 184

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 184

Val Arg Val Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Tyr

1 5 10

<210> 185

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 185

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggtga cagagtcacc 60
atcacttgct gggcgagtca gggatattcg agctgggttag cctgggtttca gcagagacca 120
gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtctcatcc 180
aggttcagcg gcagtggctc tgggacagaa ttcactctca gcatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gcttacagtt ttccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acga 324
```

<210> 186

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 186

```

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

```

<210> 187

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 187

cagggtattc gcagctgg

18

<210> 188
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 188
 Gln Gly Ile Arg Ser Trp
 1 5

<210> 189
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 189
 gctgcatcc

9

<210> 190
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 190

Ala Ala Ser

1

<210> 191

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 191

caacaggctt acagttttcc gctcact

27

<210> 192

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 192

Gln Gln Ala Tyr Ser Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 193

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 193

```
gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtgcggc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagg atctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtgataa tacatactat 180
acagactccg tgaagggccg gttcatcatc tccagagaca attccaagag cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaagat acggccgtat attactgtgc gagagggtgg 300
gagttactga actactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctcctca 348
```

<210> 194

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 194

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ile Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Trp Glu Leu Leu Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 195
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 195
ggattcacct ttaggatcta tgcc

<210> 196

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 196

Gly Phe Thr Phe Arg Ile Tyr Ala

1

5

<210> 197

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 197

attagtggtgta gtggtgataa taca

24

<210> 198

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

100

<220>

<223> Synthetic

<400> 198

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr

1

5

<210> 199

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 199

gcgagagggt gggagttact gaactac

27

<210> 200

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 200

Ala Arg Gly Trp Glu Leu Leu Asn Tyr

101

1

5

<210> 201

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 201

gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ttgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgctc gggcgagtcg ggacattagc aatcatttag cctgggtttca gcagaaacca 120
 gggaaagtcc ctaagtccct gatctatgct gcgtccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aaattcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaacttca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgccaacag tatgggtcttt atcctccacac ttctggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa acga 324

<210> 202

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 202

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Phe Val Gly

102

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

<210> 203
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 203
caggacatta gcaatcat 18

<210> 204
<211> 6
<212> PRT

103

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 204

Gln Asp Ile Ser Asn His

1 5

<210> 205

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 205

gctgctcc

9

<210> 206

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

104

<400> 206
Ala Ala Ser
1

<210> 207
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 207
caacagtatg gtctttatcc tcccact 27

<210> 208
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 208
Gln Gln Tyr Gly Leu Tyr Pro Pro Thr
1 5

105

<210> 209

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 209

```

gagggtgcagc tggtaggagtc tgggggagggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacttttagc atctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggtg gtggtggtag aacatactac 180
gcagactccg ttaagggccg gttcaccatc tctagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agtcgaggac acggccggtt attactgtgc gagagggtgg 300
gagcttctta acttctgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

```

<210> 210

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 210

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
          20           25           30

```


106

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Trp Glu Leu Leu Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr val Ser Ser
115

<210> 211
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 211
ggattcactt ttagcatcta tgcc 24

<210> 212
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 212
Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Ala
1 5

<210> 213
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 213
attagtggtgta gtggtggtag aaca

24

<210> 214
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 214

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr
1 5

<210> 215
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 215
gcgagagggt gggagcttct taacttc 27

<210> 216
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 216
Ala Arg Gly Trp Glu Leu Leu Asn Phe
1 5

<210> 217

109

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 217

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc gggcattagt aataatttag cctggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgaaaagtgg ggtcccatca 180
aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgccaccag tataatagtt atcctccac tttcggcct 300
gggaccaaag tggatatcaa acga                                     324

```

<210> 218

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 218

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Asn
          20           25           30
Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

```

110

35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Lys Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
 100 105

<210> 219

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 219

cagggcatta gtaataat

18

<210> 220

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

111

<400> 220

Gln Gly Ile Ser Asn Asn

1

5

<210> 221

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 221

gctgcatcc

9

<210> 222

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 222

Ala Ala Ser

1

<210> 223
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 223
caccagtata atagttatcc tcccact

27

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 224
His Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 225
<211> 348
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 225

```

gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttgggtgcagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag tctctggatt caccttttagc atctatgccg tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtgataa gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtat ttactgtgc gagagggtgg 300
gagctcctaa actactgggg ccaggggaacc ctgggtcaccg tctcctca          348

```

<210> 226

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 226

```

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

```


<220>
<223> synthetic

115

<400> 228

Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Ala

1

5

<210> 229

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 229

attagtggta gtggtgataa gaca

24

<210> 230

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 230

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Lys Thr

1

5

116

<210> 231

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 231

gcgagagggt gggagctcct aaactac

27

<210> 232

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 232

Ala Arg Gly Trp Glu Leu Leu Asn Tyr

1

5

<210> 233

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

117

<220>

<223> Synthetic

<400> 233

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtct ggacattagt aatttttttag cctggtttca gcagaaacca 120
 gggacagccc ctaagtcctt gatctattct gcatccagtt tgcggactgg ggtcccatca 180
 aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgccagcag tatagttctt accctcccac ttcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa acga 324

<210> 234

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 234

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

119

<210> 237

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 237

tctgcatcc

9

<210> 238

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 238

Ser Ala Ser

1

<210> 239

<211> 27

<212> DNA

120

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 239

cagcagtata gttcttaccc tcccact

27

<210> 240

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 240

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Pro Thr

1

5

<210> 241

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

121

<400> 241

gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ccgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgtag cctctggatt caactttaga atctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggccggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtgataa cacatactac 180
 gcagcctccg tgaagggccg gttcaccgtc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga ccagcctgag agccgaggac acggccgtat tttactgtgc gagaggggtgg 300
 gagctcctaa actattgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 242

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 242

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

122

Ala Arg Gly Trp Glu Leu Leu Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 243
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 243
ggattcaact ttagaatcta tgcc 24

<210> 244
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 244
Gly Phe Asn Phe Arg Ile Tyr Ala
1 5

<210> 245
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 245
attagtggtgta gtggtgataa caca

24

<210> 246
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 246
Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr
1 5

<210> 247
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 247

gcgagagggt gggagctcct aaactat

27

<210> 248

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 248

Ala Arg Gly Trp Glu Leu Leu Asn Tyr

1

5

<210> 249

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 249

125

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtct ggacattggc aatTTTTtag cctggtttca gcagaaacca 120
 gggacagccc ctaagtcctt gatctattct gcatccagtc tgcagactgg ggtcccatca 180
 aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttctacttca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataattctt atcctccac ttcggccct 300
 gggaccaaa tgatatcaa acga 324

<210> 250

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 250

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

126

100

105

<210> 251
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 251
ctggacattg gcaatttt 18

<210> 252
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 252
Leu Asp Ile Gly Asn Phe
1 5

<210> 253
<211> 9

127

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 253

tctgcatcc

9

<210> 254

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 254

Ser Ala Ser

1

<210> 255

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 255
caacagtata attcttatcc tcccact 27

<210> 256
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 256
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 257
<211> 348
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 257
gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt tacctttaaa atctatgcca tgagttgggt ccgccagggc 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcggct attagtggaa atggtgacaa aacatactat 180

129

acagactccg tgcagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactcttt 240
 ctccaaatga acagcctgag agccgaggac acggccatat attactgtgc gcgaggggtgg 300
 gaactgctaa attactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 258

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 258

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Ile Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Asn Gly Asp Lys Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Trp Glu Leu Leu Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 259
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 259
ggatttacct ttaaaatcta tgcc 24

<210> 260
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 260
Gly Phe Thr Phe Lys Ile Tyr Ala
1 5

<210> 261
<211> 24
<212> DNA

131

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 261

attagtggaa atggtgacaa aaca

24

<210> 262

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 262

Ile Ser Gly Asn Gly Asp Lys Thr

1

5

<210> 263

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

132

<400> 263

gcgcgagggt gggaactgct aaattac

27

<210> 264

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 264

Ala Arg Gly Trp Glu Leu Leu Asn Tyr

1

5

<210> 265

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 265

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctataggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca ggacattagc aattctttag cctggtttca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccactctcag cctgcagcct 240

133

gaagattttg caacttatta ctgccaacaa tatattcctt tccctccac tttcgccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa acga 324

<210> 266

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 266

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

<210> 267

134

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 267
 caggacatta gcaattct

18

<210> 268
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 268
 Gln Asp Ile Ser Asn Ser
 1 5

<210> 269
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

135

<223> Synthetic

<400> 269

gctgcatcc

9

<210> 270

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 270

Ala Ala Ser

1

<210> 271

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 271

caacaatata ttcctttccc tcccact

27

136

<210> 272

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 272

Gln Gln Tyr Ile Pro Phe Pro Pro Thr

1

5

<210> 273

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 273

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtacagc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgtag cttctggatt cacctttacc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaggg ggctgcagtg ggtctcagct attggtggta gtggtgatag tatatattac 180
gcagactccg tcaagggccg gttcaccatc tccagagaca actccaagaa tacgctgtat 240
ctgcaaatgg acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc aagaggatgg 300
gagttactca attactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

137

<210> 274

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 274

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Gln Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Gly Gly Ser Gly Asp Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Trp Glu Leu Leu Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 275

<211> 24

138

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 275
ggattcacct ttaccagcta tgcc 24

<210> 276
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 276
Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr Ala
1 5

<210> 277
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 277
attggtggta gtggtgatag tata 24

<210> 278
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 278
Ile Gly Gly Ser Gly Asp Ser Ile
1 5

<210> 279
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 279
gcaagaggat gggagttact caattac 27

<210> 280

140

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 280

Ala Arg Gly Trp Glu Leu Leu Asn Tyr

1

5

<210> 281

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 281

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca ggacattggc aatTTTTtag cctggTTtca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgaaaagtgg ggtcccatca 180
aagatcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatattt accctccac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa acga 324

<210> 282

141

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 282

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Phe

20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Lys Ser Gly Val Pro Ser Lys Ile Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg

100 105

<210> 283

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

142

<220>

<223> Synthetic

<400> 283

caggacattg gcaatttt

18

<210> 284

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 284

Gln Asp Ile Gly Asn Phe

1 5

<210> 285

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 285

gctgcatcc

9

143

<210> 286

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 286

Ala Ala Ser

1

<210> 287

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 287

caacagtata atatttaccc tcccact

27

<210> 288

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

144

<220>

<223> Synthetic

<400> 288

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Pro Thr

1

5

<210> 289

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 289

caggtagagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgagac cctctcactc 60
acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttgga ctggatcagg 120
cagtcccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggat 180
catgattatg ctttttctgt gaaaagtcga atacttatca atccagacac atccaagaac 240
ctgttctccc tgcaagtga ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300
agagataggc gatcctactt tgactactgg ggccaggga ccctgggtcac cgtctctca 360

<210> 290

<211> 120

<212> PRT

145

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 290

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

<210> 291

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

146

<220>

<223> Synthetic

<400> 291

ggggacagtg tctctagcaa cagtgtgct 30

<210> 292

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 292

Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala
1 5 10

<210> 293

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 293

acatactaca ggtccaagtg gtatcat 27

<210> 294
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 294
Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr His
1 5

<210> 295
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 295
gcaagagata ggcgaccta ctttgactac

30

<210> 296
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 296

Ala Arg Asp Arg Arg Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 297

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 297

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtcg gagtgttagc agttccttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcggtggggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtaacaact ggcctccac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa acga 324

<210> 298

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

149

<220>

<223> Synthetic

<400> 298

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

<210> 299

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

150

<400> 299
cggagtggtta gcagttcc 18

<210> 300
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 300
Arg Ser Val Ser Ser Ser
1 5

<210> 301
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 301
gatgcatcc 9

<210> 302
<211> 3

151

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 302

Asp Ala Ser

1

<210> 303

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 303

cagcagcgta acaactggcc tcccact

27

<210> 304

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

152

<400> 304

Gln Gln Arg Asn Asn Trp Pro Pro Thr

1

5

<210> 305

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 305

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtacag cctctggatt cgtttttgaa gattatgcc a tgcactgggt ccggcaagct 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagtgtga atagtggtag gataggctat 180
acggactctg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca acgccaagaa ctccttgtat 240
ctgcaaatga acagtctgac aactgaggac acggccttgt attattgtgc aaaagataaa 300
tcgccctcta agtggaactt actaggtatg gacgtctggg gcccaaggac cacggtcacc 360
gtctctca 369

<210> 306

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

153

<223> Synthetic

<400> 306

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

<210> 307

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 307
ggattcgttt ttgaagatta tgcc 24

<210> 308
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 308
Gly Phe Val Phe Glu Asp Tyr Ala
1 5

<210> 309
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 309
attagttgga atagtggtag gata 24

<210> 310
<211> 8

155

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 310

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile

1

5

<210> 311

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 311

gcaaaagata aatcgccctc taagtggaac ttactaggta tggacgtc

48

<210> 312

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

156

<400> 312

Ala Lys Asp Lys Ser Pro Ser Lys Trp Asn Leu Leu Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 313

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 313

gccatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggacattaga aatgatttag gctggtttca gcagaaacca 120
gggagagccc ctaacctcct aatctttggt gcatccagtt taaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcgg cctgcagcct 240
gaagatTTTT caacttatta ctgtctacaa gattacactt acccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa acga 324

