УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128712** (13) **C2**

(51) МПК

C07K 16/36 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/02 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ "УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2017 05945**

(22) Дата подання заявки: **18.12.2015**

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **10.10.2024**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **2014-257647**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **19.12.2014**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **JP**

(41) Публікація відомостей про заявку: **11.12.2017, Бюл.№ 23**

(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **09.10.2024, Бюл.№ 41**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/JP2015/006321, 18.12.2015**

(72) Винахідник(и):
Руіке Йосінао (SG),
Сампеі Дзендзіро (SG)

(73) Володілець (володільці):
ЧУГАІ СЕЙЯКУ КАБУСІКІ КАЙСЯ,
5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 1158543, Japan (JP)

(74) Представник:
Войтенко Олександр Петрович, реєстр. №23

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2008/113834 A1, 25.09.2008
WO 2011/111007 A1, 15.09.2011
WO 2013/138680 A1, 19.09.2013
WO 2013/152001 A1, 10.10.2013
WO 2014/028354 A1, 20.02.2014
WO 2015/134894 A1, 11.09.2015
Identification of a human C5 beta-chain epitope exposed in the native complement component but concealed in the SC5b-9 complex, scand / Mollnes T.E. et al. // J.Immunol, 1988, Vol. 28, no. 3, P. 307 – 312
Complete cDNA sequence of human complement pro-C5 evidence of truncated transcripts derived from a single copy gene / Haviland D.L. et al. // Journal of immunology, 1991, Vol. 146, no. 1, P. 362 – 368

UA 128712 C2

(54) АНТИТІЛА ПРОТИ C5 ТА СПОСОБИ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіла проти C5 та способів їх застосування. У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з епітопом у межах бета-ланцюга C5 з вищою афінністю при нейтральному pH, ніж при кислотному pH. Винаходом також пропонуються виділені нуклеїнові кислоти, які кодують антитіло проти C5 цього винаходу. Винаходом також пропонуються клітини-хазяїни, які містять нуклеїнову кислоту цього винаходу. Винаходом також пропонується спосіб отримання антитіла, який включає культивування клітини-хазяїна цього винаходу, так щоб вироблялося антитіло. Винаходом також пропонується спосіб отримання антитіла проти C5, який включає імунізацію тварини проти поліпептиду, який

включає домен MG1-MG2 бета-ланцюга C5. Антитіла проти C5 цього винаходу можна застосовувати як лікарський засіб.

Галузь техніки

Цей винахід стосується антитіл проти C5 та способів їх застосування.

Попередній рівень техніки

Система комплементу відіграє центральну роль у кліренсі імунних комплексів та в імунних реакціях на інфекційні агенти, сторонні антигени, інфіковані вірусом клітини та пухлинні клітини. Існує приблизно 25-30 білків комплементу, які зустрічаються як зібрання комплексів білків плазми та мембранних кофакторів. Компоненти комплементу досягають своїх імунних захисних функцій внаслідок взаємодії у ряді розгалужених ферментативних розщеплень та подій мембранного зв'язування. Внаслідок каскадів реакцій комплементу відбувається виробництво продуктів з опсонічними, імунорегуляторними та літичними функціями.

У цей час загальновизнано, що систему комплементу можна активувати трьома відмінними шляхами: класичним шляхом, лектиновим шляхом та альтернативним шляхом. Ці шляхи мають багато спільних компонентів, та, незважаючи на те, що вони мають різні початкові етапи, вони сходяться та мають спільні однакові кінцеві компоненти комплементу (від C5 до C9), які відповідають за активацію та руйнування клітин-мішеней.

Класичний шлях зазвичай активується внаслідок утворення комплексів антиген-антитіло. Незалежно від цього, перший етап активації лектинового шляху - це зв'язування специфічних лектинів, таких як лектин, що зв'язує манан (MBL), H-фіколін, M-фіколін, L-фіколін та лектин C-типу, CL-11. На відміну від цього, альтернативний шлях спонтанно зазнає низького рівня зворотної активації, яку можна легко ампліфікувати на сторонніх або інших аномальних поверхнях (бактеріях, дріжджах, інфікованих вірусом клітинах або пошкоджених тканинах). Ці шляхи сходяться у точці, де компонент комплементу C3 розщеплюється активною протеазою, внаслідок чого утворюються C3a та C3b.

C3a - це анафілатоксин. C3b зв'язується з бактеріальними та іншими клітинами, а також з певними вірусами та імунними комплексами, та мітить їх для видалення з обігу (роль, відома як опсонін). C3b також утворює комплекс з іншими компонентами, внаслідок чого утворюється конвертаза C5, яка розщеплює C5 на C5a та C5b.

C5 - це білок у 190 кДа, який зустрічається у здоровій сироватці у концентрації приблизно 80 мкг/мл (0,4 мкМ). C5 глікозилований на приблизно 1,5-3 % від його маси, що відносяться до вуглеводу. Зрілий C5 - це гетеродимер альфа-ланцюга у 115 кДа, який має дисульфідний зв'язок з бета-ланцюгом у 75 кДа. C5 синтезується як одноланцюговий білок-попередник (попередник про-C5) у 1676 амінокислот (дивись, наприклад, патентний документ 1 та патентний документ 2). Попередник про-C5 розщеплюється, внаслідок чого утворюються бета-ланцюг, як аміно-термінальний фрагмент, та альфа-ланцюг, як карбоксил-термінальний фрагмент. Ці поліпептидні фрагменти, альфа-ланцюг та бета-ланцюг, з'єднуються один з одним за допомогою дисульфідного зв'язку, та вони складають зрілий білок C5.

Зрілий C5 розщеплюється на фрагменти C5a та C5b під час активації шляхів комплементу. C5a відщеплюється від альфа-ланцюга C5 C5-конвертазою як аміно-термінальний фрагмент, який включає перші 74 амінокислоти альфа-ланцюга. Решта зрілого C5 - це фрагмент C5b, який містить решту альфа-ланцюга, зв'язаного дисульфідним зв'язком з бета-ланцюгом. Приблизно 20 % маси у 11 кДа C5a відноситься до вуглеводу.

C5a - це інший анафілатоксин. C5b об'єднується з C6, C7, C8 та C9, утворюючи мембраноатакуючий комплекс (MAC, C5b-9, термінальний комплекс комплементу (TCC)) на поверхні клітини-мішені. Коли достатня кількість MAC вставляється у мембрани клітин-мішеней, тоді утворюються пори MAC, які опосередковують швидкий осмотичний лізис клітин-мішеней.

Як згадується вище, C3a та C5a - це анафілатоксини. Вони можуть започатковувати дегрануляцію тучних клітин, внаслідок чого вивільняються гістамін та інші медіатори запалення, що спричиняє скорочення гладкої мускулатури, підвищення проникності судин, активацію лейкоцитів та інші запальні явища, включаючи клітинну проліферацію, наслідком якої є підвищення вмісту паренхіматозних клітин. C5a також функціонує як хемотаксичний пептид, який притягує гранулоцити, такі як нейтрофіли, еозинофіли, базофіли та моноцити, до місця активації комплементу.

Активність C5a регулюється ферментом плазми карбоксипептидазою N, що видаляє карбокси-термінальний аргінін з C5a, утворюючи при цьому похідне C5a-дез-Arg. C5a-дез-Arg демонструє лише 1 % анафілактичної активності та поліморфноядерної хемотаксичної активності немодифікованого C5a.

Незважаючи на те, що належним чином функціонуюча система комплементу спричиняє потужний захист проти інфікуючих мікробів, передбачається, що невідповідна регуляція або активація комплементу є причиною патогенезу різноманітних розладів, які включають, наприклад, ревматоїдний артрит (RA); вовчаковий нефрит; ішемічно-реперфузійне

пошкодження; пароксизмальну нічну гемоглобінурію (PNH); атиповий гемолітично-уремічний синдром (aHUS); хворобу щільного осаду (DDD); макулярну дегенерацію (наприклад, пов'язану з віком макулярну дегенерацію (AMD)); синдром гемолізу, збільшення активності печінкових ферментів та тромбоцитопенії (HELLP-синдром)); тромботичну тромбоцитопенічну пурпуру (TTP)); спонтанну втрату плоду; малоімунний васкуліт; булезний епідермоліз; рецидивну втрату плоду; множинний склероз (MS); черепно-мозкову травму; та пошкодження, що є наслідком інфаркту міокарду, штучного кровообігу та гемодіалізу (дивись, наприклад, непатентний документ 1). Отже, інгібування надмірної або неконтрольованої активації каскаду реакцій комплементу може надати клінічних переваг пацієнтам з такими розладами.