<210> 314

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

157

<400> 314

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

<210> 315

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 315

caggacatta gaaatgat

18

158

<210> 316
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 316
Gln Asp Ile Arg Asn Asp
1 5

<210> 317
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 317
ggtgcatcc

9

<210> 318
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

159

<220>

<223> Synthetic

<400> 318

Gly Ala Ser

1

<210> 319

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 319

ctacaagatt acacttacc attcact

27

<210> 320

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 320

Leu Gln Asp Tyr Thr Tyr Pro Phe Thr

160

1 5

<210> 321

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 321

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtacagaagc ccggggcgctc agtgaaagtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactactata ttcattgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta aaactggtgg cacaaactat 180
gcaccgaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggact cgtccatcat cacagcctac 240
atggacttga ccagactgac ctctgacgac acggccgtgt tttactgtgc gagacgggga 300
tataatagta ggtggtccgt ttttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 322

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 322

161

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

<210> 323
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 323
ggatacacct tcaccgacta ctat

24

162

<210> 324
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 324
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 325
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 325
atcaacccta aaactggtgg caca 24

<210> 326
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

163

<220>

<223> Synthetic

<400> 326

Ile Asn Pro Lys Thr Gly Gly Thr

1

5

<210> 327

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 327

gcgagacggg gatataatag taggtggtcc gtttttgact ac

42

<210> 328

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 328

Ala Arg Arg Gly Tyr Asn Ser Arg Trp Ser Val Phe Asp Tyr

164

1 5 10

<210> 329
<211> 327
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 329
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgta gggccagtca gagtgtttac agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
cgtggcctgg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagcatgggt gctcaccggt cactttcggc 300
ggagggacca aggtggagat caaacga 327

<210> 330
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 330
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

165

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

<210> 331

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 331

cagagtgttt acagcaacta c

21

<210> 332

<211> 7

<212> PRT

166

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 332

Gln Ser Val Tyr Ser Asn Tyr

1

5

<210> 333

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 333

ggtgcatcc

9

<210> 334

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

167

<400> 334

Gly Ala Ser

1

<210> 335

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 335

cagcagcatg gtggctcacc ggtcact

27

<210> 336

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 336

Gln Gln His Gly Gly Ser Pro Val Thr

1

5

168

<210> 337

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 337

```
cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgaag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaacg ggctggagtg gatcgagtt atatcatctg atggaaataa taaatattat 180
atagaatccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcaattga acagcctgag aactgaggac acggctgtgt attactgtgc gacttacaac 300
tggaacgacg acggggacgg ggtttttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca
```

366

<210> 338

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 338

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
```

169

20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ala Val Ile Ser Ser Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ile Glu Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Tyr Asn Trp Asn Asp Asp Gly Asp Gly Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 339
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 339
ggattcacct tcagtagcta tggc 24

<210> 340
<211> 8
<212> PRT

170

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 340

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 341

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 341

atatcatctg atggaataa taaa 24

<210> 342

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

171

<400> 342
Ile Ser Ser Asp Gly Asn Asn Lys
1 5

<210> 343
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 343
gcgacttaca actggaacga cgacggggac ggggtttttg actac 45

<210> 344
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 344
Ala Thr Tyr Asn Trp Asn Asp Asp Gly Asp Gly Val Phe Asp Tyr
1 5 10 15

172

<210> 345

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 345

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcactttgc gggcgagtc ggggtattagc aactgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatggc acatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gttaagagtt tcccgtacac ttttgccag 300
gggaccaagc tggagatcaa acga                                     324

```

<210> 346

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 346

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1             5             10             15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
          20             25             30

```

173

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Lys Ser Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 347
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 347
cagggtatta gcaactgg 18

<210> 348
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

174

<223> Synthetic

<400> 348

Gln Gly Ile Ser Asn Trp

1 5

<210> 349

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 349

ggtacatcc

9

<210> 350

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 350

Gly Thr Ser

1

175

<210> 351
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 351
caacaggtta agagtttccc gtacact 27

<210> 352
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 352
Gln Gln Val Lys Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 353
<211> 354
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 353

```
gaggtgcagc tggaggagtc ggggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agatatggca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacataccac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
ctgcaaatga atagcctgag agccgcggac acggccatat atttctgtgc gtcttacaat 300
tggaacgacg gggaggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca      354
```

<210> 354

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 354

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
          20           25           30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr His Ala Asp Ser Val
```

177

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Tyr Asn Trp Asn Asp Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser
115

<210> 355
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 355
ggattcacct ttagcagata tggc 24

<210> 356
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 356
Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Gly
1 5

<210> 357
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 357
attagtggta gtggtggtag caca 24

<210> 358
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 358
Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

179

<210> 359
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 359
gcgtcttaca attggaacga cggggtggac gtc 33

<210> 360
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 360
Ala Ser Tyr Asn Trp Asn Asp Gly Val Asp Val
1 5 10

<210> 361
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

180

<220>

<223> Synthetic

<400> 361

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctataggaga cagggtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc ggggtattagc aactgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg agtctcatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcatcag ccttcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtaac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa acga 324

<210> 362

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 362

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

181

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ile Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 363

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 363

cagggtatta gcaactgg

18

<210> 364

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 364

Gln Gly Ile Ser Asn Trp

182

1 5

<210> 365

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 365

ggtgcatcc

9

<210> 366

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 366

Gly Ala Ser

1

<210> 367

<211> 27

183

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 367
caacaggcta acagtttccc gtacact 27

<210> 368
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 368
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 369
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 369

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

185

210

<210> 370

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 370

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Met Val Arg Gly Val Ile Asp Val Phe Asp Ile Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Val Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

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

186

130	135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
145	150	155
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		160
	165	170
		175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
	180	185
		190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
	195	200
		205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
	210	215
		220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
225	230	235
		240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
	245	250
		255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
	260	265
		270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
	275	280
		285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
	290	295
		300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
		320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
	325	330
		335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
	340	345
		350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
	355	360
		365

187

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 371

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 371

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

188

```

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

```

<210> 372

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 372

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

190

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

191

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 373

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 373

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

192

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

<210> 374

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 374

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Gly Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

193

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

194

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

<210> 375

<211> 863

195

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 375

```

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

```

196

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

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

Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ser Ile Ala Ser Thr Gly
 645 650 655
 Tyr Thr Ile Ile Ser Gly Lys His Phe Tyr Phe Asn Thr Asp Gly Ile
 660 665 670
 Met Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Pro Asp Gly Phe Glu Tyr Phe Ala
 675 680 685
 Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Arg Tyr
 690 695 700
 Gln Asn Arg Phe Leu Tyr Leu His Asp Asn Ile Tyr Tyr Phe Gly Asn
 705 710 715 720
 Asn Ser Lys Ala Ala Thr Gly Trp Val Thr Ile Asp Gly Asn Arg Tyr
 725 730 735
 Tyr Phe Glu Pro Asn Thr Ala Met Gly Ala Asn Gly Tyr Lys Thr Ile
 740 745 750
 Asp Asn Lys Asn Phe Tyr Phe Arg Asn Gly Leu Pro Gln Ile Gly Val
 755 760 765
 Phe Lys Gly Ser Asn Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp
 770 775 780
 Ala Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Arg Tyr Gln Asn Arg Phe Leu
 785 790 795 800
 His Leu Leu Gly Lys Ile Tyr Tyr Phe Gly Asn Asn Ser Lys Ala Val
 805 810 815
 Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys Val Tyr Tyr Phe Met Pro Asp
 820 825 830
 Thr Ala Met Ala Ala Ala Gly Gly Leu Phe Glu Ile Asp Gly Val Ile
 835 840 845
 Tyr Phe Phe Gly Val Asp Gly Val Lys Ala Pro Gly Ile Tyr Gly
 850 855 860

199

<210> 376

<211> 516

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 376

```

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

```

200

145	150	155	160
Glu Ile Asp Gly Lys His Phe Tyr Phe Ala Glu Asn Gly Glu Met Gln			
	165	170	175
Ile Gly Val Phe Asn Thr Glu Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His His			
	180	185	190
Asn Glu Asp Leu Gly Asn Glu Glu Gly Glu Glu Ile Ser Tyr Ser Gly			
	195	200	205
Ile Leu Asn Phe Asn Asn Lys Ile Tyr Tyr Phe Asp Asp Ser Phe Thr			
	210	215	220
Ala Val Val Gly Trp Lys Asp Leu Glu Asp Gly Ser Lys Tyr Tyr Phe			
225	230	235	240
Asp Glu Asp Thr Ala Glu Ala Tyr Ile Gly Leu Ser Leu Ile Asn Asp			
	245	250	255
Gly Gln Tyr Tyr Phe Asn Asp Asp Gly Ile Met Gln Val Gly Phe Val			
	260	265	270
Thr Ile Asn Asp Lys Val Phe Tyr Phe Ser Asp Ser Gly Ile Ile Glu			
	275	280	285
Ser Gly Val Gln Asn Ile Asp Asp Asn Tyr Phe Tyr Ile Asp Asp Asn			
	290	295	300
Gly Ile Val Gln Ile Gly Val Phe Asp Thr Ser Asp Gly Tyr Lys Tyr			
305	310	315	320
Phe Ala Pro Ala Asn Thr Val Asn Asp Asn Ile Tyr Gly Gln Ala Val			
	325	330	335
Glu Tyr Ser Gly Leu Val Arg Val Gly Glu Asp Val Tyr Tyr Phe Gly			
	340	345	350
Glu Thr Tyr Thr Ile Glu Thr Gly Trp Ile Tyr Asp Met Glu Asn Glu			
	355	360	365
Ser Asp Lys Tyr Tyr Phe Asn Pro Glu Thr Lys Lys Ala Cys Lys Gly			
	370	375	380

201

Ile Asn Leu Ile Asp Asp Ile Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Lys Gly Ile
 385 390 395 400
 Met Arg Thr Gly Leu Ile Ser Phe Glu Asn Asn Asn Tyr Tyr Phe Asn
 405 410 415
 Glu Asn Gly Glu Met Gln Phe Gly Tyr Ile Asn Ile Glu Asp Lys Met
 420 425 430
 Phe Tyr Phe Gly Glu Asp Gly Val Met Gln Ile Gly Val Phe Asn Thr
 435 440 445
 Pro Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His Gln Asn Thr Leu Asp Glu Asn
 450 455 460
 Phe Glu Gly Glu Ser Ile Asn Tyr Thr Gly Trp Leu Asp Leu Asp Glu
 465 470 475 480
 Lys Arg Tyr Tyr Phe Thr Asp Glu Tyr Ile Ala Ala Thr Gly Ser Val
 485 490 495
 Ile Ile Asp Gly Glu Glu Tyr Tyr Phe Asp Pro Asp Thr Ala Gln Leu
 500 505 510
 Val Ile Ser Glu
 515

<210> 377

<211> 8133

<212> DNA

<213> Clostridium difficile

<400> 377

atgtctttaa tatctaaaga agagttaata aaactcgcat atagcattag accaagagaa 60
 aatgagtata aaactatact aactaattta gacgaatata ataagttaac tacaacaat 120
 aatgaaaata aatatttaca attaaaaaaa cttaatgaat caattgatgt ttttatgaat 180

aaatataaaa cttcaagcag aaatagagca ctctctaadc taaaaaaaga tatattaaaa 240
 gaagtaattc ttattaaaaa ttccaataca agccctgtag aaaaaaatat acattttgta 300
 tggataggtg gagaagtcag tgatattgct cttgaatata taaaacaatg ggctgatatt 360
 aatgcagaat ataattattaa actgtgggtat gatagtgaag cattcttagt aaatacacta 420
 aaaaaggcta tagttgaatc ttctaccact gaagcattac agctactaga ggaagagatt 480
 caaaatcctc aatttgataa tatgaaatct tacaacacac ggatggaatt tatatatgat 540
 agacacacac ggtttataaa ttattataaa tctcaaatca ataacctac agtacctaca 600
 atagatgata ttataaagtc tcatctagta tctgaatata atagagatga aactgtatta 660
 gaatcatata gaacaaattc tttagaaaaa ataatatagta atcatgggat agatatcagg 720
 gctaatagtt tgtttacaga acaagagtta ttaaatatct atagtcagga gttgttaaat 780
 cgtggaaatt tagctgcagc atctgacata gtaagattat tagccctaaa aaattttggc 840
 ggagtatatt tagatgttga tatgcttcca ggtattcact ctgatttatt taaaacaata 900
 tctagacctc gctctattgg actagaccgt tgggaaatga taaaattaga ggctattatg 960
 aagtataaaa aatatataaa taattataca tcagaaaact ttgataaact tgatcaacaa 1020
 ttaaaagata attttaaact cattatagaa agtaaaagtg aaaaatctga gatattttct 1080
 aaattagaaa atttaaatgt atctgatctt gaaattaaaa tagctttcgc tttaggcagt 1140
 gttataaatc aagccttgat atcaaaacaa ggttcataat ttactaacct agtaaatagaa 1200
 caagtaaaaa atagatatca atttttaaac caacacctta acccagccat agagtctgat 1260
 aataacttca cagatactac taaaattttt catgattcat tatttaattc agctaccgca 1320
 gaaaactcta tgtttttaac aaaaatagca ccatacttac aagtaggttt tatgccagaa 1380
 gctcgtcca caataagttt aagtgttcca ggagcttatg cgtcagctta ctatgatttc 1440
 ataaatttac aagaaaatac tatagaaaaa actttaaaag catcagattt aatagaattt 1500
 aaattcccag aaaataatct atctcaattg acagaacaag aaataaatag tctatggagc 1560
 ttgatcaag caagtgcaca atatcaattt gagaaatatg taagagatta tactggtgga 1620
 tctctttctg aagacaatgg ggtagacttt aataaaaaata ctgccctcga caaaaactat 1680
 ttattaaata ataaaattcc atcaacaat gtagaagaag ctggaagtaa aaattatggt 1740
 cattatatca tacagttaca aggagatgat ataagttatg aagcaacatg caatttattt 1800
 tctaaaaatc ctaaaaatag tattattata caacgaaata tgaatgaaag tgcaaaaagc 1860
 tactttttta gtgatgatgg agaattctatt ttagaattaa ataaatatag gataacctga 1920