Пароксизмальна нічна гемоглобінурія (PNH) - це рідкісне захворювання крові, при якому еритроцити є пошкодженими та внаслідок цього руйнуються більш швидко, ніж здорові еритроцити. PNH є наслідком клонального розмноження кровотворних стовбурових клітин з соматичними мутаціями у гені PIG-A (фосфатидилінозитол глікан класу A), який розташовується на X-хромосомі. Мутації у PIG-A спричиняють раннє блокування синтезу глікозилфосфатидилінозитолу (GPI), молекули, яка є необхідною для фіксації багатьох білків на клітинних поверхнях. Отже, кров'яні клітини при PNH мають дефіцит GPI-фіксованих білків, які включають білки, що регулюють комплемент, CD55 та CD59. За нормальних обставин ці білки, що регулюють комплемент, блокують утворення MAC на клітинних поверхнях, тим самим запобігаючи лізису еритроцитів. Відсутність GPI-фіксованих білків спричиняє опосередкований комплементом гемоліз при PNH.

PNH характеризується гемолітичною анемією (знижена кількість еритроцитів), гемоглобінурією (присутність гемоглобіну у сечі, особливо очевидну після сну) та гемоглобінемією (присутність гемоглобіну у кров'яному потоці). Відомо, що індивідууми, які страждають на PNH, мають напади хвороби, які визначаються тут як випадки з сечею темного кольору. Гемолітична анемія є наслідком внутрішньосудинного руйнування еритроцитів компонентами комплементу. Інші відомі симптоми включають дисфазію, втому, імпотенцію, тромбоз та періодичний біль в животі.

Екулізумаб - це гуманізоване моноклональне антитіло, спрямоване проти білка C5 комплементу, та він є першим терапевтичним засобом, ухваленим для лікування пароксизмальної нічної гемоглобінурії (PNH) та атипового гемолітично-уремічного синдрому (aHUS) (дивись, наприклад, непатентний документ 2). Екулізумаб інгібує розщеплення C5 C5-конвертазою на C5a та C5b, що запобігає утворенню кінцевого комплексу комплементу C5b-9. Як C5a, так і C5b-9 викликають опосередковані кінцевим комплементом події, які є характерними для PNH та aHUS (дивись також патентний документ 3, патентний документ 4, патентний документ 5 та патентний документ 6).

У декількох повідомленнях описано антитіла проти C5. Наприклад, у WO 95/29697 (патентний документ 7) описано антитіло проти C5, яке зв'язується з альфа-ланцюгом C5, але не зв'язується з C5a, та яке блокує активацію C5, проте у WO 2002/30985 (патентний документ 8) описано моноклональне антитіло проти C5, яке інгібує утворення C5a. З іншого боку, у WO 2004/007553 (патентний документ 9) описано антитіло проти C5, яке розпізнає протеолітичний сайт для C5-конвертази на альфа-ланцюгу C5 та яке інгібує перетворення C5 на C5a та C5b. У WO 2010/015608 (патентний документ 10) описано антитіло проти C5, яке має константу афінності, яка становить принаймні 1×10^7 M^{-1}.

Антитіла (IgG) зв'язуються з неонатальним Fc-рецептором (FcRn) та мають тривалий час утримання у плазмі. Зв'язування IgG з FcRn зазвичай спостерігається за кислотних умов (наприклад, pH 6,0), та його рідко спостерігають за нейтральних умов (наприклад, pH 7,4). Зазвичай, IgG неспецифічно включаються у клітини шляхом ендоцитозу, та вони повертаються до клітинних поверхонь внаслідок зв'язування з ендосомним FcRn за кислотних умов в ендосомах. Після цього IgG дисоціюються від FcRn за нейтральних умов у плазмі. IgG, яким не вдалося зв'язатися з FcRn, руйнуються в лізосомах. Коли спроможність зв'язування IgG з FcRn за кислотних умов скасовується внаслідок здійснення мутацій у його Fc-ділянці, тоді IgG не повертається з ендосом назад у плазму, що спричиняє помітне погіршення утримання IgG у плазмі. Для того, щоб покращити утримання IgG у плазмі, повідомлялося про спосіб, який підвищує їх зв'язування з FcRn за кислотних умов. Коли зв'язування IgG з FcRn за кислотних умов покращується внаслідок здійснення амінокислотного заміщення у його Fc-ділянці, тоді IgG ефективніше повертається з ендосом назад у плазму, тим самим демонструючи покращене утримання у плазмі. Між тим, також повідомлялося, що IgG з підсиленим зв'язуванням з FcRn за нейтральних умов не дисоціюється від FcRn за нейтральних умов у плазмі, навіть коли він повертається до клітинної поверхні внаслідок його зв'язування з FcRn за кислотних умов в ендосомах, та, як слідство, його утримання у плазмі залишається незмінним або іноді

погіршується (дивись, наприклад, непатентний документ 3; непатентний документ 4; непатентний документ 5).

Нещодавно повідомлялося про антитіла, які зв'язуються з антигенами залежним від pH чином (дивись, наприклад, патентний документ 11 та патентний документ 12). Ці антитіла сильно зв'язуються з антигенами за нейтральних умов у плазмі та дисоціюються від антигенів за кислотних умов в ендосомах. Після дисоціації від антигенів антитіла набувають спроможності ще раз зв'язуватися з антигенами, коли вони повертаються з ендосом назад у плазму за допомогою FcRn. Отже, єдина молекула антитіла може повторно зв'язуватися з численними молекулами антигенів. Взагалі, утримання антигену у плазмі є набагато коротшим, ніж утримання антитіла, яке має вищезгаданий механізм опосередкованої FcRn рециркуляції. Отже, коли антиген зв'язується з антитілом, тоді антиген зазвичай демонструє подовжене утримання у плазмі, внаслідок чого відбувається підвищення концентрації антигену у плазмі. З іншого боку, повідомлялося, що вищеописані антитіла, які зв'язуються з антигенами залежним від pH чином, усувають антигени з плазми швидше, ніж звичайні антитіла, оскільки вони дисоціюються від антигенів усередині ендосом під час процесу опосередкованої FcRn рециркуляції. У WO 2011/111007 (патентний документ 13) також описано аналіз за допомогою комп'ютерного моделювання, який демонструє, що антитіло із залежним від pH зв'язуванням, спрямоване проти C5, може подовжувати нокдаун-ефект стосовно антигену.

Перелік цитувань

Патентні документи

Патентний документ 1 - Патент США № 6,355,245
Патентний документ 2 - Патент США № 7,432,356
Патентний документ 3-WO 2005/074607
Патентний документ 4-WO 2007/106585
Патентний документ 5-WO 2008/069889
Патентний документ 6-WO 2010/054403
Патентний документ 7-WO 95/29697
Патентний документ 8-WO 2002/30985
Патентний документ 9-WO 2004/007553
Патентний документ 10-WO 2010/015608
Патентний документ 11-WO 2009/125825
Патентний документ 12-WO 2011/122011
Патентний документ 13-WO 2011/111007

Непатентні документи

Непатентний документ 1-Holers et al., Immunol. Rev. 223:300-316 (2008)
Непатентний документ 2-Dmytrijuk et al., The Oncologist 13(9):993-1000 (2008)
Непатентний документ 3-Yeung et al., J Immunol. 182(12): 7663-7671 (2009)
Непатентний документ 4-Datta-Mannan et al., J Biol. Chem. 282(3):1709-1717 (2007)
Непатентний документ 5-Dall'Acqua et al., J. Immunol. 169(9):5171-5180 (2002)

Суть винаходу

Винаходом пропонуються антитіла проти C5 та способи їх застосування.

У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з епітопом у межах бета-ланцюга C5. У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з епітопом у межах домену MG1-MG2 бета-ланцюга C5. У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з епітопом у межах фрагмента, який складається з амінокислот 33-124 бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5. У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з епітопом у межах бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5, який включає принаймні один фрагмент, вибраний з групи, що складається з амінокислот 47-57, 70-76 та 107-110. У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з епітопом у межах фрагмента бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5, який включає принаймні один амінокислотний залишок, вибраний з групи, що складається з Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 та His110 послідовності SEQ ID NO: 40. У подальших варіантах здійснення антитіло зв'язується з C5 з вищою афінністю при нейтральному pH, ніж при кислотному pH. У подальших варіантах здійснення антитіло зв'язується з C5 з вищою афінністю при pH 7,4, ніж при pH 5,8. В іншому варіанті здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з таким самим епітопом, що і антитіло, наведене у Таблиці 2. У подальших варіантах здійснення антитіло зв'язується з таким самим епітопом, що і антитіло, наведене у Таблиці 2, з вищою афінністю при pH 7,4, ніж при pH 5,8. У подальшому варіанті здійснення антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з таким самим епітопом, що і антитіло, наведене у Таблиці 7 або 8. У подальших варіантах здійснення антитіло

зв'язується з таким самим епітопом, що і антитіло, наведене у Таблиці 7 або 8, з вищою афінністю при pH 7,4, ніж при pH 5,8.

У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL, вибрану з: (a) VH SEQ ID NO: 1 та VL SEQ ID NO: 11; (b) VH SEQ ID NO: 5 та VL SEQ ID NO: 15; (c) VH SEQ ID NO: 4 та VL SEQ ID NO: 14; (d) VH SEQ ID NO: 6 та VL SEQ ID NO: 16; (e) VH SEQ ID NO: 2 та VL SEQ ID NO: 12; (f) VH SEQ ID NO: 3 та VL SEQ ID NO: 13; (g) VH SEQ ID NO: 9 та VL SEQ ID NO: 19; (h) VH SEQ ID NO: 7 та VL SEQ ID NO: 17; (i) VH SEQ ID NO: 8 та VL SEQ ID NO: 18; та (j) VH SEQ ID NO: 10 та VL SEQ ID NO: 20. У подальших варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 з вищою афінністю при нейтральному pH, ніж при кислотному pH. У подальших варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 з вищою афінністю при pH 7,4, ніж при pH 5,8.

У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу має характеристику, вибрану з групи, що складається з: (a) антитіло контактує з амінокислотами D51 та K109 C5 (SEQ ID NO: 39); (b) афінність антитіла до C5 (SEQ ID NO: 39) є вищою, ніж афінність антитіла до мутанта C5, який включає заміщення E48A в SEQ ID NO: 39; або (c) антитіло зв'язується з білком C5, який складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 39, при pH 7,4, проте не зв'язується з білком C5, який складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 39 із заміщенням H72Y, при pH 7,4. У подальших варіантах здійснення антитіло зв'язується з C5 з вищою афінністю при нейтральному pH, ніж при кислотному pH. У подальших варіантах здійснення антитіло зв'язується з C5 з вищою афінністю при pH 7,4, ніж при pH 5,8.

У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу інгібує активацію C5. У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу інгібує активацію варіанта R885H C5. У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу - це моноклональне антитіло. У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу - це антитіло людини, гуманізоване антитіло або химерне антитіло. У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу - це фрагмент антитіла, який зв'язується з C5. У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу - це повнорозмірне антитіло IgG1 або IgG4.

У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу включає (a) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність $DX_1GYX_{2\times3}PTHAMX_{4\times5}$, де X_1 - це G або A, X_2 - це V, Q або D, X_3 - це T або Y, X_4 - це Y або H, X_5 - це L або Y (SEQ ID NO: 128), (b) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, де X_1 - це S, C, N або T, X_2 - це F або K, X_3 - це A, T або H (SEQ ID NO: 131), та (c) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність $X_1IX_2TGSGAX_3YX_4AX_5WX_6KG$, де X_1 - це C, A або G, X_2 - це Y або F, X_3 - це T, D або E, X_4 - це Y, K або Q, X_5 - це S, D або E, X_6 - це A або V (SEQ ID NO: 127).

У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу включає (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність $SSYYX_{1\times2}$, де X_1 - це M або V, X_2 - це C або A (SEQ ID NO: 126), (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність $X_1IX_2TGSGAX_3YX_4AX_5WX_6KG$, де X_1 - це C, A або G, X_2 - це Y або F, X_3 - це T, D або E, X_4 - це Y, K або Q, X_5 - це S, D або E, X_6 - це A або V (SEQ ID NO: 127), та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність $DX_1GYX_{2\times3}PTHAMX_{4\times5}$, де X_1 - це G або A, X_2 - це V, Q або D, X_3 - це T або Y, X_4 - це Y або H, X_5 - це L або Y (SEQ ID NO: 128). У подальших варіантах здійснення антитіло включає (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність $X_1ASQX_2IX_3SX_4LA$, де X_1 - це Q або R, X_2 - це N, Q або G, X_3 - це G або S, X_4 - це D, K або S (SEQ ID NO: 129); (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність $GASX_{1\times2}X_3S$, де X_1 - це K, E або T, X_2 - це L або T, X_3 - це A, H, E або Q (SEQ ID NO: 130); та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, де X_1 - це S, C, N або T, X_2 - це F або K, X_3 - це A, T або H (SEQ ID NO: 131).

У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу включає (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність $X_1ASQX_2IX_3SX_4LA$, де X_1 - це Q або R, X_2 - це N, Q або G, X_3 - це G або S, X_4 - це D, K або S (SEQ ID NO: 129); (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність $GASX_{1\times2}X_3S$, де X_1 - це K, E або T, X_2 - це L або T, X_3 - це A, H, E або Q (SEQ ID NO: 130); та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, де X_1 - це S, C, N або T, X_2 - це F або K, X_3 - це A, T або H (SEQ ID NO: 131).

У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу включає каркасну ділянку FR1 варіабельного домену важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 132-134; FR2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 135-136; FR3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID

NO: 137-139; та FR4, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 140-141. У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу включає каркасну ділянку FR1 варіабельного домену легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 142-143; FR2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 144-145; FR3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 146-147; та FR4, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 148.

У деяких варіантах здійснення виділене антитіло проти C5 цього винаходу включає (a) послідовність VH, яка є принаймні на 95 % ідентичною амінокислотній послідовності за будь-якою з SEQ ID NO: 10, 106-110; (b) послідовність VL, яка є принаймні на 95 % ідентичною амінокислотній послідовності за будь-якою з SEQ ID NO: 20, 111-113; або (c) послідовність VH, як у (a), та послідовність VL, як у (b). У подальших варіантах здійснення антитіло включає послідовність VH за будь-якою з SEQ ID NO: 10, 106-110. У подальших варіантах здійснення антитіло включає послідовність VL за будь-якою з SEQ ID NO: 20, 111-113.

Винаходом пропонується антитіло, яке включає послідовність VH за будь-якою з SEQ ID NO: 10, 106-110, та послідовність VL за будь-якою з SEQ ID NO: 20, 111-113.

Винаходом також пропонуються виділені нуклеїнові кислоти, які кодують антитіло проти C5 цього винаходу. Винаходом також пропонуються клітини-хазяїни, які містять нуклеїнову кислоту цього винаходу. Винаходом також пропонується спосіб отримання антитіла, який включає культивування клітини-хазяїна цього винаходу, так щоб вироблялося антитіло.

Винаходом далі пропонується спосіб отримання антитіла проти C5. У деяких варіантах здійснення спосіб включає імунізацію тварини проти поліпептиду, який включає домен MG1-MG2 (SEQ ID NO: 43) бета-ланцюга C5. У деяких варіантах здійснення спосіб включає імунізацію тварини проти поліпептиду, який включає ділянку, яка відповідає амінокислотам на позиціях від 33 до 124 бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5. У деяких варіантах здійснення спосіб включає імунізацію тварини проти поліпептиду, який включає принаймні один фрагмент, вибраний з амінокислот 47-57, 70-76 та 107-110 бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5. У деяких варіантах здійснення спосіб включає імунізацію тварини проти поліпептиду, який включає фрагмент бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5, який включає принаймні одну амінокислоту, вибрану з Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 та His110.

Винаходом також пропонується фармацевтичний склад, який включає антитіло проти C5 цього винаходу та фармацевтично прийнятний носій.

Специфічно, цей винахід стосується наступного.

[1] Виділене антитіло, яке зв'язується з C5, де антитіло зв'язується з епітопом у межах бета-ланцюга C5 з вищою афінністю при нейтральному pH, ніж при кислотному pH.

[2] Антитіло за [1], де антитіло має характеристику, вибрану з групи, що складається з наступного:

(a) антитіло контактує з амінокислотами D51 та K109 C5 (SEQ ID NO: 39);

(b) афінність антитіла до C5 (SEQ ID NO: 39) є вищою, ніж афінність антитіла до мутанта C5, який включає заміщення E48A в SEQ ID NO: 39; та

(c) антитіло зв'язується з білком C5, який складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 39, при pH 7,4, проте не зв'язується з білком C5, який складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 39 із заміщенням H72Y, при pH 7,4.

[3] Антитіло за [1], де антитіло конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL, вибрану з:

(a) VH SEQ ID NO: 1 та VL SEQ ID NO: 11;
(b) VH SEQ ID NO: 5 та VL SEQ ID NO: 15;
(c) VH SEQ ID NO: 4 та VL SEQ ID NO: 14;
(d) VH SEQ ID NO: 6 та VL SEQ ID NO: 16;
(e) VH SEQ ID NO: 2 та VL SEQ ID NO: 12;
(f) VH SEQ ID NO: 3 та VL SEQ ID NO: 13;
(g) VH SEQ ID NO: 9 та VL SEQ ID NO: 19;
(h) VH SEQ ID NO: 7 та VL SEQ ID NO: 17;
(i) VH SEQ ID NO: 8 та VL SEQ ID NO: 18 та
(j) VH SEQ ID NO: 10 та VL SEQ ID NO: 20.

[4] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [3], де антитіло зв'язується з епітопом у межах домену MG1-MG2 бета-ланцюга C5.

[5] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [4], де антитіло зв'язується з епітопом у межах фрагмента, який складається з амінокислот 33-124 бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5.

[6] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [5], де антитіло зв'язується з епітопом у межах

бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5, який включає принаймні один фрагмент, вибраний з групи, що складається з амінокислот 47-57, 70-76 та 107-110.