agattaaaaa ataaggaaaa agtaaaagta acctttattg gacatggtaa agatgaattc 1980
 aacacaagcg aatttgctag attaagtgtg gattcacttt ccaatgagat aagttcattt 2040
 ttagatacca taaaattaga tatatcacct aaaaatgtag aagtaaaactt acttggatgt 2100
 aatatgttta gttatgattt taatgttgaa gaaacttatt ctgggaagt gctattaagt 2160
 attatggaca aaattacttc cactttacct gatgtaaata aaaattctat tactatagga 2220
 gcaaatcaat atgaagtaag aattaatagt gaggaagaa aagaacttct ggctcactca 2280
 ggtaaatgga taaataaaga agaagctatt atgagcgatt tatctagtaa agaatacatt 2340
 ttttttgatt ctatagataa taagctaaaa gcaaagtcca agaattattcc aggattagca 2400
 tcaatatcag aagatataaa aacattatta ctgtatgcaa gtgttagtcc tgatacaaaa 2460
 tttattttta ataacttta gcttaattt gaattcttcta ttggtgatta catttattat 2520
 gaaaaattag agcctgttaa aaatataatt cacaattcta tagatgattt aatagatgag 2580
 ttcaatctac ttgaaatgt atctgatgaa ttatatgaat taaaaaaatt aaataatcta 2640
 gatgagaagt atttaatatc ttttgaagat atctcaaaaa ataattcaac ttactctgta 2700
 agatttatta acaaaagtaa tgggtgagtca gtttatgtag aaacagaaaa agaaattttt 2760
 tcaaaatata gcgaacatat taaaaagaa ataagtacta taaagaatag tataattaca 2820
 gatgttaatg gtaattttatt ggataatata cagttagatc atacttctca agttaataca 2880
 ttaaacgcag cattctttat tcaatcatta atagattata gtagcaataa agatgtactg 2940
 aatgatttaa gtacctcagt taaggttcaa ctttatgctc aactatttag tacaggttta 3000
 aatactatat atgactctat ccaattagta aatttaatat caaatgcagt aaatgatact 3060
 ataaatgtac tacctacaat aacagagggg atacctattg tatctactat attagacgga 3120
 ataaacttag gtgcagcaat taaggaatta ctagacgaac atgaccatt actaaaaaaa 3180
 gaattagaag ctaagggtgg tgtttttagca ataaatatgt cattatctat agctgcaact 3240
 gtagcttcaa ttgttggaat aggtgctgaa gtactattt tcttattacc tatagctggg 3300
 atatctgcag gaataccttc attagttaat aatgaattaa tattgcatga taaggcaact 3360
 tcagtggtaa actattttta tcatttgtct gaattctaaa aatatggccc tcttaaaaca 3420
 gaagatgata aaatttttagt tcctattgat gatttagtaa tatcagaaat agattttaat 3480
 aataattcga taaaactagg aacatgtaat atattagcaa tggagggggg atcaggacac 3540
 acagtgactg gtaatataga tcactttttc tcatctccat ctataagttc tcatttcct 3600
 tcattatcaa tttattctgc aatagggtata gaaacagaaa atctagattt ttcaaaaaaa 3660

ataatgatgt tacctaatgc tccttcaaga gtgttttggg gggaaactgg agcagttcca 3720
 ggtttaagat cattggaaaa tgacggaact agattacttg attcaataag agattttatac 3780
 ccaggtaaatt tttactggag attctatgct tttttcgatt atgcaataac tacattaaaa 3840
 ccagtttatg aagacactaa tattaataatt aaactagata aagatactag aaacttcata 3900
 atgccaacta taactactaa cgaaattaga aacaaattat cttattcatt tgatggagca 3960
 ggaggaactt actctttatt attatcttca tatccaatat caacgaatat aaatttatct 4020
 aaagatgatt tatggatatt taatattgat aatgaagtaa gagaaatatt tatagaaaat 4080
 ggtactatta aaaaaggaaa gttaataaaa gatgttttaa gtaaaattga tataaataaa 4140
 aataaactta ttataggcaa tcaacaata gatttttcag gcgatataga taataaagat 4200
 agatatatat tcttgacttg tgagttagat gataaaatta gttaataat agaataaat 4260
 cttgttgcaa aatcttatag tttgttattg tctggggata aaaattattt gatattcaat 4320
 ttatctaata ttattgagaa aatcaatact ttaggcctag atagtaaaaa tatagcgtac 4380
 aattacactg atgaatctaa taataaatat tttggagcta tatctaaaac aagtcaaaaa 4440
 agcataatac attataaaaa agacagtaaa aatatattag aattttataa tgacagtaca 4500
 ttagaattta acagtaaaaga ttttattgct gaagatataa atgtatttat gaaagatgat 4560
 attaatacta taacaggaaa atactatggt gataataata ctgataaaaag tatagatttc 4620
 tctatttctt tagttagtaa aaatcaagta aaagtaaatg gatttatattt aaatgaatcc 4680
 gtatactcat cttaccttga ttttgtagaa aattcagatg gacaccataa tacttctaata 4740
 tttatgaatt tatttttgga caatataagt ttctggaaat tgtttgggtt tgaaaatata 4800
 aattttgtaa tcgataaata ctttaccctt gttggtaaaa ctaatcttgg atatgtagaa 4860
 tttatttggtg acaataataa aaatatagat atatatattt gtgaatggaa aacatcgta 4920
 tctaaaagca ctatatattg cggaaatggt agaatgttg tagtagagcc tatatataat 4980
 cctgatacgg gtgaagatat atctacttca ctagattttt cctatgaacc tctctatgga 5040
 atagatagat atatcaataa agtattgata gcacctgatt tatatacaag ttttaataat 5100
 attaatacca attattattc aaatgagtac taccctgaga ttatagttct taacccaaat 5160
 acattccaca aaaaagtaaa tataaattta gatagttctt cttttgagta taaatggtct 5220
 acagaaggaa gtgactttat tttagttaga tacttagaag aaagtaataa aaaaatatta 5280
 caaaaaataa gaatcaaagg tatcttatct aatactcaat catttaataa aatgagtata 5340
 gattttaaag atattaaaaa actatcatta ggatatataa tgagtaattt taaatcattt 5400

aattctgaaa atgaattaga tagagatcat ttaggattta aaataataga taataaaact 5460
tattactatg atgaagatag taaattagtt aaaggattaa tcaatataaa taattcatta 5520
ttctattttg atcctataga atttaactta gtaactggat ggcaaaactat caatggtaaa 5580
aaatattatt ttgatataaa tactggagca gctttaatta gttataaaat tattaatggt 5640
aaacactttt attttaataa tgatggtgtg atgcagttgg gagtatttaa aggacctgat 5700
ggatttgaat attttgcacc tgccaatact caaaataata acatagaagg tcaggctata 5760
gtttatcaaa gtaaattctt aactttgaat ggcaaaaaat attattttga taatgactca 5820
aaagcagtca ctggatggag aattattaac aatgagaaat attactttta tcctaataat 5880
gctattgctg cagtcggatt gcaagtaatt gacaataata agtattattt caatcctgac 5940
actgctatca tctcaaaagg ttggcagact gttaatggta gtagatacta ctttgatact 6000
gataccgcta ttgcctttta tgggtataaa actattgatg gtaaacactt ttattttgat 6060
agtgattgtg tagtgaat aggtgtgtt agtacctcta atggatttga atattttgca 6120
cctgctaata cttataataa taacatagaa ggtcaggcta tagtttatca aagtaaattc 6180
ttaactttga atggtaaaaa atattacttt gataataact caaaagcagt taccggatgg 6240
caaactattg atagtaaaaa atattacttt aatactaaca ctgctgaagc agctactgga 6300
tggcaaaacta ttgatggtaa aaaatattac ttaatacta acactgctga agcagctact 6360
ggatggcaaa ctattgatgg taaaaatat tactttaata ctaacactgc tatagcttca 6420
actggttata caattattaa tggtaaacaat ttttatttta atactgatgg tattatgcag 6480
ataggagtgt ttaaaggacc taatggattt gaatattttg cacctgctaa tacggatgct 6540
aacaacatag aaggtcaagc tatactttac caaatgaat tcttaacttt gaatggtaaa 6600
aaatattact ttggtagtga ctcaaaagca gttactggat ggagaattat taacaataag 6660
aaatattact ttaatcctaa taatgctatt gctgcaattc atctatgcac tataaataat 6720
gacaagtatt actttagtta tgatggaatt cttcaaaatg gatataattac tattgaaaga 6780
aataatttct attttgatgc taataatgaa tctaaaatgg taacaggagt atttaaagga 6840
cctaattgat ttgagtattt tgcacctgct aatactcaca ataataacat agaaggctcag 6900
gctatagttt accagaacaa attcttaact ttgaatggca aaaaatatta ttttgataat 6960
gactcaaaag cagttactgg atggcaaacc attgatggta aaaaatatta ctttaactct 7020
aacactgctg aagcagctac tggatggcaa actattgatg gtaaaaaata ttactttaat 7080
cttaacactg ctgaagcagc tactggatgg caaactattg atggtaaaaa atattacttt 7140

```

aatactaaca ctttcatagc ctcaactggt tatacaagta ttaatggtaa acatttttat 7200
tttaatactg atggtattat gcagatagga gtgtttaaag gacctaatgg atttgaatac 7260
tttgcacctg ctaatactca taataataac atagaagggtc aagctatact ttacccaaat 7320
aaattcttaa ctttgaatgg taaaaaatat tacttttgta gtgactcaaa agcagttacc 7380
ggattgcgaa ctattgatgg taaaaaatat tactttaata ctaacactgc tgttgcagtt 7440
actggatggc aaactattaa tggtaaaaaa tactacttta atactaacac ttctatagct 7500
tcaactggtt atacaattat tagtggtaaa catttttatt ttaatactga tggattatg 7560
cagataggag tgtttaaagg acctgatgga tttgaatact ttgcacctgc taatacagat 7620
gctaacaata tagaagggtc agctatacgt tatcaaaata gattcctata ttacatgac 7680
aatatatatt attttggtaa taattcaaaa gcagctactg gttgggtaac tattgatggt 7740
aatagatatt acttcgagcc taatacagct atgggtgcga atggttataa aactattgat 7800
aataaaaatt ttacttttag aaatgggtta cctcagatag gagtggttaa agggctctaat 7860
ggatttgaat actttgcacc tgctaatacg gatgctaaca atatagaagg tcaagctata 7920
cgttatcaaa atagattcct acatttactt ggaaaaatat attactttgg taataattca 7980
aaagcagtta ctggatggca aactattaat ggtaaagtat attactttat gcctgatact 8040
gctatggctg cagctggtgg acttttcgag attgatggtg ttatatattt ctttggtggt 8100
gatggagtaa aagcccctgg gatatatggc taa 8133

```

<210> 378

<211> 2710

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 378

```

Met Ser Leu Ile Ser Lys Glu Glu Leu Ile Lys Leu Ala Tyr Ser Ile
  1             5             10             15
Arg Pro Arg Glu Asn Glu Tyr Lys Thr Ile Leu Thr Asn Leu Asp Glu
          20             25             30

```

207

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

208

260	265	270
Leu Leu Ala Leu Lys Asn Phe Gly Gly Val Tyr Leu Asp Val Asp Met		
275	280	285
Leu Pro Gly Ile His Ser Asp Leu Phe Lys Thr Ile Ser Arg Pro Ser		
290	295	300
Ser Ile Gly Leu Asp Arg Trp Glu Met Ile Lys Leu Glu Ala Ile Met		
305	310	315
Lys Tyr Lys Lys Tyr Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Glu Asn Phe Asp Lys		
325	330	335
Leu Asp Gln Gln Leu Lys Asp Asn Phe Lys Leu Ile Ile Glu Ser Lys		
340	345	350
Ser Glu Lys Ser Glu Ile Phe Ser Lys Leu Glu Asn Leu Asn Val Ser		
355	360	365
Asp Leu Glu Ile Lys Ile Ala Phe Ala Leu Gly Ser Val Ile Asn Gln		
370	375	380
Ala Leu Ile Ser Lys Gln Gly Ser Tyr Leu Thr Asn Leu Val Ile Glu		
385	390	395
Gln Val Lys Asn Arg Tyr Gln Phe Leu Asn Gln His Leu Asn Pro Ala		
405	410	415
Ile Glu Ser Asp Asn Asn Phe Thr Asp Thr Thr Lys Ile Phe His Asp		
420	425	430
Ser Leu Phe Asn Ser Ala Thr Ala Glu Asn Ser Met Phe Leu Thr Lys		
435	440	445
Ile Ala Pro Tyr Leu Gln Val Gly Phe Met Pro Glu Ala Arg Ser Thr		
450	455	460
Ile Ser Leu Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Ala Ser Ala Tyr Tyr Asp Phe		
465	470	475
Ile Asn Leu Gln Glu Asn Thr Ile Glu Lys Thr Leu Lys Ala Ser Asp		
485	490	495

209

Leu Ile Glu Phe Lys Phe Pro Glu Asn Asn Leu Ser Gln Leu Thr Glu
 500 505 510
 Gln Glu Ile Asn Ser Leu Trp Ser Phe Asp Gln Ala Ser Ala Lys Tyr
 515 520 525
 Gln Phe Glu Lys Tyr Val Arg Asp Tyr Thr Gly Gly Ser Leu Ser Glu
 530 535 540
 Asp Asn Gly Val Asp Phe Asn Lys Asn Thr Ala Leu Asp Lys Asn Tyr
 545 550 555 560
 Leu Leu Asn Asn Lys Ile Pro Ser Asn Asn Val Glu Glu Ala Gly Ser
 565 570 575
 Lys Asn Tyr Val His Tyr Ile Ile Gln Leu Gln Gly Asp Asp Ile Ser
 580 585 590
 Tyr Glu Ala Thr Cys Asn Leu Phe Ser Lys Asn Pro Lys Asn Ser Ile
 595 600 605
 Ile Ile Gln Arg Asn Met Asn Glu Ser Ala Lys Ser Tyr Phe Leu Ser
 610 615 620
 Asp Asp Gly Glu Ser Ile Leu Glu Leu Asn Lys Tyr Arg Ile Pro Glu
 625 630 635 640
 Arg Leu Lys Asn Lys Glu Lys Val Lys Val Thr Phe Ile Gly His Gly
 645 650 655
 Lys Asp Glu Phe Asn Thr Ser Glu Phe Ala Arg Leu Ser Val Asp Ser
 660 665 670
 Leu Ser Asn Glu Ile Ser Ser Phe Leu Asp Thr Ile Lys Leu Asp Ile
 675 680 685
 Ser Pro Lys Asn Val Glu Val Asn Leu Leu Gly Cys Asn Met Phe Ser
 690 695 700
 Tyr Asp Phe Asn Val Glu Glu Thr Tyr Pro Gly Lys Leu Leu Leu Ser
 705 710 715 720
 Ile Met Asp Lys Ile Thr Ser Thr Leu Pro Asp Val Asn Lys Asn Ser

210

	725		730		735
Ile Thr Ile Gly Ala Asn Gln Tyr Glu Val Arg Ile Asn Ser Glu Gly					
	740		745		750
Arg Lys Glu Leu Leu Ala His Ser Gly Lys Trp Ile Asn Lys Glu Glu					
	755		760		765
Ala Ile Met Ser Asp Leu Ser Ser Lys Glu Tyr Ile Phe Phe Asp Ser					
	770		775		780
Ile Asp Asn Lys Leu Lys Ala Lys Ser Lys Asn Ile Pro Gly Leu Ala					
785		790		795	800
Ser Ile Ser Glu Asp Ile Lys Thr Leu Leu Leu Asp Ala Ser Val Ser					
	805		810		815
Pro Asp Thr Lys Phe Ile Leu Asn Asn Leu Lys Leu Asn Ile Glu Ser					
	820		825		830
Ser Ile Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Glu Lys Leu Glu Pro Val Lys Asn					
	835		840		845
Ile Ile His Asn Ser Ile Asp Asp Leu Ile Asp Glu Phe Asn Leu Leu					
	850		855		860
Glu Asn Val Ser Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Lys Lys Leu Asn Asn Leu					
865		870		875	880
Asp Glu Lys Tyr Leu Ile Ser Phe Glu Asp Ile Ser Lys Asn Asn Ser					
	885		890		895
Thr Tyr Ser Val Arg Phe Ile Asn Lys Ser Asn Gly Glu Ser Val Tyr					
	900		905		910
Val Glu Thr Glu Lys Glu Ile Phe Ser Lys Tyr Ser Glu His Ile Thr					
	915		920		925
Lys Glu Ile Ser Thr Ile Lys Asn Ser Ile Ile Thr Asp Val Asn Gly					
	930		935		940
Asn Leu Leu Asp Asn Ile Gln Leu Asp His Thr Ser Gln Val Asn Thr					
945		950		955	960

211

Leu Asn Ala Ala Phe Phe Ile Gln Ser Leu Ile Asp Tyr Ser Ser Asn
 965 970 975
 Lys Asp Val Leu Asn Asp Leu Ser Thr Ser Val Lys Val Gln Leu Tyr
 980 985 990
 Ala Gln Leu Phe Ser Thr Gly Leu Asn Thr Ile Tyr Asp Ser Ile Gln
 995 1000 1005
 Leu Val Asn Leu Ile Ser Asn Ala Val Asn Asp Thr Ile Asn Val Leu
 1010 1015 1020
 Pro Thr Ile Thr Glu Gly Ile Pro Ile Val Ser Thr Ile Leu Asp Gly
 1025 1030 1035 1040
 Ile Asn Leu Gly Ala Ala Ile Lys Glu Leu Leu Asp Glu His Asp Pro
 1045 1050 1055
 Leu Leu Lys Lys Glu Leu Glu Ala Lys Val Gly Val Leu Ala Ile Asn
 1060 1065 1070
 Met Ser Leu Ser Ile Ala Ala Thr Val Ala Ser Ile Val Gly Ile Gly
 1075 1080 1085
 Ala Glu Val Thr Ile Phe Leu Leu Pro Ile Ala Gly Ile Ser Ala Gly
 1090 1095 1100
 Ile Pro Ser Leu Val Asn Asn Glu Leu Ile Leu His Asp Lys Ala Thr
 1105 1110 1115 1120
 Ser Val Val Asn Tyr Phe Asn His Leu Ser Glu Ser Lys Lys Tyr Gly
 1125 1130 1135
 Pro Leu Lys Thr Glu Asp Asp Lys Ile Leu Val Pro Ile Asp Asp Leu
 1140 1145 1150
 Val Ile Ser Glu Ile Asp Phe Asn Asn Asn Ser Ile Lys Leu Gly Thr
 1155 1160 1165
 Cys Asn Ile Leu Ala Met Glu Gly Gly Ser Gly His Thr Val Thr Gly
 1170 1175 1180
 Asn Ile Asp His Phe Phe Ser Ser Pro Ser Ile Ser Ser His Ile Pro

212

1185	1190	1195	1200
Ser Leu Ser Ile Tyr Ser Ala Ile Gly Ile Glu Thr Glu Asn Leu Asp			
	1205	1210	1215
Phe Ser Lys Lys Ile Met Met Leu Pro Asn Ala Pro Ser Arg Val Phe			
	1220	1225	1230
Trp Trp Glu Thr Gly Ala Val Pro Gly Leu Arg Ser Leu Glu Asn Asp			
	1235	1240	1245
Gly Thr Arg Leu Leu Asp Ser Ile Arg Asp Leu Tyr Pro Gly Lys Phe			
	1250	1255	1260
Tyr Trp Arg Phe Tyr Ala Phe Phe Asp Tyr Ala Ile Thr Thr Leu Lys			
1265	1270	1275	1280
Pro Val Tyr Glu Asp Thr Asn Ile Lys Ile Lys Leu Asp Lys Asp Thr			
	1285	1290	1295
Arg Asn Phe Ile Met Pro Thr Ile Thr Thr Asn Glu Ile Arg Asn Lys			
	1300	1305	1310
Leu Ser Tyr Ser Phe Asp Gly Ala Gly Gly Thr Tyr Ser Leu Leu Leu			
	1315	1320	1325
Ser Ser Tyr Pro Ile Ser Thr Asn Ile Asn Leu Ser Lys Asp Asp Leu			
	1330	1335	1340
Trp Ile Phe Asn Ile Asp Asn Glu Val Arg Glu Ile Ser Ile Glu Asn			
1345	1350	1355	1360
Gly Thr Ile Lys Lys Gly Lys Leu Ile Lys Asp Val Leu Ser Lys Ile			
	1365	1370	1375
Asp Ile Asn Lys Asn Lys Leu Ile Ile Gly Asn Gln Thr Ile Asp Phe			
	1380	1385	1390
Ser Gly Asp Ile Asp Asn Lys Asp Arg Tyr Ile Phe Leu Thr Cys Glu			
	1395	1400	1405
Leu Asp Asp Lys Ile Ser Leu Ile Ile Glu Ile Asn Leu Val Ala Lys			
	1410	1415	1420

213

Ser Tyr Ser Leu Leu Leu Ser Gly Asp Lys Asn Tyr Leu Ile Ser Asn
 1425 1430 1435 1440
 Leu Ser Asn Thr Ile Glu Lys Ile Asn Thr Leu Gly Leu Asp Ser Lys
 1445 1450 1455
 Asn Ile Ala Tyr Asn Tyr Thr Asp Glu Ser Asn Asn Lys Tyr Phe Gly
 1460 1465 1470
 Ala Ile Ser Lys Thr Ser Gln Lys Ser Ile Ile His Tyr Lys Lys Asp
 1475 1480 1485
 Ser Lys Asn Ile Leu Glu Phe Tyr Asn Asp Ser Thr Leu Glu Phe Asn
 1490 1495 1500
 Ser Lys Asp Phe Ile Ala Glu Asp Ile Asn Val Phe Met Lys Asp Asp
 1505 1510 1515 1520
 Ile Asn Thr Ile Thr Gly Lys Tyr Tyr Val Asp Asn Asn Thr Asp Lys
 1525 1530 1535
 Ser Ile Asp Phe Ser Ile Ser Leu Val Ser Lys Asn Gln Val Lys Val
 1540 1545 1550
 Asn Gly Leu Tyr Leu Asn Glu Ser Val Tyr Ser Ser Tyr Leu Asp Phe
 1555 1560 1565
 Val Lys Asn Ser Asp Gly His His Asn Thr Ser Asn Phe Met Asn Leu
 1570 1575 1580
 Phe Leu Asp Asn Ile Ser Phe Trp Lys Leu Phe Gly Phe Glu Asn Ile
 1585 1590 1595 1600
 Asn Phe Val Ile Asp Lys Tyr Phe Thr Leu Val Gly Lys Thr Asn Leu
 1605 1610 1615
 Gly Tyr Val Glu Phe Ile Cys Asp Asn Asn Lys Asn Ile Asp Ile Tyr
 1620 1625 1630
 Phe Gly Glu Trp Lys Thr Ser Ser Ser Lys Ser Thr Ile Phe Ser Gly
 1635 1640 1645
 Asn Gly Arg Asn Val Val Val Glu Pro Ile Tyr Asn Pro Asp Thr Gly

214

1650	1655	1660	
Glu Asp Ile Ser Thr Ser Leu Asp Phe Ser Tyr Glu Pro Leu Tyr Gly			
1665	1670	1675	1680
Ile Asp Arg Tyr Ile Asn Lys Val Leu Ile Ala Pro Asp Leu Tyr Thr			
	1685	1690	1695
Ser Leu Ile Asn Ile Asn Thr Asn Tyr Tyr Ser Asn Glu Tyr Tyr Pro			
	1700	1705	1710
Glu Ile Ile Val Leu Asn Pro Asn Thr Phe His Lys Lys Val Asn Ile			
	1715	1720	1725
Asn Leu Asp Ser Ser Ser Phe Glu Tyr Lys Trp Ser Thr Glu Gly Ser			
	1730	1735	1740
Asp Phe Ile Leu Val Arg Tyr Leu Glu Glu Ser Asn Lys Lys Ile Leu			
1745	1750	1755	1760
Gln Lys Ile Arg Ile Lys Gly Ile Leu Ser Asn Thr Gln Ser Phe Asn			
	1765	1770	1775
Lys Met Ser Ile Asp Phe Lys Asp Ile Lys Lys Leu Ser Leu Gly Tyr			
	1780	1785	1790
Ile Met Ser Asn Phe Lys Ser Phe Asn Ser Glu Asn Glu Leu Asp Arg			
	1795	1800	1805
Asp His Leu Gly Phe Lys Ile Ile Asp Asn Lys Thr Tyr Tyr Tyr Asp			
	1810	1815	1820
Glu Asp Ser Lys Leu Val Lys Gly Leu Ile Asn Ile Asn Asn Ser Leu			
1825	1830	1835	1840
Phe Tyr Phe Asp Pro Ile Glu Phe Asn Leu Val Thr Gly Trp Gln Thr			
	1845	1850	1855
Ile Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asp Ile Asn Thr Gly Ala Ala Leu			
	1860	1865	1870
Thr Ser Tyr Lys Ile Ile Asn Gly Lys His Phe Tyr Phe Asn Asn Asp			
	1875	1880	1885