[7] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [6], де антитіло зв'язується з епітопом у межах фрагмента бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5, який включає принаймні одну амінокислоту, вибрану з групи, що складається з Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 та His110.

[8] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [7], де антитіло зв'язується з таким самим епітопом, що і антитіло, наведене у Таблицях 2, 7 або 8.

[9] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [8], яке інгібує активацію C5.

[10] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [9], яке інгібує активацію варіанта R885H C5.

[11] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [10], яке є моноклональним антитілом.

[12] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [11], яке є антитілом людини, гуманізованим антитілом або химерним антитілом.

[13] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [12], яке є фрагментом антитіла, який зв'язується з C5.

[14] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [13], де антитіло включає (a) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність $DX_1GYX_{2\times3}PTHAMX_{4\times5}$, де X_1 - це G або A, X_2 - це V, Q або D, X_3 - це T або Y, X_4 - це Y або H, X_5 - це L або Y (SEQ ID NO: 128), (b) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, де X_1 - це S, C, N або T, X_2 - це F або K, X_3 - це A, T або H (SEQ ID NO: 131), та (c) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність $X_1IX_2TGSGAX_3YX_4AX_5WX_6KG$, де X_1 - це C, A або G, X_2 - це Y або F, X_3 - це T, D або E, X_4 - це Y, K або Q, X_5 - це S, D або E, X_6 - це A або V (SEQ ID NO: 127).

[15] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [13], де антитіло включає (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність $SSYYX_{1\times2}$, де X_1 - це M або V, X_2 - це C або A (SEQ ID NO: 126), (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність $X_1IX_2TGSGAX_3YX_4AX_5WX_6KG$, де X_1 - це C, A або G, X_2 - це Y або F, X_3 - це T, D або E, X_4 - це Y, K або Q, X_5 - це S, D або E, X_6 - це A або V (SEQ ID NO: 127), та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність $DX_1GYX_{2\times3}PTHAMX_{4\times5}$, де X_1 - це G або A, X_2 - це V, Q або D, X_3 - це T або Y, X_4 - це Y або H, X_5 - це L або Y (SEQ ID NO: 128).

[16] Антитіло за [15], яке також включає (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність $X_1ASQX_2IX_3SX_4LA$, де X_1 - це Q або R, X_2 - це N, Q або G, X_3 - це G або S, X_4 - це D, K або S (SEQ ID NO: 129); (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність $GASX_{1\times2}X_3S$, де X_1 - це K, E або T, X_2 - це L або T, X_3 - це A, H, E або Q (SEQ ID NO: 130); та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, де X_1 - це S, C, N або T, X_2 - це F або K, X_3 - це A, T або H (SEQ ID NO: 131).

[17] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [13], яке включає (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність $X_1ASQX_2IX_3SX_4LA$, де X_1 - це Q або R, X_2 - це N, Q або G, X_3 - це G або S, X_4 - це D, K або S (SEQ ID NO: 129); (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність $GASX_{1\times2}X_3S$, де X_1 - це K, E або T, X_2 - це L або T, X_3 - це A, H, E або Q (SEQ ID NO: 130); та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, де X_1 - це S, C, N або T, X_2 - це F або K, X_3 - це A, T або H (SEQ ID NO: 131).

[18] Антитіло за [15], яке також включає каркасну ділянку FR1 варіабельного домену важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 132-134; FR2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 135-136; FR3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 137-139; та FR4, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 140-141.

[19] Антитіло за [17], яке також включає каркасну ділянку FR1 варіабельного домену легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 142-143; FR2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 144-145; FR3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 146-147; та FR4, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 148.

[20] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [13], яке включає (a) послідовність VH, яка є принаймні на 95 % ідентичною амінокислотній послідовності за будь-якою з SEQ ID NO: 10, 106-110; (b) послідовність VL, яка є принаймні на 95 % ідентичною амінокислотній послідовності за будь-якою з SEQ ID NO: 20, 111-113; або (c) послідовність VH, як у (a), та послідовність VL, як у (b).

[21] Антитіло за [20], яке включає послідовність VH за будь-якою з SEQ ID NO: 10, 106-110.

[22] Антитіло за [20], яке включає послідовність VL за будь-якою з SEQ ID NO: 20, 111-113.

[23] Антитіло, яке включає послідовність VH за будь-якою з SEQ ID NO: 10, 106-110 та послідовність VL за будь-якою з SEQ ID NO: 20, 111-113.

[24] Антитіло за будь-яким одним від [1] до [23], яке є повнорозмірним антитілом IgG1 або

IgG4.

[25] Виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло за будь-яким одним від [1] до [24].

[26] Клітина-хазяїн, яка містить нуклеїнову кислоту за [25].

[27] Спосіб отримання антитіла, який включає культивування клітини-хазяїна за [26], так щоб вироблялося антитіло.

[28] Спосіб отримання антитіла проти C5, який включає імунізацію тварини проти поліпептиду, де поліпептид включає домен MG1-MG2 (SEQ ID NO: 43) бета-ланцюга C5.

[29] Спосіб отримання антитіла проти C5, який включає імунізацію тварини проти поліпептиду, де поліпептид включає ділянку, яка відповідає амінокислотам на позиціях від 33 до 124 бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5.

[30] Спосіб отримання антитіла проти C5, який включає імунізацію тварини проти поліпептиду, де поліпептид включає принаймні один фрагмент, вибраний з амінокислот 47-57, 70-76 та 107-110 бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5.

[31] Спосіб отримання антитіла проти C5, який включає імунізацію тварини проти поліпептиду, де поліпептид включає фрагмент бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5, який включає принаймні одну амінокислоту, вибрану з Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 та His110.

[32] Фармацевтичний склад, який містить антитіло за будь-яким одним від [1] до [24] та фармацевтично прийнятний носій.

Стислий опис ілюстративного матеріалу

Фігура 1

Фігура 1 ілюструє епітоп-специфічне сортування антитіл проти C5, як описано у Прикладі 2.2. Антитіла, згруповані в одну епітопну групу, окреслено жирною лінією.

Фігура 2A

Фігура 2A ілюструє сенсограми BIACORE (зареєстрована торговельна марка) антитіл проти C5 при pH 7,4 (суцільна лінія) та при pH 5,8 (штрихова лінія) для оцінки залежності від pH, як описано у Прикладі 3.2. CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538 та CFA0599 - це антитіла, згруповані в епітопну групу C, як описано у Прикладі 2.2.

Фігура 2B

Фігура 2B ілюструє сенсограми BIACORE (зареєстрована торговельна марка) антитіл проти C5 при pH 7,4 (суцільна лінія) та при pH 5,8 (штрихова лінія) для оцінки залежності від pH, як описано у Прикладі 3.2. CFA0666, CFA0672 та CFA0675 - це антитіла, згруповані в епітопну групу C, та CFA0330 та CFA0341 - це антитіла, згруповані в епітопну групу B, як описано у Прикладі 2.2. 305LO5 - це гуманізоване антитіло CFA0305, як описано у Прикладі 2.3.

Фігура 3

Фігура 3 ілюструє вестерн-блот аналіз стосовно фрагментів, які походять від бета-ланцюга C5 (амінокислоти 19-180, 161-340, 321-500 та 481-660 SEQ ID NO: 40) та які злиті з GST-міткою, як описано у Прикладі 4.1. CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672 та CFA0675 - це антитіла, згруповані в епітопну групу C. Антитіло проти GST - це позитивне контрольне антитіло. Позицію злитих з GST фрагментів C5 (46-49 кДа) позначено стрілкою.

Фігура 4

Фігура 4 ілюструє сенсограми BIACORE (зареєстрована торговельна марка) антитіл проти C5 стосовно домену MG1-MG2 бета ланцюга C5, як описано у Прикладі 4.3. Верхня панель демонструє результати CFA0305 (суцільна лінія), CFA0307 (штрихова лінія), CFA0366 (штрихпунктирна лінія) та екулізумабу (пунктирна лінія). Середня панель демонструє результати CFA0501 (суцільна лінія), CFA0599 (штрихова лінія), CFA0538 (штрихпунктирна лінія) та екулізумабу (пунктирна лінія). Нижня панель демонструє результати CFA0666 (суцільна лінія), CFA0672 (штрихова лінія), CFA0675 (штрихпунктирна лінія) та екулізумабу (пунктирна лінія). CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672 та CFA0675 - це антитіла, згруповані в епітопну групу C. Екулізумаб - це контрольне антитіло проти C5.

Фігура 5A

Фігура 5A ілюструє вестерн-блот аналіз стосовно фрагментів пептиду, які походять від домену MG1-MG2 (амінокислоти 33-124, 45-124, 52-124, 33-111, 33-108 та 45-111 SEQ ID NO: 40) та які злиті з міткою GST, як описано у Прикладі 4.4. Антитіло проти GST застосовується як антитіло для реакції. Позицію злитих з GST фрагментів C5 (35-37 кДа) позначено стрілкою.