215

Gly Val Met Gln Leu Gly Val Phe Lys Gly Pro Asp Gly Phe Glu Tyr
 1890 1895 1900
 Phe Ala Pro Ala Asn Thr Gln Asn Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile
 1905 1910 1915 1920
 Val Tyr Gln Ser Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe
 1925 1930 1935
 Asp Asn Asn Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Arg Ile Ile Asn Asn Glu
 1940 1945 1950
 Lys Tyr Tyr Phe Asn Pro Asn Asn Ala Ile Ala Ala Val Gly Leu Gln
 1955 1960 1965
 Val Ile Asp Asn Asn Lys Tyr Tyr Phe Asn Pro Asp Thr Ala Ile Ile
 1970 1975 1980
 Ser Lys Gly Trp Gln Thr Val Asn Gly Ser Arg Tyr Tyr Phe Asp Thr
 1985 1990 1995 2000
 Asp Thr Ala Ile Ala Phe Asn Gly Tyr Lys Thr Ile Asp Gly Lys His
 2005 2010 2015
 Phe Tyr Phe Asp Ser Asp Cys Val Val Lys Ile Gly Val Phe Ser Thr
 2020 2025 2030
 Ser Asn Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Tyr Asn Asn Asn
 2035 2040 2045
 Ile Glu Gly Gln Ala Ile Val Tyr Gln Ser Lys Phe Leu Thr Leu Asn
 2050 2055 2060
 Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asp Asn Asn Ser Lys Ala Val Thr Gly Leu
 2065 2070 2075 2080
 Gln Thr Ile Asp Ser Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ala Glu
 2085 2090 2095
 Ala Ala Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn
 2100 2105 2110
 Thr Asn Thr Ala Glu Ala Ala Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys

216

2115	2120	2125
Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr	Asn Thr Ala Ile Ala Ser Thr Gly Tyr Thr	
2130	2135	2140
Ile Ile Asn Gly Lys His Phe Tyr Phe Asn Thr Asp Gly Ile Met Gln		
2145	2150	2155
Ile Gly Val Phe Lys Gly Pro Asn Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala		
2165	2170	2175
Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Leu Tyr Gln Asn		
2180	2185	2190
Glu Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Gly Ser Asp Ser		
2195	2200	2205
Lys Ala Val Thr Gly Trp Arg Ile Ile Asn Asn Lys Lys Tyr Tyr Phe		
2210	2215	2220
Asn Pro Asn Asn Ala Ile Ala Ala Ile His Leu Cys Thr Ile Asn Asn		
2225	2230	2235
Asp Lys Tyr Tyr Phe Ser Tyr Asp Gly Ile Leu Gln Asn Gly Tyr Ile		
2245	2250	2255
Thr Ile Glu Arg Asn Asn Phe Tyr Phe Asp Ala Asn Asn Glu Ser Lys		
2260	2265	2270
Met Val Thr Gly Val Phe Lys Gly Pro Asn Gly Phe Glu Tyr Phe Ala		
2275	2280	2285
Pro Ala Asn Thr His Asn Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Val Tyr		
2290	2295	2300
Gln Asn Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asp Asn		
2305	2310	2315
Asp Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr		
2325	2330	2335
Tyr Phe Asn Leu Asn Thr Ala Glu Ala Ala Thr Gly Trp Gln Thr Ile		
2340	2345	2350

217

Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Leu Asn Thr Ala Glu Ala Ala Thr
 2355 2360 2365
 Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr
 2370 2375 2380
 Phe Ile Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ser Ile Asn Gly Lys His Phe Tyr
 2385 2390 2395 2400
 Phe Asn Thr Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Pro Asn
 2405 2410 2415
 Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu
 2420 2425 2430
 Gly Gln Ala Ile Leu Tyr Gln Asn Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys
 2435 2440 2445
 Lys Tyr Tyr Phe Gly Ser Asp Ser Lys Ala Val Thr Gly Leu Arg Thr
 2450 2455 2460
 Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ala Val Ala Val
 2465 2470 2475 2480
 Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn
 2485 2490 2495
 Thr Ser Ile Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ile Ile Ser Gly Lys His Phe
 2500 2505 2510
 Tyr Phe Asn Thr Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Pro
 2515 2520 2525
 Asp Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile
 2530 2535 2540
 Glu Gly Gln Ala Ile Arg Tyr Gln Asn Arg Phe Leu Tyr Leu His Asp
 2545 2550 2555 2560
 Asn Ile Tyr Tyr Phe Gly Asn Asn Ser Lys Ala Ala Thr Gly Trp Val
 2565 2570 2575
 Thr Ile Asp Gly Asn Arg Tyr Tyr Phe Glu Pro Asn Thr Ala Met Gly

218

2580	2585	2590
Ala Asn Gly Tyr Lys Thr Ile Asp Asn Lys Asn Phe Tyr Phe Arg Asn		
2595	2600	2605
Gly Leu Pro Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Ser Asn Gly Phe Glu Tyr		
2610	2615	2620
Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile		
2625	2630	2635
Arg Tyr Gln Asn Arg Phe Leu His Leu Leu Gly Lys Ile Tyr Tyr Phe		
2645	2650	2655
Gly Asn Asn Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys		
2660	2665	2670
Val Tyr Tyr Phe Met Pro Asp Thr Ala Met Ala Ala Ala Gly Gly Leu		
2675	2680	2685
Phe Glu Ile Asp Gly Val Ile Tyr Phe Phe Gly Val Asp Gly Val Lys		
2690	2695	2700
Ala Pro Gly Ile Tyr Gly		
2705	2710	

<210> 379

<211> 7101

<212> DNA

<213> Clostridium difficile

<400> 379

```

atgagtttag ttaatagaaa acagttagaa aaaatggcaa atgtaagatt tcgtactcaa 60
gaagatgaat atgttgcaat attggatgct ttagaagaat atcataatat gtcagagaat 120
actgtagtcg aaaaatattt aaaattaaaa gatataaata gttaacaga tatttatata 180
gatacatata aaaaatctgg tagaaataaa gccttaaaaa aatttaagga atatctagtt 240

```

acagaagtat tagagctaaa gaataataat ttaactccag ttgagaaaaa tttacatttt 300
 gtttggattg gaggtcaaat aaatgacact gctattaatt atataaatca atggaaagat 360
 gtaaatagtg attataatgt taatgttttt tatgatagtat atgcattttt gataaacaca 420
 ttgaaaaaaa ctgtagtaga atcagcaata aatgatacac ttgaatcatt tagagaaaac 480
 ttaaatgacc ctagatttga ctataataaa ttcttcagaa aacgtatgga aataatttat 540
 gataaacaga aaaatttcat aaactactat aaagctcaa gagagaaaaa tcctgaactt 600
 ataattgatg atattgtaaa gacatatctt tcaaagtgtt attcaaagga gatagatgaa 660
 cttataacct atattgaaga atccttaaat aaaattacac agaatagttg aaatgatgtt 720
 agaaactttg aagaatttaa aaatggagag tcattcaact tatatgaaca agagttggtg 780
 gaaaggtgga atttagctgc tgcttctgac atattaagaa tatctgcatt aaaagaaatt 840
 ggtggtatgt atttagatgt tgatatgtta ccaggaatac aaccagactt atttgagtct 900
 atagagaaac ctagttcagt aacagtggat ttttgggaaa tgacaaagtt agaagctata 960
 atgaaataca aagaatatat accagaatat acctcagaac attttgacat gttagacgaa 1020
 gaagttcaa gtagttttga atctgttcta gcttctaagt cagataaatc agaataattc 1080
 tcatcacttg gtgatatgga ggcacaccca ctagaagtta aaattgcatt taatagtaag 1140
 ggtattataa atcaagggct aatttctgtg aaagactcat attgtagcaa tttaatagta 1200
 aaacaaatcg agaatagata taaaatattg aataatagtt taaatccagc tattagcgag 1260
 gataatgatt ttaatactac aacgaatacc tttattgata gtataatggc tgaagctaatt 1320
 gcagataatg gtagatttat gatggaacta ggaaagtatt taagagtttg tttcttcca 1380
 gatgttaaaa ctactattaa cttaagtggc cctgaagcat atgcggcagc ttatcaagat 1440
 ttattaatgt ttaaagaagg cagtatgaat atccatttga tagaagctga ttttaagaaac 1500
 tttgaaatct ctaaaactaa tatttctcaa tcaactgaac aagaaatggc tagcttatgg 1560
 tcatttgacg atgcaagagc taaagctcaa tttgaagaat ataaaaggaa ttattttgaa 1620
 ggttctcttg gtgaagatga taatcttgat ttttctcaa atatagtagt tgacaaggag 1680
 tatcttttag aaaaaatata ttcattagca agaagttcag agagaggata tatacactat 1740
 attgttcagt tacaaggaga taaaattagt tatgaagcag catgtaactt atttgcaaag 1800
 actccttatg atagtgtact gtttcagaaa aatatagaag attcagaaat tgcataattat 1860
 tataatcctg gagatggtga aatacaagaa atagacaagt ataaaattcc aagtataatt 1920
 tctgatagac ctaagattaa attaacattt attggtcatg gtaaagatga atttaatact 1980

gatataatttg caggttttga tgtagattca ttatccacag aaatagaagc agcaatagat 2040
ttagctaaag aggatatttc tcctaagtca atagaaataa atttattagg atgtaatatg 2100
tttagctact ctatcaacgt agaggagact tctcctggaa aattattact taaagttaaa 2160
gataaaatat cagaattaat gccatctata agtcaagact ctattatagt aagtgcaaat 2220
caatatgaag ttagaataaa tagtgaagga agaagagaat tattggatca ttctggtgaa 2280
tggaataata aagaagaaag tattataaag gatatttcat caaaagaata tataatcattt 2340
aatcctaag aaataaaaat tacagtaaaa tctaaaaatt tacctgagct atctacatta 2400
ttacaagaaa ttagaataaa ttctaattca agtgatattg aactagaaga aaaagtaatg 2460
ttaacagaat gtgagataaa tgttatttca aatatagata cgcaaattgt tgaggaaagg 2520
attgaagaag ctaagaattt aacttctgac tctattaatt atataaaaga tgaatttaaa 2580
ctaatagaat ctatttctga tgcactatgt gacttaaac aacagaatga attagaagat 2640
tctcatttta tatcttttga ggacatatca gagactgatg agggatttag tataagattt 2700
attaataaag aaactggaga atctatattt gtagaaactg aaaaaacaat attctctgaa 2760
tatgctaadc atataactga agagatttct aagataaaag gtactatatt tgatactgta 2820
aatggtaagt tagtaaaaaa agtaaattta gatactacac acgaagtaaa tactttaaat 2880
gctgcatttt ttatacaatc attaatagaa tataatagtt ctaaagaatc tcttagtaat 2940
ttaagtgtag caatgaaagt ccaagtttac gctcaattat ttagtactgg tttaaatact 3000
attacagatg cagccaaagt tgttgaatta gtatcaactg cattagatga aactatagac 3060
ttacttccta cattatctga aggattacct ataattgcaa ctattataga tgggtgaagt 3120
ttaggtgcag caatcaaaga gctaagtga acgagtgacc cattattaag acaagaaata 3180
gaagctaaga taggtataat ggcagtaaat ttaacaacag ctacaactgc aatcattact 3240
tcatctttgg gtagtagctag tggatttagt atacttttag ttccttttagc aggaatttca 3300
gcaggtatac caagcttagt aaacaatgaa cttgtacttc gagataaggc aacaaagggt 3360
gtagattatt ttaaacatgt ttcattagtt gaaactgaag gagtatttac tttattagat 3420
gataaaataa tgatgccaca agatgattta gtgatatcag aaatagattt taataataat 3480
tcaatagttt taggtaaatg tgaatctgg agaattgaag gtggttcagg tcatactgta 3540
actgatgata tagatcactt cttttcagca ccatacaata catatagaga gccacactta 3600
tctatatatg acgtattgga agtacaaaa gaagaacttg atttgtcaaa agatttaatg 3660
gtattaccta atgctccaaa tagagtattt gcttgggaaa caggatggac accaggttta 3720