Фігура 5B

Фігура 5B ілюструє вестерн-блот аналіз стосовно фрагментів пептиду, які походять від домену MG1-MG2 (амінокислоти 33-124, 45-124, 52-124, 33-111, 33-108 та 45-111 SEQ ID NO: 40) та які злиті з міткою GST, як описано у Прикладі 4.4. CFA0305 застосовується як антитіло

для реакції.

Фігура 5C

Фігура 5C підсумовує реакції зв'язування антитіл проти C5 з фрагментами, що походять від бета-ланцюга C5, як описано у Прикладі 4.4. Фрагменти, з якими зв'язуються антитіла проти C5, згруповані в епітопну групу C (CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672 та CFA0675), зображено сірим кольором, фрагменти, з якими вони не зв'язуються, зображено білим кольором.

Фігура 6

Фігура 6 ілюструє вестерн-блот аналіз стосовно точкових мутантів C5, у яких E48, D51 та K109 бета-ланцюга заміщені аланіном (E48A, D51A та K109A, відповідно), як описано у Прикладі 4.5. На лівій панелі екулізумаб (антитіло проти C5, яке зв'язується з альфа-ланцюгом) застосовується як антитіло для реакції, а положення альфа-ланцюга C5 (приблизно 113 кДа) позначено стрілкою. На правій панелі CFA0305 (згруповане в епітопну групу C, воно зв'язується з бета-ланцюгом) застосовується як антитіло для реакції, а положення бета-ланцюга C5 (приблизно 74 кДа) позначено наконечником стрілки.

Фігура 7

Фігура 7 представляє сенсограми BIACORE (зареєстрована торговельна марка), які демонструють взаємодію екулізумаб-F760G4 (верхня панель) або 305LO5 (нижня панель) з мутантами C5, як описано у Прикладі 4.6. Сенсограми отримали внаслідок впорскування C5-wt (товста суцільна крива), C5-E48A (крива з короткими штрихами), C5-D51A (крива з довгими штрихами) та C5-K109A (тонка суцільна крива), відповідно, уздовж сенсорної поверхні з іммобілізованим екулізумабом-F760G4 або 305LO5. Екулізумаб - це контрольне антитіло проти C5. 305LO5 - це гуманізоване антитіло CFA0305 (згруповане в епітопну групу C), як описано у Прикладі 2.3.

Фігура 8

Фігура 8 представляє сенсограми BIACORE (зареєстрована торговельна марка), які демонструють взаємодію 305LO5 з мутантами C5 із заміщеним His для оцінки залежності від pH, як описано у Прикладі 4.7. Сенсограми отримали внаслідок впорскування C5-wt (товста суцільна крива), C5-H70Y (крива з довгими штрихами), C5-H72Y (крива з короткими штрихами), C5-H110Y (пунктирна крива) та C5-H70Y+H110Y (тонка суцільна крива), відповідно, уздовж сенсорної поверхні з іммобілізованим 305LO5. Щоб оцінити залежні від pH взаємодії, комплексам антитіло/антиген дозволили дисоціюватися при pH 7,4 з наступною додатковою дисоціацією при pH 5,8 (вказано стрілкою).

Фігура 9A

Фігура 9A ілюструє інгібування антитілами проти C5 лізису ліпосом, активованого комплементом, як описано у Прикладі 5.1. Показано результати для антитіл CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672 та CFA0675, згрупованих в епітопну групу C, як описано у Прикладі 2.2.

Фігура 9B

Фігура 9B ілюструє інгібування антитілами проти C5 лізису ліпосом, активованого комплементом, як описано у Прикладі 5.1. Показано результати для антитіл CFA0330 та CFA0341, згрупованих в епітопну групу B, як описано у Прикладі 2.2.

Фігура 10A

Фігура 10A ілюструє інгібування антитілами проти C5 генерування C5a, як описано у Прикладі 5.2. Концентрації C5a кількісно визначили в надосадових рідинах, отриманих під час аналізу лізису ліпосом, показаного на Фігурі 9A.

Фігура 10B

Фігура 10B ілюструє інгібування антитілами проти C5 генерування C5a, як описано у Прикладі 5.2. Концентрації C5a кількісно визначили в надосадових рідинах, отриманих під час аналізу лізису ліпосом, показаного на Фігурі 9B.

Фігура 11

Фігура 11 ілюструє інгібування антитілами проти C5 активованого комплементом гемолізу, як описано у Прикладі 5.3. Комплементи активували, застосовуючи класичний шлях.

Фігура 12

Фігура 12 ілюструє інгібування антитілами проти C5 активованого комплементом гемолізу, як описано у Прикладі 5.4. Комплементи активували, застосовуючи альтернативний шлях.

Фігура 13

Фігура 13 ілюструє інгібування антитілами проти C5 лізису ліпосом, активованого комплементом, як описано у Прикладі 8.1. Показано результати для антитіл 305LO15-SG422, 305LO16-SG422, 305LO18-SG422, 305LO19-SG422, 305LO20-SG422 та 305LO20-SG115.

Фігура 14

Фігура 14 ілюструє інгібування антитілами проти C5 лізису ліпосом, активованого комплементом, як описано у Прикладі 8.1. Показано результати для антитіл 305LO15-SG115 та 305LO23-SG429.

Фігура 15

Фігура 15 ілюструє інгібування антитілами проти C5 лізису ліпосом, активованого комплементом, як описано у Прикладі 8.1. Показано результати для антитіл 305LO22-SG115, 305LO22-SG422, 305LO23-SG115 та 305LO23-SG422.

Фігура 16

Фігура 16 ілюструє інгібування антитілами проти C5 генерування C5a, як описано у Прикладі 8.2. Концентрації C5a кількісно визначили в надосадових рідинах, отриманих під час аналізу лізису ліпосом, показаного на Фігурі 13.

Фігура 17

Фігура 17 ілюструє інгібування антитілами проти C5 генерування C5a, як описано у Прикладі 8.2. Концентрації C5a кількісно визначили в надосадових рідинах, отриманих під час аналізу лізису ліпосом, показаного на Фігурі 14.

Фігура 18

Фігура 18 ілюструє інгібування антитілами проти C5 активності комплементу у мавпячій плазмі, як описано у Прикладі 8.3. Антитіла проти C5 вводили яванським макакам, а активність комплементу у плазмі мавп вимірювали за допомогою аналізу гемолізу.

Фігура 19

Фігура 19 ілюструє інгібування біологічної активності природного C5 (WT) та варіантів C5 (V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N та E1437D) антитілом проти C5 (екулізумабом), як описано у Прикладі 8.4.

Фігура 20

Фігура 20 ілюструє інгібування біологічної активності природного C5 (WT) та варіантів C5 (V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N та E1437D) антитілом проти C5 (варіантом 305), як описано у Прикладі 8.4.

Фігура 21

Фігура 21 ілюструє інгібування антитілами проти C5 (BNJ441 та варіантом 305) активованого комплементом лізису ліпосом, як описано у Прикладі 8.5.

Фігура 22

Фігури 22A та 22B ілюструють кристалічну структуру Fab 305, зв'язаного з доменом (hC5)-MG1 C5 людини, як описано у Прикладі 9.6. Фігура 22A ілюструє асиметричну одиницю. MG1 зображено як поверхню, а Fab 305 зображено як стрічки (темно-сірі - важкий ланцюг, світло-сірі - легкий ланцюг). Фігура 22B ілюструє молекули 1 та 2, накладені одна на одну (темно-сіра - молекула 1, світло-сіра - молекула 2).

Фігура 23A

Фігура 23A ілюструє епітоп контактної ділянки стосовно Fab 305 на домені MG1, як описано у Прикладі 9.6. Фігура 23A ілюструє картування епітопів в амінокислотній послідовності MG1 (темно-сірі - ближче, ніж 3,0 ангстрема, світло-сірі - ближче, ніж 4,5 ангстрема).

Фігура 23B

Фігура 23B ілюструє епітоп контактної ділянки стосовно Fab 305 на домені MG1, як описано у Прикладі 9.6. Фігура 23B ілюструє картування епітопів у кристалічній структурі (темно-сірі кульки - ближче ніж 3,0 ангстрема, світло-сірі гілки - ближче ніж 4,5 ангстрема).

Фігура 24A

Фігура 24A ілюструє крупний план взаємодій E48, D51 та K109 (представлені як гілки) з Fab 305 (представлений як поверхня), як описано у Прикладі 9.7.

Фігура 24B

Фігура 24B ілюструє взаємодії між E48 та його оточенням (темно-сіра пунктирна лінія - водневий зв'язок з Fab, світло-сіра пунктирна лінія - опосередкований водою водневий зв'язок), як описано у Прикладі 9.7.

Фігура 24C

Фігура 24C ілюструє взаємодії між D51 та його оточенням (темно-сіра пунктирна лінія - водневий зв'язок з Fab), як описано у Прикладі 9.7.

Фігура 24D

Фігура 24D ілюструє взаємодії між K109 та його оточенням (темно-сіра пунктирна лінія - водневий зв'язок з Fab, світло-сіра пунктирна лінія - сольовий місток з H-CDR3_D95), як описано у Прикладі 9.7.

Фігура 25A

Фігура 25A ілюструє крупний план взаємодій H70, H72 та H110 (представлені як гілки) з Fab 305 (представлене як поверхня), як описано у Прикладі 9.8, у такій самій орієнтації, як на Фігурі 24A.

Фігура 25B

Фігура 25B ілюструє взаємодії між H70 та його оточенням, як описано у Прикладі 9.8. Залишок гістидину зображено гілками та решітками). Водневий зв'язок вказано пунктирною лінією.

Фігура 25C

Фігура 25C ілюструє взаємодії між H72 та його оточенням, як описано у Прикладі 9.8. Залишок гістидину зображено гілками та решітками). Водневий зв'язок вказано пунктирною лінією.

Фігура 25D

Фігура 25D ілюструє взаємодії між H110 та його оточенням, як описано у Прикладі 9.8. Залишок гістидину зображено гілками та решітками). Відстань між H110 та H-CDR3_H100c зображено пунктирною лінією.

Опис варіантів здійснення

Способи та процедури, які описані у цьому описі або на які посилаються у цьому описі, взагалі є добре зрозумілими, та вони зазвичай застосовуються із використанням традиційної методології фахівцями у галузі, такої як, наприклад, методології, які широко застосовуються та які описано у Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); у серії Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); та Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

I. ВИЗНАЧЕННЯ

Якщо інше не визначається, технічні та наукові терміни, які застосовуються у цьому описі, мають таке саме значення, яке є зазвичай зрозумілим для звичайного фахівця у галузі, до якої належить цей винахід. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), та March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992) пропонують фахівцю у галузі загальну інструкцію для багатьох термінів, які застосовуються у цій заявці. Усі посилання, процитовані у цьому описі, включаючи патентні заявки та публікації, включено до посилань у їхньому повному обсязі.

З метою тлумачення цього опису винаходу будуть застосовуватися наступні визначення там, де це є доречним, терміни, які застосовуються в однині, будуть також застосовуватися у множині, та навпаки. Слід розуміти, що термінологія, яка застосовується у цьому описі, призначена для опису тільки особливих варіантів здійснення, та вона не призначена для обмеження. У випадку, коли будь-яке запропоноване нижче визначення конфліктує з будь-яким документом, включеним у цей опис шляхом посилання, запропоноване нижче визначення буде переважним.

"Акцепторна каркасна ділянка людини" для цілей цього опису - це каркасна ділянка, яка включає амінокислотну послідовність каркасної ділянки варіабельного домену легкого ланцюга (VL) або каркасної ділянки варіабельного домену важкого ланцюга (VH), що походять від каркасної ділянки імуноглобуліну людини або консенсусної каркасної ділянки людини, як визначається нижче. Акцепторна каркасна ділянка людини, "яка походить від" каркасної ділянки імуноглобуліну людини або консенсусної каркасної ділянки людини, може включати таку саму її

амінокислотну послідовність, або вона може мати зміни в амінокислотній послідовності. У деяких варіантах здійснення кількість амінокислотних змін становить 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, 7 або менше, 6 або менше, 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше або 2 або менше. У деяких варіантах здійснення акцепторна каркасна ділянка варіабельної ділянки легкого ланцюга людини є ідентичною за своєю послідовністю послідовності каркасної ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга імуноглобуліну людини або послідовності консенсусної каркасної ділянки людини.

"Афінність" означає силу сукупності нековалентних взаємодій між єдиним сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитіла) та її партнером по зв'язуванню (наприклад, антигеном). Якщо інше не вказано, як застосовується у цьому описі, "афінність зв'язування" означає притаманну афінність зв'язування, яка відображає взаємодію 1:1 між членами пари зв'язування (наприклад, антитілом та антигеном). Афінність молекули X до її партнера Y можна взагалі представити константою дисоціації (Kd). Афінність можна вимірювати за допомогою звичайних відомих у галузі способів, включаючи способи, описані у цьому описі. Специфічні ілюстративні приклади варіантів здійснення вимірювання афінності зв'язування описано далі.

Антитіло "зі зрілою афінністю" означає антитіло з однією або більше змінами в одній або більше гіперваріабельних ділянках (HVR), порівняно з початковим антитілом, яке не має таких змін, при цьому такі зміни зумовлюють покращення афінності антитіла до антигену.

Терміни "антитіло проти C5" та "антитіло, яке зв'язується з C5" означають антитіло, яке є спроможним зв'язуватися з C5 з достатньою афінністю, так що антитіло є корисним як діагностичний та/або терапевтичний агент, коли воно націлене на C5. В одному варіанті здійснення ступінь зв'язування антитіла проти C5 з неспорідненим білком, який не є C5, становить менш ніж 10 % від зв'язування антитіла з C5, що вимірюється, наприклад, за допомогою радіоімунологічного аналізу (RIA). У певних варіантах здійснення антитіло, яке зв'язується з C5, має константу дисоціації (Kd):

$\leq$ 1 мкМ, $\leq$ 100 нМ, $\leq$ 10 нМ, $\leq$ 1 нМ, $\leq$ 0,1 нМ, $\leq$ 0,01 нМ або $\leq$ 0,001 нМ

(наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М). У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з епітопом C5, який є консервативним серед C5 від інших видів тварин.

Термін "антитіло" у цьому описі застосовується в найширшому сенсі, та він охоплює різні структури антитіл, включаючи, проте не обмежуючись ними, моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) та фрагменти антитіл, доки вони демонструють бажану антигензв'язувальну активність.

"Фрагмент антитіла" означає молекулу, відмінну від інтактного антитіла, яка включає частину інтактного антитіла, яка зв'язується з антигеном, з яким зв'язується інтактне антитіло. Приклади фрагментів антитіла включають, проте не обмежуються ними, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; діатіла; лінійні антитіла; молекули одноланцюгового антитіла (наприклад, scFv) та мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіла.

"Антитіло, яке зв'язується з таким самим епітопом", що і посилальне антитіло, означає антитіло, яке блокує зв'язування посилального антитіла з його антигеном у конкурентному аналізі, та/або навпаки, посилальне антитіло блокує зв'язування цього антитіла з його антигеном у конкурентному аналізі. У цьому описі запропоновано приклад аналізу конкурентного зв'язування.

Термін "химерне" антитіло означає антитіло, у якому частина важкого та/або легкого ланцюга походить від певного джерела або виду, тоді як решта важкого та/або легкого ланцюга походить від іншого джерела або виду.

"Клас" антитіла означає тип константного домену або константної ділянки, притаманний його важкому ланцюгу. Існує п'ять головних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG та IgM, та декілька з них можна далі розподілити на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 та IgA_2. Константні домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам імуноглобулінів, називаються альфа, дельта, іпсилон, гамма та мю, відповідно.

Термін "цитотоксичний агент", як застосовується у цьому описі, означає речовину, яка інгібує або перешкоджає клітинній функції та/або призводить до загибелі або руйнування клітини. Цитотоксичні агенти включають, проте не обмежуються ними, радіоактивні ізотопи (наприклад, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} та радіоактивні ізотопи Lu); хіміотерапевтичні агенти або ліки (наприклад, метотрексат, адріаміцин, алкалоїди барвінку (вінкристин, вінбластин, етопозид), доксорубіцин, мелфалан, мітоміцин C, хлорамбуцил, даунорубіцин або інші інтеркалуючі агенти); агенти інгібування росту; ферменти та їх фрагменти, такі як нуклеотичні ферменти; антибіотики; токсини, такі як токсини з дрібними молекулами, або ферментативно активні токсини бактеріального, грибкового, рослинного або

тваринного походження, включаючи їх фрагменти та/або варіанти; та різні протипухлинні та протиракові агенти, описані нижче.

"Ефекторні функції" означають ті біологічні види активності, притаманні Fc-ділянці антитіла, які різняться залежно від ізотипу антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають: зв'язування C1q та комплементзалежну цитотоксичність (CDC); зв'язування з рецептором Fc; антитілозалежну клітинноопосередковану цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; негативну регуляцію рецепторів клітинної поверхні (наприклад, рецептора B-клітин) та активацію B-клітин.

"Ефективна кількість" агента, наприклад, фармацевтичного складу, означає кількість, яка є ефективною при дозуванні та протягом необхідних періодів часу, щоб досягти бажаного терапевтичного або профілактичного результату.