agaagcttag aaaatgatgg cacaaaactg ttagaccgta taagagataa ctatgaaggt 3780
 gagttttatt ggagatatatt tgcttttata gctgatgctt taataacaac attaaaacca 3840
 agatatgaag atactaatat aagaataaat ttagatagta atactagaag ttttatagtt 3900
 ccaataataa ctacagaata tataagagaa aaattatcat attctttcta tggttcagga 3960
 ggaacttatg cattgtctct ttctcaatat aatatgggta taaatataga attaagtga 4020
 agtgatgttt ggattataga tgttgataat gttgtgagag atgtaactat agaactgat 4080
 aaaattaaaa aaggtgatgtt aatagaaggt attttatcta cactaagtat tgaagagaat 4140
 aaaattatct taaatagcca tgagattaat ttttctggtg aggtaaatgg aagtaatgga 4200
 tttgtttctt taacattttc aatttttagaa ggaataaatg caattataga agtgatttta 4260
 ttatctaaat catataaatt acttatttctt ggcgaattaa aaatattgat gttaaattca 4320
 aatcatattc aacagaaaat agattatata ggattcaata gcgaattaca gaaaaatata 4380
 ccatatagct ttgtagatag tgaaggaaaa gagaatgggt ttattaatgg ttcaacaaaa 4440
 gaaggtttat ttgtatctga attacctgat gtagttctta taagtaaggt ttatatggat 4500
 gatagtaagc cttcatttgg atattatagt aataatttga aagatgtcaa agttataact 4560
 aaagataatg ttaatatatt aacagggttat tatcttaagg atgatataaa aatctctctt 4620
 tctttgactc tacaagatga aaaaactata aagttaaata gtgtgcattt agatgaaagt 4680
 ggagtagctg agattttgaa gttcatgaat agaaaaggta atacaataac ttcagattct 4740
 ttaatgagct ttttagaaag tatgaatata aaaagtattt tcgttaattt cttacaatct 4800
 aatattaagt ttatattaga tgctaatttt ataataagtg gtactacttc tattggccaa 4860
 tttgagttta tttgtgatga aaatgataat atacaaccat atttcattaa gtttaataca 4920
 ctagaaacta attatacttt atatgtagga aatagacaaa atatgatagt ggaaccaa 4980
 tatgatattag atgattctgg agatatatct tcaactgtta tcaatttctc tcaaaagtat 5040
 ctttatggaa tagacagttg tgtaataaaa gttgtaattt caccaaatat ttatacagat 5100
 gaaataaata taacgcctgt atatgaaaca aataatactt atccagaagt tattgtatta 5160
 gatgcaaatt atataaatga aaaaataaat gttaatatca atgatctatc tatacgatat 5220
 gtatggagta atgatggtaa tgattttatt cttatgtcaa ctagtgaaga aaataagggt 5280
 tcacaagtta aaataagatt cggttaatgtt tttaaagata agactttggc aaataagcta 5340
 tcttttaact ttagtgataa acaagatgta cctgtaagtg aaataatctt atcatttaca 5400
 ccttcatatt atgaggatgg attgattggc tatgatttgg gtctagtttc tttatataat 5460

gagaaatfff atattaataa ctttggaatg atggatatctg gattaatata tattaatgat 5520
tcattatatt attttaaacc accagtaaat aatttgataa ctggatttgt gactgtaggc 5580
gatgataaat actacttta tccaattaat ggtggagctg cttcaattgg agagacaata 5640
attgatgaca aaaattatta tttcaacca agtggagtggt tacaacagg tgtatttagt 5700
acagaagatg gatttaataa ttttgcccca gctaatacac ttgatgaaaa ctagaagga 5760
gaagcaattg attttactgg aaaattaatt attgacgaaa atatttatta ttttgatgat 5820
aattatagag gagctgtaga atggaaagaa ttagatgggtg aaatgcacta ttttagccca 5880
gaaacaggta aagcttttaa aggtctaaat caaatagggtg attataaata ctatttcaat 5940
tctgatggag ttatgcaaaa aggatttgtt agtataaatg ataataaaca ctattttgat 6000
gattctgggtg ttatgaaagt aggttacact gaaatagatg gcaagcattt ctactttgct 6060
gaaaacggag aaatgcaaat aggagtattt aatacagaag atggatttaa atattttgct 6120
catcataatg aagatttagg aaatgaagaa ggtgaagaaa tctcatattc tggatatatta 6180
aatttcaata ataaaaatta ctattttgat gattcattta cagctgtagt tggatggaaa 6240
gatttagagg atgggtcaaa gtattatttt gatgaagata cagcagaagc atatataggt 6300
ttgtcattaa taaatgatgg tcaatattat tttaatgatg atggaattat gcaagttgga 6360
ttgtcacta taaatgataa agtcttctac ttctctgact ctggaattat agaacttgga 6420
gtacaaaaca tagatgacaa ttatttctat atagatgata atggatatagt tcaaattgggt 6480
gtatttgata cttcagatgg atataaatat ttgacacctg ctaatactgt aaatgataat 6540
atttacggac aagcagttga atatagtggt ttagttagag ttggtgaaga tgtatattat 6600
tttgagaaaa catatacaat tgagactgga tggatatatg atatggaaaa tgaaagtgat 6660
aaatattatt tcaatccaga aactaaaaaa gcatgcaaag gtattaattt aattgatgat 6720
ataaaatatt attttgatga gaagggcata atgagaacgg gtcttatatc atttgaaaa 6780
aataattatt actttaatga gaatggtgaa atgcaatttg gttatataaa tatagaagat 6840
aagatgttct attttggtga agatgggtgc atgcagattg gagtatttaa tacaccagat 6900
ggatttaaat actttgcaca tcaaaatact ttggatgaga attttgaggg agaatacaata 6960
aactatactg gttggttaga ttttagatgaa aagagatatt attttacaga tgaatatatt 7020
gcagcaactg gttcagttat tattgatgggt gaggagtatt attttgatcc tgatacagct 7080
caattagtga ttagtgaata g 7101

223

<210> 380

<211> 2366

<212> PRT

<213> Clostridium difficile

<400> 380

```

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

```

224

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

225

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

226

Ser Asp Arg Pro Lys Ile Lys Leu Thr Phe Ile Gly His Gly Lys Asp
 645 650 655
 Glu Phe Asn Thr Asp Ile Phe Ala Gly Phe Asp Val Asp Ser Leu Ser
 660 665 670
 Thr Glu Ile Glu Ala Ala Ile Asp Leu Ala Lys Glu Asp Ile Ser Pro
 675 680 685
 Lys Ser Ile Glu Ile Asn Leu Leu Gly Cys Asn Met Phe Ser Tyr Ser
 690 695 700
 Ile Asn Val Glu Glu Thr Tyr Pro Gly Lys Leu Leu Leu Lys Val Lys
 705 710 715 720
 Asp Lys Ile Ser Glu Leu Met Pro Ser Ile Ser Gln Asp Ser Ile Ile
 725 730 735
 Val Ser Ala Asn Gln Tyr Glu Val Arg Ile Asn Ser Glu Gly Arg Arg
 740 745 750
 Glu Leu Leu Asp His Ser Gly Glu Trp Ile Asn Lys Glu Glu Ser Ile
 755 760 765
 Ile Lys Asp Ile Ser Ser Lys Glu Tyr Ile Ser Phe Asn Pro Lys Glu
 770 775 780
 Asn Lys Ile Thr Val Lys Ser Lys Asn Leu Pro Glu Leu Ser Thr Leu
 785 790 795 800
 Leu Gln Glu Ile Arg Asn Asn Ser Asn Ser Ser Asp Ile Glu Leu Glu
 805 810 815
 Glu Lys Val Met Leu Thr Glu Cys Glu Ile Asn Val Ile Ser Asn Ile
 820 825 830
 Asp Thr Gln Ile Val Glu Glu Arg Ile Glu Glu Ala Lys Asn Leu Thr
 835 840 845
 Ser Asp Ser Ile Asn Tyr Ile Lys Asp Glu Phe Lys Leu Ile Glu Ser
 850 855 860
 Ile Ser Asp Ala Leu Cys Asp Leu Lys Gln Gln Asn Glu Leu Glu Asp

227

865	870	875	880
Ser His Phe Ile Ser Phe Glu Asp Ile Ser Glu Thr Asp Glu Gly Phe			
	885	890	895
Ser Ile Arg Phe Ile Asn Lys Glu Thr Gly Glu Ser Ile Phe Val Glu			
	900	905	910
Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ser Glu Tyr Ala Asn His Ile Thr Glu Glu			
	915	920	925
Ile Ser Lys Ile Lys Gly Thr Ile Phe Asp Thr Val Asn Gly Lys Leu			
	930	935	940
Val Lys Lys Val Asn Leu Asp Thr Thr His Glu Val Asn Thr Leu Asn			
945	950	955	960
Ala Ala Phe Phe Ile Gln Ser Leu Ile Glu Tyr Asn Ser Ser Lys Glu			
	965	970	975
Ser Leu Ser Asn Leu Ser Val Ala Met Lys Val Gln Val Tyr Ala Gln			
	980	985	990
Leu Phe Ser Thr Gly Leu Asn Thr Ile Thr Asp Ala Ala Lys Val Val			
	995	1000	1005
Glu Leu Val Ser Thr Ala Leu Asp Glu Thr Ile Asp Leu Leu Pro Thr			
	1010	1015	1020
Leu Ser Glu Gly Leu Pro Ile Ile Ala Thr Ile Ile Asp Gly Val Ser			
1025	1030	1035	1040
Leu Gly Ala Ala Ile Lys Glu Leu Ser Glu Thr Ser Asp Pro Leu Leu			
	1045	1050	1055
Arg Gln Glu Ile Glu Ala Lys Ile Gly Ile Met Ala Val Asn Leu Thr			
	1060	1065	1070
Thr Ala Thr Thr Ala Ile Ile Thr Ser Ser Leu Gly Ile Ala Ser Gly			
	1075	1080	1085
Phe Ser Ile Leu Leu Val Pro Leu Ala Gly Ile Ser Ala Gly Ile Pro			
	1090	1095	1100

228

Ser Leu Val Asn Asn Glu Leu Val Leu Arg Asp Lys Ala Thr Lys Val
 1105 1110 1115 1120
 Val Asp Tyr Phe Lys His Val Ser Leu Val Glu Thr Glu Gly Val Phe
 1125 1130 1135
 Thr Leu Leu Asp Asp Lys Ile Met Met Pro Gln Asp Asp Leu Val Ile
 1140 1145 1150
 Ser Glu Ile Asp Phe Asn Asn Asn Ser Ile Val Leu Gly Lys Cys Glu
 1155 1160 1165
 Ile Trp Arg Met Glu Gly Gly Ser Gly His Thr Val Thr Asp Asp Ile
 1170 1175 1180
 Asp His Phe Phe Ser Ala Pro Ser Ile Thr Tyr Arg Glu Pro His Leu
 1185 1190 1195 1200
 Ser Ile Tyr Asp Val Leu Glu Val Gln Lys Glu Glu Leu Asp Leu Ser
 1205 1210 1215
 Lys Asp Leu Met Val Leu Pro Asn Ala Pro Asn Arg Val Phe Ala Trp
 1220 1225 1230
 Glu Thr Gly Trp Thr Pro Gly Leu Arg Ser Leu Glu Asn Asp Gly Thr
 1235 1240 1245
 Lys Leu Leu Asp Arg Ile Arg Asp Asn Tyr Glu Gly Glu Phe Tyr Trp
 1250 1255 1260
 Arg Tyr Phe Ala Phe Ile Ala Asp Ala Leu Ile Thr Thr Leu Lys Pro
 1265 1270 1275 1280
 Arg Tyr Glu Asp Thr Asn Ile Arg Ile Asn Leu Asp Ser Asn Thr Arg
 1285 1290 1295
 Ser Phe Ile Val Pro Ile Ile Thr Thr Glu Tyr Ile Arg Glu Lys Leu
 1300 1305 1310
 Ser Tyr Ser Phe Tyr Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Leu Ser
 1315 1320 1325
 Gln Tyr Asn Met Gly Ile Asn Ile Glu Leu Ser Glu Ser Asp Val Trp

229

1330	1335	1340	
Ile Ile Asp Val Asp Asn Val Val Arg Asp Val Thr Ile Glu Ser Asp			
1345	1350	1355	1360
Lys Ile Lys Lys Gly Asp Leu Ile Glu Gly Ile Leu Ser Thr Leu Ser			
	1365	1370	1375
Ile Glu Glu Asn Lys Ile Ile Leu Asn Ser His Glu Ile Asn Phe Ser			
	1380	1385	1390
Gly Glu Val Asn Gly Ser Asn Gly Phe Val Ser Leu Thr Phe Ser Ile			
	1395	1400	1405
Leu Glu Gly Ile Asn Ala Ile Ile Glu Val Asp Leu Leu Ser Lys Ser			
	1410	1415	1420
Tyr Lys Leu Leu Ile Ser Gly Glu Leu Lys Ile Leu Met Leu Asn Ser			
1425	1430	1435	1440
Asn His Ile Gln Gln Lys Ile Asp Tyr Ile Gly Phe Asn Ser Glu Leu			
	1445	1450	1455
Gln Lys Asn Ile Pro Tyr Ser Phe Val Asp Ser Glu Gly Lys Glu Asn			
	1460	1465	1470
Gly Phe Ile Asn Gly Ser Thr Lys Glu Gly Leu Phe Val Ser Glu Leu			
	1475	1480	1485
Pro Asp Val Val Leu Ile Ser Lys Val Tyr Met Asp Asp Ser Lys Pro			
	1490	1495	1500
Ser Phe Gly Tyr Tyr Ser Asn Asn Leu Lys Asp Val Lys Val Ile Thr			
1505	1510	1515	1520
Lys Asp Asn Val Asn Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Leu Lys Asp Asp Ile			
	1525	1530	1535
Lys Ile Ser Leu Ser Leu Thr Leu Gln Asp Glu Lys Thr Ile Lys Leu			
	1540	1545	1550
Asn Ser Val His Leu Asp Glu Ser Gly Val Ala Glu Ile Leu Lys Phe			
	1555	1560	1565