Термін "епітоп" включає будь-яку детермінанту, яка має властивість бути зв'язаною антитілом. Епітоп - це ділянка антигену, яка зв'язується антитілом, яке улучає в антиген, та яка включає специфічні амінокислоти, які безпосередньо контактують з антитілом. Епітопні детермінанти можуть включати хімічно активні поверхневі угрупування молекул, такі як амінокислоти, цукрові бічні ланцюги, фосфорильні або сульфонільні групи, та вони можуть мати специфічні тривимірні структурні характеристики та/або специфічні характеристики заряду. Взагалі, антитіла, специфічні для певного антигену-мішені, будуть переважно розпізнавати епітоп на антигені-мішені у складній суміші білків та/або макромолекул.

Термін "Fc-ділянка" у цьому описі застосовується для визначення C-кінцевої ділянки важкого ланцюга імуноглобуліну, який містить принаймні частину константної ділянки. Термін включає Fc-ділянки нативної послідовності та варіантні Fc-ділянки. В одному варіанті здійснення Fc-ділянка важкого ланцюга IgG людини простягається від Cys226 або від Pro230 до карбоксильного кінця важкого ланцюга. Однак, C-кінцевий лізин (Lys447) Fc-ділянки може бути присутнім або відсутнім. Якщо інше не вказується у цьому описі, нумерація амінокислотних залишків в Fc-ділянці або константній ділянці відповідає системі Європейської номенклатури, яка також називається EU-індекс, як описано у Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Каркасна ділянка" або "FR" означає залишки варіабельного домену, відмінні від залишків гіперваріабельних ділянок (HVR). FR варіабельного домену взагалі складається з чотирьох доменів FR: FR1, FR2, FR3 та FR4. Отже, послідовності HVR та FR зазвичай розташовані у наступному порядку у VH (або VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" та "повне антитіло" застосовуються у цьому описі взаємозамінним чином, та вони означають антитіло, яке має структуру, по суті подібну до структури нативного антитіла, або яке має важкі ланцюги, які містять Fc-ділянку, як визначається у цьому описі.

Терміни "клітина-хазяїн", "лінія клітин-хазяїнів" та "культура клітин-хазяїнів" застосовуються взаємозамінним чином, та вони означають клітини, у які було введено екзогенну нуклеїнову кислоту, включаючи потомство таких клітин. Клітини-хазяїни включають "трансформанти" та "трансформовані клітини", які включають первинні трансформовані клітини та потомство, що походить від них, незважаючи на кількість пасажів. Потомство може не бути повністю ідентичним початковій клітині щодо нуклеїновокислотного вмісту, проте воно може містити мутації. У цей опис включено мутантне потомство, яке має таку саму функцію або біологічну активність, що встановлено шляхом скринінгу або відбору для первинно трансформованої клітини.

"Антитіло людини" - це антитіло, яке має амінокислотну послідовність, яка відповідає амінокислотній послідовності антитіла, яке вироблено людиною або клітиною людини, або яке походить від джерела, яке не є людиною, та яке використовує спектри антитіл людини або інші послідовності, що кодують антитіло людини. Це визначення антитіла людини специфічно виключає гуманізоване антитіло, яке включає залишки, які зв'язуються з антигеном і не є людськими.

"Консенсусна каркасна ділянка людини" - це каркасна ділянка, яка представляє найчастіше виникаючі амінокислотні залишки при відборі послідовностей каркасної ділянки VL або VH імуноглобуліну людини. Взагалі, відбір послідовностей VL або VH імуноглобуліну людини відбувається з підгрупи послідовностей варіабельного домену. Взагалі, підгрупа послідовностей - це підгрупа, як вказано у Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. В одному варіанті здійснення, для VL, підгрупа - це підгрупа каппа I, як вказано у Kabat et al., див. вище. В одному варіанті здійснення, для VH, підгрупа - це підгрупа III, як вказано у Kabat et al., див. вище.

"Гуманізоване" антитіло означає химерне антитіло, яке включає амінокислотні залишки

HVR, які не є людськими, та амінокислотні залишки з FR людини. У певних варіантах здійснення гуманізоване антитіло включатиме по суті усі з принаймні одного або зазвичай двох варіабельних доменів, у яких усі або по суті усі HVR (наприклад, CDR) відповідають гіперваріабельним ділянкам антитіла, яке не є людським, та усі або по суті усі FR відповідають каркасним ділянкам антитіла людини. Гуманізоване антитіло довільно може включати принаймні частину константної ділянки антитіла, яка походить від антитіла людини. "Гуманізована форма" антитіла, наприклад, антитіла, яке не є людським, означає антитіло, яке зазнало гуманізації.

Термін "гіперваріабельна ділянка" або "HVR", як застосовується у цьому описі, означає кожну з ділянок варіабельного домену антитіла, які є гіперваріабельними у послідовності ("ділянки, що визначають комплементарність" або "CDR"), та/або утворюють структурно визначені петлі ("гіперваріабельні петлі"), та/або містять залишки, що контактують з антигеном ("контакти антигену"). Взагалі, антитіла включають шість HVR: три у VH (H1, H2, H3) та три у VL (L1, L2, L3). Приклади HVR у цьому описі включають: (a) гіперваріабельні петлі, які виникають на амінокислотних залишках 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) та 96-101 (H3) (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)); (b) CDR, які виникають на амінокислотних залишках 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) та 95-102 (H3) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NIH, Bethesda, MD (1991)); (c) антигенні контакти, які виникають на амінокислотних залишках 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) та 93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)); та (d) комбінації (a), (b) та/або (c), які включають амінокислотні залишки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) та 94-102 (H3).

Якщо інше не вказано, залишки HVR та інші залишки у варіабельному домені (наприклад, залишки FR) нумеруються у цьому описі згідно з Kabat et al., див. вище.

"Імунокон'югат" - це антитіло, кон'юговане з однією або більше гетерологічною (гетерологічними) молекулою (молекулами), включаючи, проте не обмежуючись ним, цитотоксичний агент.

"Індивідуум" або "суб'єкт" - це ссавець. Ссавці включають, проте не обмежуються ними, свійських тварин (наприклад, корів, овець, котів, собак та коней), приматів (наприклад, приматів-людей та приматів, які не є людьми, таких як мавпи), кролів та гризунів (наприклад, мишей та щурів). У певних варіантах здійснення індивідуум або суб'єкт - це людина.

"Виділене" антитіло - це антитіло, яке відокремили від компонентів його природного оточення. У деяких варіантах здійснення антитіло очищують більш ніж до 95 % або 99 % чистоти, як визначається за допомогою, наприклад, електрофорезу (наприклад, на поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE)), ізоелектричного фокусування (IEF), капілярного електрофорезу) або хроматографії (наприклад, іонообмінної або зворотно-фазової ВЕРХ (HPLC)). Для огляду способів оцінювання чистоти антитіла дивись, наприклад, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

"Виділена" нуклеїнова кислота означає молекулу нуклеїнової кислоти, яку відокремили від компонентів її природного оточення. Виділена нуклеїнова кислота включає молекулу нуклеїнової кислоти, що міститься у клітинах, які зазвичай містять цю молекулу нуклеїнової кислоти, проте існує молекула нуклеїнової кислоти, присутня назовні хромосоми або на хромосомній позиції, яка є відмінною від природної хромосомної позиції.

"Виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло проти C5" означає одну або більше молекул нуклеїнової кислоти, які кодують важкий та легкий ланцюги антитіла (або їх фрагменти), включаючи таку (такі) молекулу (молекули) нуклеїнової кислоти у єдиному векторі або окремих векторах та таку (такі) молекулу (молекули) нуклеїнової кислоти, які присутні у одному або більше місцях у клітині-хазяїні.

Термін "моноклональне антитіло", як застосовується у цьому описі, означає антитіло, отримане з популяції по суті гомогенних антитіл; тобто окремі антитіла, які містяться в популяції, є ідентичними та/або зв'язуються з одним і тим же епітопом, за виключенням можливих варіантів антитіл, наприклад тих, які мають природні мутації або які виникають під час отримання препарату моноклонального антитіла, при цьому такі варіанти зазвичай присутні у незначних кількостях. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які зазвичай включають різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло препарату моноклональних антитіл спрямоване проти єдиної детермінанти на антигені. Отже, визначення "моноклональне" вказує на характер антитіла, як його отримують з по суті гомогенної популяції антитіл, та воно не інтерпретується як необхідне виробництво антитіла за допомогою будь-якого певного способу. Наприклад, моноклональні антитіла, призначені для застосування згідно з цим винаходом, можна отримати за різноманітними способами,

включаючи, проте не обмежуючись ними, спосіб гібридом, способи рекомбінантної ДНК, способи фагового дисплея та способи, у яких застосовуються трансгенні тварини, які містять всі або частину локусів імуноглобуліну людини, при цьому такі способи та приклади інших способів отримання моноклональних антитіл описуються у цьому описі винаходу.

"Голе антитіло" означає антитіло, яке не кон'юговане з гетерологічною складовою (наприклад, цитотоксичною складовою) або радіоактивною міткою. Голе антитіло може бути присутнім у фармацевтичному складі.