230

Met Asn Arg Lys Gly Asn Thr Asn Thr Ser Asp Ser Leu Met Ser Phe
 1570 1575 1580
 Leu Glu Ser Met Asn Ile Lys Ser Ile Phe Val Asn Phe Leu Gln Ser
 1585 1590 1595 1600
 Asn Ile Lys Phe Ile Leu Asp Ala Asn Phe Ile Ile Ser Gly Thr Thr
 1605 1610 1615
 Ser Ile Gly Gln Phe Glu Phe Ile Cys Asp Glu Asn Asp Asn Ile Gln
 1620 1625 1630
 Pro Tyr Phe Ile Lys Phe Asn Thr Leu Glu Thr Asn Tyr Thr Leu Tyr
 1635 1640 1645
 Val Gly Asn Arg Gln Asn Met Ile Val Glu Pro Asn Tyr Asp Leu Asp
 1650 1655 1660
 Asp Ser Gly Asp Ile Ser Ser Thr Val Ile Asn Phe Ser Gln Lys Tyr
 1665 1670 1675 1680
 Leu Tyr Gly Ile Asp Ser Cys Val Asn Lys Val Val Ile Ser Pro Asn
 1685 1690 1695
 Ile Tyr Thr Asp Glu Ile Asn Ile Thr Pro Val Tyr Glu Thr Asn Asn
 1700 1705 1710
 Thr Tyr Pro Glu Val Ile Val Leu Asp Ala Asn Tyr Ile Asn Glu Lys
 1715 1720 1725
 Ile Asn Val Asn Ile Asn Asp Leu Ser Ile Arg Tyr Val Trp Ser Asn
 1730 1735 1740
 Asp Gly Asn Asp Phe Ile Leu Met Ser Thr Ser Glu Glu Asn Lys Val
 1745 1750 1755 1760
 Ser Gln Val Lys Ile Arg Phe Val Asn Val Phe Lys Asp Lys Thr Leu
 1765 1770 1775
 Ala Asn Lys Leu Ser Phe Asn Phe Ser Asp Lys Gln Asp Val Pro Val
 1780 1785 1790
 Ser Glu Ile Ile Leu Ser Phe Thr Pro Ser Tyr Tyr Glu Asp Gly Leu

231

1795	1800	1805	
Ile Gly Tyr Asp Leu Gly	Leu Val Ser Leu Tyr Asn Glu Lys Phe Tyr		
1810	1815	1820	
Ile Asn Asn Phe Gly Met Met Val Ser Gly Leu Ile Tyr Ile Asn Asp			
1825	1830	1835	1840
Ser Leu Tyr Tyr Phe Lys Pro Pro Val Asn Asn Leu Ile Thr Gly Phe			
	1845	1850	1855
Val Thr Val Gly Asp Asp Lys Tyr Tyr Phe Asn Pro Ile Asn Gly Gly			
	1860	1865	1870
Ala Ala Ser Ile Gly Glu Thr Ile Ile Asp Asp Lys Asn Tyr Tyr Phe			
	1875	1880	1885
Asn Gln Ser Gly Val Leu Gln Thr Gly Val Phe Ser Thr Glu Asp Gly			
	1890	1895	1900
Phe Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Leu Asp Glu Asn Leu Glu Gly			
1905	1910	1915	1920
Glu Ala Ile Asp Phe Thr Gly Lys Leu Ile Ile Asp Glu Asn Ile Tyr			
	1925	1930	1935
Tyr Phe Asp Asp Asn Tyr Arg Gly Ala Val Glu Trp Lys Glu Leu Asp			
	1940	1945	1950
Gly Glu Met His Tyr Phe Ser Pro Glu Thr Gly Lys Ala Phe Lys Gly			
	1955	1960	1965
Leu Asn Gln Ile Gly Asp Tyr Lys Tyr Tyr Phe Asn Ser Asp Gly Val			
	1970	1975	1980
Met Gln Lys Gly Phe Val Ser Ile Asn Asp Asn Lys His Tyr Phe Asp			
1985	1990	1995	2000
Asp Ser Gly Val Met Lys Val Gly Tyr Thr Glu Ile Asp Gly Lys His			
	2005	2010	2015
Phe Tyr Phe Ala Glu Asn Gly Glu Met Gln Ile Gly Val Phe Asn Thr			
	2020	2025	2030

232

Glu Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His His Asn Glu Asp Leu Gly Asn
 2035 2040 2045
 Glu Glu Gly Glu Glu Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Leu Asn Phe Asn Asn
 2050 2055 2060
 Lys Ile Tyr Tyr Phe Asp Asp Ser Phe Thr Ala Val Val Gly Trp Lys
 2065 2070 2075 2080
 Asp Leu Glu Asp Gly Ser Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Asp Thr Ala Glu
 2085 2090 2095
 Ala Tyr Ile Gly Leu Ser Leu Ile Asn Asp Gly Gln Tyr Tyr Phe Asn
 2100 2105 2110
 Asp Asp Gly Ile Met Gln Val Gly Phe Val Thr Ile Asn Asp Lys Val
 2115 2120 2125
 Phe Tyr Phe Ser Asp Ser Gly Ile Ile Glu Ser Gly Val Gln Asn Ile
 2130 2135 2140
 Asp Asp Asn Tyr Phe Tyr Ile Asp Asp Asn Gly Ile Val Gln Ile Gly
 2145 2150 2155 2160
 Val Phe Asp Thr Ser Asp Gly Tyr Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr
 2165 2170 2175
 Val Asn Asp Asn Ile Tyr Gly Gln Ala Val Glu Tyr Ser Gly Leu Val
 2180 2185 2190
 Arg Val Gly Glu Asp Val Tyr Tyr Phe Gly Glu Thr Tyr Thr Ile Glu
 2195 2200 2205
 Thr Gly Trp Ile Tyr Asp Met Glu Asn Glu Ser Asp Lys Tyr Tyr Phe
 2210 2215 2220
 Asn Pro Glu Thr Lys Lys Ala Cys Lys Gly Ile Asn Leu Ile Asp Asp
 2225 2230 2235 2240
 Ile Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Lys Gly Ile Met Arg Thr Gly Leu Ile
 2245 2250 2255
 Ser Phe Glu Asn Asn Asn Tyr Tyr Phe Asn Glu Asn Gly Glu Met Gln

233

2260	2265	2270
Phe Gly Tyr Ile Asn Ile Glu Asp Lys Met Phe Tyr Phe Gly Glu Asp		
2275	2280	2285
Gly Val Met Gln Ile Gly Val Phe Asn Thr Pro Asp Gly Phe Lys Tyr		
2290	2295	2300
Phe Ala His Gln Asn Thr Leu Asp Glu Asn Phe Glu Gly Glu Ser Ile		
2305	2310	2315
Asn Tyr Thr Gly Trp Leu Asp Leu Asp Glu Lys Arg Tyr Tyr Phe Thr		
2325	2330	2335
Asp Glu Tyr Ile Ala Ala Thr Gly Ser Val Ile Ile Asp Gly Glu Glu		
2340	2345	2350
Tyr Tyr Phe Asp Pro Asp Thr Ala Gln Leu Val Ile Ser Glu		
2355	2360	2365

<210> 381

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gly

<220>

234

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Phe, Val, or Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Thr, Ala, or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Phe or Leu

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Ser, Arg, or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Gly, Thr, Asp, or Ser

<220>

<221> VARIANT

235

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = His, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Gly, or Glu

<400> 381

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 382

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Ile

<220>

<221> VARIANT

236

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Leu, Ser, or Asp

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Tyr, Phe, or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Asp, or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Gly

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Ser, Gly, Asp, or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

237

<223> Xaa = Ser, His, or Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Glu, Gln, or Ile

<400> 382

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 383

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Ala, or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

238

<223> Xaa = Lys, or Arg

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Gly, or Glu

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Ser, or Arg

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Ile, Asp, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Leu, Ser, or Asp

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Asn, Ser, Gln, or His

239

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Arg, Tyr, or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)...(9)

<223> Xaa = Pro, or Gly

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)...(10)

<223> Xaa = Phe, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)...(11)

<223> Xaa = Asp, Gly, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> (12)...(12)

240

<223> Xaa = Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> (13)...(13)

<223> Xaa = Phe, Leu, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (14)...(14)

<223> Xaa = Gly, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (15)...(15)

<223> Xaa = Met, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (16)...(16)

<223> Xaa = Asp, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (17)...(17)

<223> Xaa = Val, or absent

<400> 383

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 384

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gln

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Ser, or Glu

<220>

242

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Ile, Val, or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Leu, or Asp

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Phe, Lys, or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Ser, or Trp

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Ser, or absent

<220>

243

<221> VARIANT
<222> (8)...(8)
<223> Xaa = Asn, Asp, or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)...(9)
<223> Xaa = Asn, or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)...(10)
<223> Xaa = Lys, or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)...(11)
<223> Xaa = Ile, Asn, or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)...(12)
<223> Xaa = Tyr, or absent

<400> 384

244

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 385

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Trp, Lys, or Arg

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Ala or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Ser

<400> 385

Xaa Xaa Xaa

245

1

<210> 386

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gln or His

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Gln, or Glu

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Tyr, or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Thr, or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Leu, Ala, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Pro, Phe, or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Leu, Phe, or Arg

<220>

<221> VARIANT

247

<222> (9)...(9)

<223> Xaa = Thr, or Ala

<400> 386

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 387

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gly, or Arg

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

248

<223> Xaa = Asn, or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Gly, Ser, Asn, or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, or Asp

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = His, Tyr, or Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

249

<223> Xaa = Asp, Val, Ala, or Tyr

<400> 387

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 388

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Leu, or Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Thr, Gly, Ser, or Trp

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Ser, Thr, Gly, or Phe

250

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Thr, Val, Tyr, Val, Asp, or Gly

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Gly

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Gly, Asp, Ser, or Ala

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Ser, Thr, Asn, or Ala

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Ala, Thr, Glu, Lys, or absent

251

<400> 388

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 389

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Ala

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Lys, or Arg

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Thr, Asp, or Ser

252

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Phe, Arg, His, Ala, or Leu

<220>

<221> VARSPLIC

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Asn, Gly, or Lys

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Trp, Gly, Asp, or Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Asn, Ala, or Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Ser, Asn, Tyr, Gly, or Asp

253

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)...(9)

<223> Xaa = Tyr, Ile, Ala, Thr, Glu, or Leu

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)...(10)

<223> Xaa = Phe, Tyr, Ser, Gly, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)...(11)

<223> Xaa = Asp. Ser, Gly, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (12)...(12)

<223> Xaa = Tyr, Phe, Ser, Pro, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (13)...(13)

<223> Xaa = Tyr, Leu, or absent

254

<220>

<221> VARIANT

<222> (14)...(14)

<223> Xaa = Tyr, Phe, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (15)...(15)

<223> Xaa = Gly, Asn, Asp, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (16)...(16)

<223> Xaa = Met, Arg, Tyr, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (17)...(17)

<223> Xaa = Asp, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (18)...(18)

255

<223> Xaa = Tyr, Val, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (19)...(19)

<223> Xaa = Tyr, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (20)...(20)

<223> Xaa = Tyr, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (21)...(21)

<223> Xaa = Gly, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (22)...(22)

<223> Xaa = Met, or absent

<220>

<221> VARIANT

256

<222> (23)...(23)

<223> Xaa = Asp, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (24)...(24)

<223> Xaa = Val, or absent

<400> 389

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20

<210> 390

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gln

257

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Ser, Asp, or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Ile, or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Thr, Asn, or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Tyr, Trp, Phe, or Ser

<220>

258

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Tyr, or absent

<400> 390

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 391

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gly, Ala, Lys, or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Ala, Thr, or Val

<220>

<221> VARIANT

259

<222> (3)...(3)

<223> xaa = Ser

<400> 391

Xaa Xaa Xaa

1

<210> 392

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> xaa = Gln or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> xaa = Gln, Lys, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

260

<223> Xaa = Tyr, Asn, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Gly, Asn, Thr, Tyr, His, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Asn, Ser, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Ser, Ala, Tyr, Asp, Trp, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Leu, Pro, Ser, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

261

<223> Xaa = Tyr, Phe, Arg, Pro, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)...(9)

<223> Xaa = Thr, Tyr, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)...(10)

<223> Xaa = Thr

<400> 392

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 393

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

262

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gly

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Phe, Asp, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Thr, Asn, Ser, or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Phe, or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Ser, Arg, Lys, Glu, or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Ser, Ile, Asp, or Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)...(7)
<223> Xaa = Phe, Tyr, or Asn

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)...(8)
<223> Xaa = Gly, Ala, Ser, or Tyr

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)...(9)
<223> Xaa = Ala, or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)...(10)
<223> Xaa = Ala or absent

<400> 393
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 394

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Ile, or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Ser, Gly, Tyr, or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Thr, Gly, Tyr, Trp, Pro, or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Asp, Ser, Asn, Arg, Lys, or Asp

265

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Gly, Ser, or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Ser, Asp, Gly, Lys, or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Lys, Arg, Asn, Ser, Trp, or Gly

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Lys, Thr, Ile, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)...(9)

<223> Xaa = His, or absent

266

<400> 394

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 395

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> xaa = Ala, or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Arg, Lys, Thr, or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Val, Gly, Asp, Arg, or Tyr

267

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Gly, Trp, Arg, Lys, or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Glu, Tyr, Arg, Ser, or Trp

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Leu, Tyr, Ser, Pro, or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Leu, Asp, Tyr, Ser, or Asp

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Asn, Ser, Phe, Lys, Arg, Asp, or Gly

268

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)...(9)

<223> Xaa = Tyr, Gly, Phe, Asp, Trp, or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)...(10)

<223> Xaa = Ser, Tyr, Asn, Asp, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)...(11)

<223> Xaa = Tyr, Leu, Val, Gly, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (12)...(12)

<223> Xaa = Tyr, Leu, Phe, Val, or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (13)...(13)

<223> Xaa = Asn, Gly, Asp, Phe, or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (14)...(14)
<223> Xaa = Tyr, Met, Asp, or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (15)...(15)
<223> Xaa = Asp, Tyr, or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (16)...(16)
<223> Xaa = Val, or absent

<400> 395
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 396
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence

270

<220>

<223> synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gln, Leu, or Arg

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Gly, Asp, or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Ile, or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Arg, Ser, Gly, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Ser, or Asn

271

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Trp, His, Asn, Phe, Ser, or Asp

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Tyr, or absent

<400> 396

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 397

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Ala, Ser, Asp, or Gly

272

272

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Ala, or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Ser

<400> 397

Xaa Xaa Xaa

1

<210> 398

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gln, His, or Leu

273

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Gln

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Ala, Tyr, Arg, Asp, His, or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Tyr, Gly, Asn, Ser, Ile, or Lys

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Ser, Leu, Pro, Ile, Asn, Thr, or Gly

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Phe, Tyr, Trp, or Ser

<220>

274

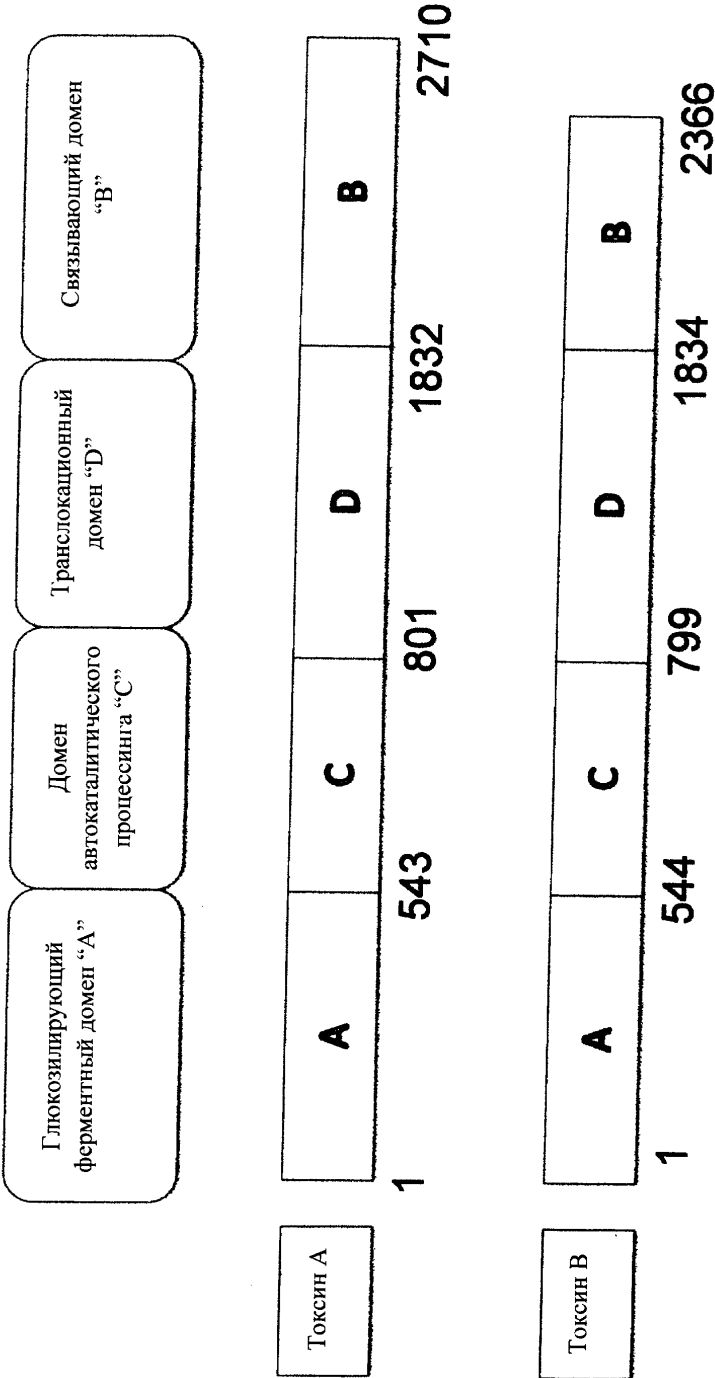
<221> VARIANT
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Pro

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)...(8)
 <223> Xaa = Leu, Pro, Phe, Val, or Tyr

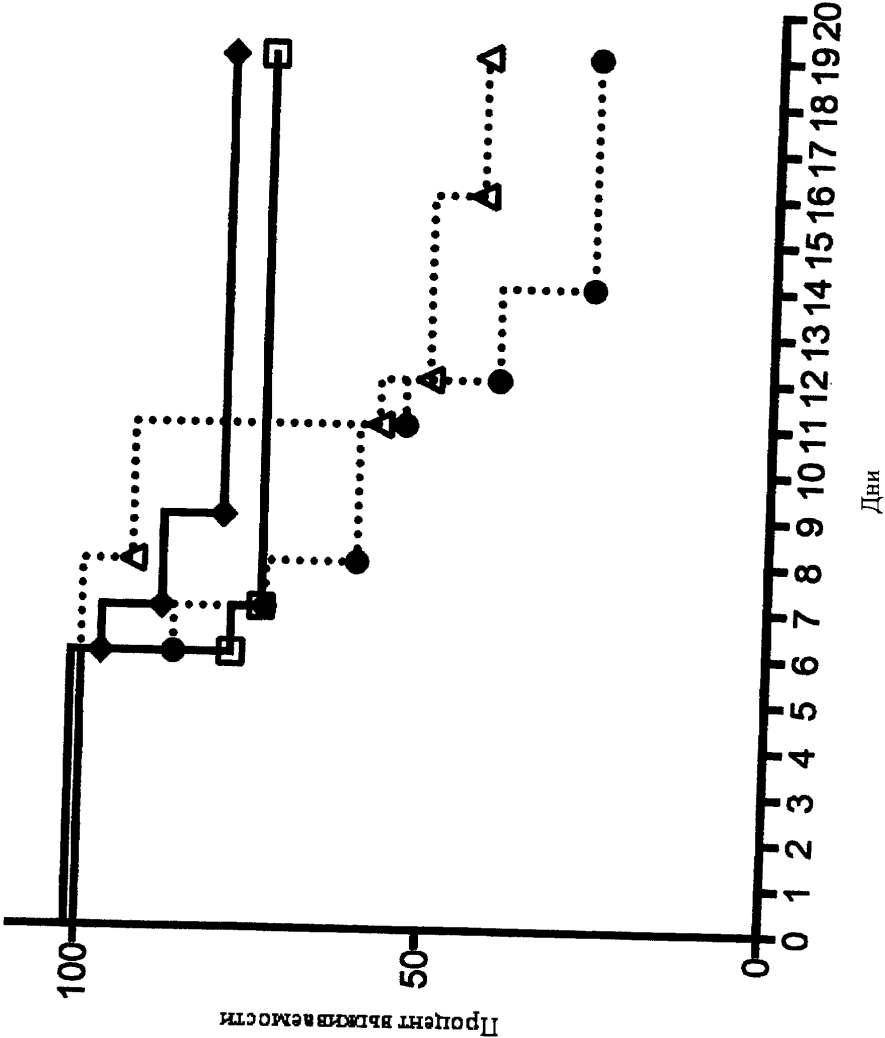
<220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = Thr

<400> 398
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

Фиг. 1

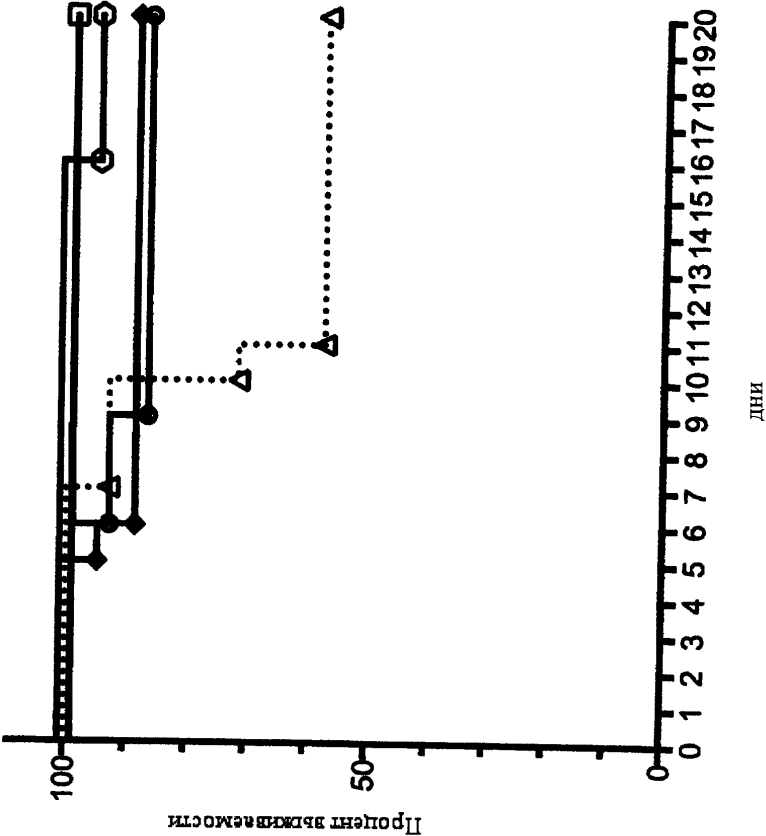


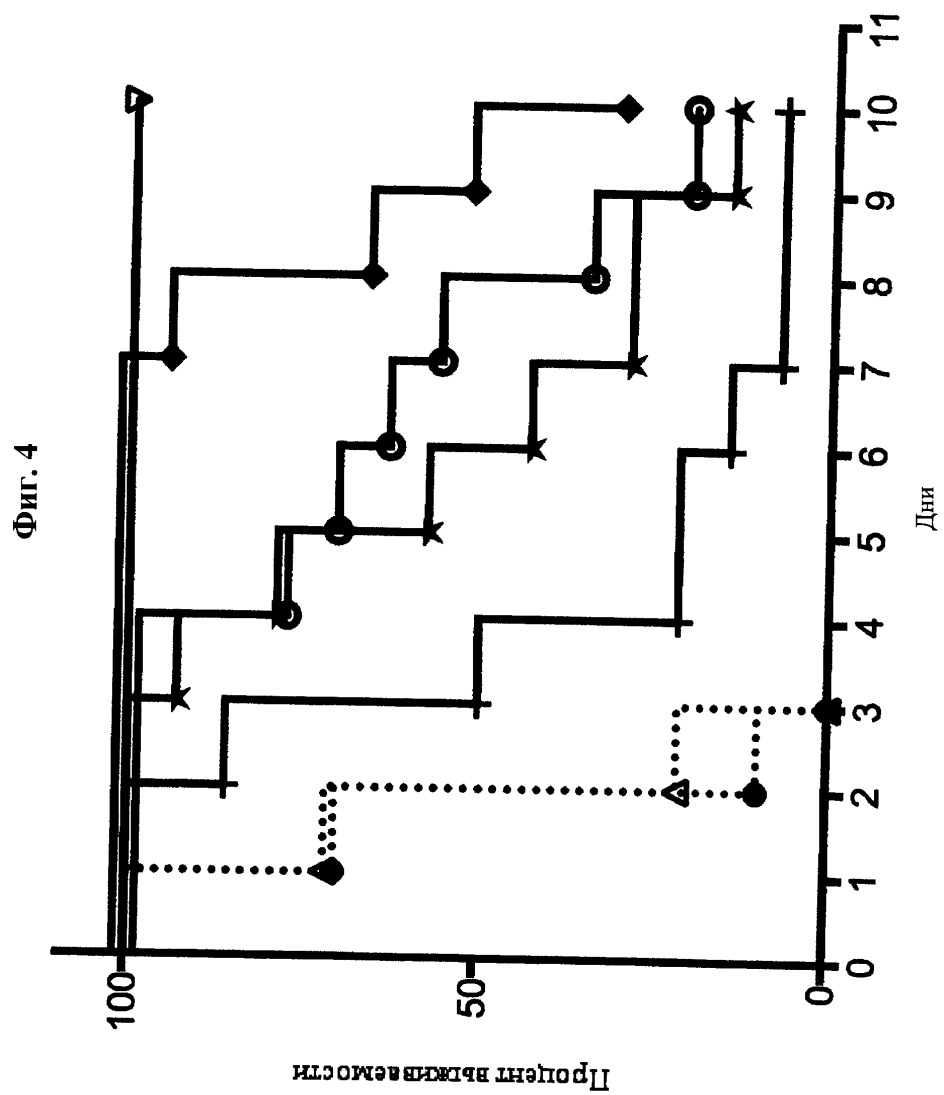
Фиг. 2



3/5

Фиг. 3





Фиг. 5