Термін "нативні антитіла" означає природні молекули імуноглобуліну з різними структурами. Наприклад, нативні антитіла IgG - це гетеротетрамерні глікопротеїни масою біля 150000 дальтонів, які складаються з двох ідентичних легких ланцюгів та двох ідентичних важких ланцюгів, які мають дисульфідний зв'язок. Від N- до C-кінця кожен важкий ланцюг має варіабельну ділянку (VH), яка також називається варіабельним важким доменом або варіабельним доменом важкого ланцюга, з наступними трьома константними доменами (CH1, CH2 та CH3). Подібно до цього, від N- до C-кінця кожен легкий ланцюг має варіабельну ділянку (VL), яка також називається варіабельним легким доменом або варіабельним доменом легкого ланцюга, з наступним константним легким (CL) доменом. Легкий ланцюг антитіла можна віднести до одного з двох типів, які називаються к (каппа) та λ (лямбда), на основі амінокислотної послідовності його константного домену.

Термін "аркуш-вкладиш в упаковці" застосовується для посилання на інструкції, які традиційно вкладаються у комерційні упаковки терапевтичних виробів та які містять інформацію щодо показань, застосування, дозування, способів введення, комплексної терапії, протипоказань та/або попереджень щодо застосування таких терапевтичних виробів.

"Ідентичність амінокислотної послідовності у відсотках (%)" стосовно посилальної поліпептидної послідовності визначається як відсоткове відношення амінокислотних залишків у послідовності-кандидаті, які є ідентичними амінокислотним залишкам у посилальній поліпептидній послідовності після вирівнювання послідовностей та введення проміжків, якщо необхідно, щоб досягти максимальної ідентичності послідовностей у відсотках, при цьому будь-які консервативні заміщення не розглядаються як частина ідентичності послідовностей. Вирівнювання з метою визначення ідентичності амінокислотних послідовностей у відсотках можна досягти за різними способами, які знаходяться у межах фахових знань у цій галузі, наприклад, застосовуючи публічно доступне комп'ютерне програмне забезпечення, таке як програмне забезпечення BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Фахівці у цій галузі можуть визначити відповідні параметри для вирівнювання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання на повній довжині послідовностей, які порівнюються. Проте, для цілей цього опису відсоткові значення ідентичності амінокислотних послідовностей генеруються із застосуванням комп'ютерної програми порівнювання послідовностей ALIGN-2. Комп'ютерна програма порівнювання послідовностей ALIGN-2 була розроблена Genentech, Inc., та початкову програму було подано разом з документацією для користувачів у Відомство Сполучених Штатів з авторських прав (US Copyright Office), Washington D.C., 20559, де її зареєстровано за номером US Copyright Registration No. TXU510087. Програма ALIGN-2 є публічно доступною від Genentech, Inc., South San Francisco, Каліфорнія, або її можна завантажити з початкової програми. Програму ALIGN-2 слід завантажувати для застосування на операційну систему UNIX, зокрема цифрову UNIX V4.0D. Усі параметри порівнювання послідовностей задаються програмою ALIGN-2, та вони не змінюються.

У випадках, коли програма ALIGN-2 застосовується для порівнювання амінокислотних послідовностей, ідентичність амінокислотних послідовностей у відсотках даної амінокислотної послідовності A щодо, проти або з даною амінокислотною послідовністю B (яку можна альтернативно перефразувати як "дана амінокислотна послідовність A", яка має в цілому або в своїй частині певну ідентичність амінокислотних послідовностей у відсотках щодо, проти або з даною амінокислотною послідовністю B) розраховується наступним чином: помножений на 100 дріб X/Y; де X - це кількість амінокислотних залишків, які враховано як ідентичні збіги програмою вирівнювання послідовностей ALIGN-2 у цьому програмному вирівнюванні A та B, та де Y - це загальна кількість амінокислотних залишків у B. Зрозуміло, що там, де довжина амінокислотної послідовності A не дорівнює довжині амінокислотної послідовності B, ідентичність амінокислотних послідовностей A та B у відсотках не буде дорівнювати ідентичності амінокислотних послідовностей B та A у відсотках. Якщо інше специфічно не вказується, усі значення ідентичності амінокислотних послідовностей у відсотках, які застосовуються у цьому описі, отримують із застосуванням комп'ютерної програми ALIGN-2, як описано в попередньому абзаці.

Термін "фармацевтичний склад" означає препарат, який має таку форму, яка дозволяє біологічній активності активного інгредієнта, що міститься у ньому, бути ефективною, та який не містить додаткових компонентів, які є неприйнятно токсичними для суб'єкта, якому склад буде вводитися.

"Фармацевтично прийнятний носій" означає інгредієнт у фармацевтичному складі, відмінний від активного інгредієнта, який є нетоксичним для суб'єкта. Фармацевтично прийнятний носій включає, проте не обмежується ними, буфер, наповнювач, стабілізуючий агент або консервант.

Термін "C5", як застосовується у цьому описі, охоплює будь-який нативний C5 від будь-якого джерела: хребетних, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, люди та мавпи) та гризуни (наприклад, миші та щури). Якщо інше не вказано, термін "C5" означає білок C5 людини, який має амінокислотну послідовність, наведену у SEQ ID NO: 39 та який містить послідовність бета-ланцюга, наведену у SEQ ID NO: 40. Термін охоплює "повнорозмірний" необроблений C5, а також будь-яку форму C5, отриману внаслідок процесингу у клітині. Термін також охоплює природні варіанти C5, наприклад, сплайсовані варіанти або алельні варіанти. Амінокислотну послідовність прикладу C5 людини наведено у SEQ ID NO: 39 ("природний тип" або "WT" C5). Амінокислотну послідовність прикладу бета-ланцюга C5 людини наведено у SEQ ID NO: 40. Амінокислотні послідовності прикладів доменів MG1, MG2 та MG1-MG2 бета-ланцюга C5 людини наведено у SEQ ID NO: 41, 42 та 43, відповідно. Амінокислотні послідовності прикладів C5 яванських макак (cynomolgus monkey) та мишей наведено у SEQ ID NO: 44 та 105, відповідно. Амінокислотні залишки 1-19 SEQ ID NO: 39, 40, 43, 44 та 105 відповідають сигнальній послідовності, яка видаляється під час процесингу у клітині, внаслідок чого вона не міститься у відповідному прикладі амінокислотної послідовності.

Як застосовується у цьому описі, термін "лікування" (та відповідні йому граматичні форми, такі як "лікувати" або "піддавати лікуванню") означає клінічне втручання з метою спроби змінити природний хід хвороби індивідуума, якого лікують, та його можна здійснювати або з метою профілактики, або під час перебігу клінічної патології. Бажані ефекти лікування включають, проте не обмежуються ними, попередження появи або рецидиву хвороби, зменшення симптомів, зменшення будь-яких прямих або непрямих патологічних наслідків хвороби, попередження метастазу, зниження швидкості розвитку хвороби, покращення або полегшення стану хвороби та ремісію або покращення прогнозу. У деяких варіантах здійснення антитіла цього винаходу застосовуються для затримки розвитку хвороби або уповільнення розвитку хвороби.

Термін "варіабельна ділянка" або "варіабельний домен" означає домен важкого або легкого ланцюга антитіла, який залучається у зв'язування антитіла з антигеном. Варіабельні домени важкого ланцюга та легкого ланцюга (VH та VL, відповідно) нативного антитіла звичайно мають подібні структури, при цьому кожен домен включає чотири консервативні каркасні ділянки (FR) та три гіперваріабельні ділянки (HVR). (Дивись, наприклад, Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) Єдиного домену VH або VL може бути достатньо для надання антигензв'язувальної специфічності. Крім того, антитіла, які зв'язуються з певним антигеном, можна виділити, застосовуючи домен VH або VL від антитіла, яке зв'язується з цим антигеном, для скринінгу бібліотеки комплементарних доменів VH або VL, відповідно. Дивись, наприклад, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).

Термін "вектор", як застосовується у цьому описі, означає молекулу нуклеїнової кислоти, спроможну породжувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона з'єднана. Термін включає вектор як нуклеїновокислотну структуру, що самореплікується, а також вектор, включений у геном клітини-хазяїна, у яку його було введено. Певні вектори спроможні спрямовувати експресію нуклеїнових кислот, до яких вони оперативно приєднані. Такі вектори називаються у цьому описі "вектори експресії".

II. КОМПОЗИЦІЇ ТА СПОСОБИ

В одному аспекті винахід базується, частково, на антитілах проти C5 та їх застосуванні. У певних варіантах здійснення пропонуються антитіла, які зв'язуються з C5. Антитіла винаходу є корисними, наприклад, для діагностики або лікування хвороби.

A. Приклади антитіл проти C5

В одному аспекті винаходом пропонуються виділені антитіла, які зв'язуються з C5. У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з епітопом у межах бета-ланцюга C5. У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з епітопом у межах домену MG1-MG2 бета-ланцюга C5. У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з епітопом у межах фрагмента, який складається з амінокислот 19-180 бета-ланцюга C5. У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з епітопом у

межах домену MG1 (амінокислоти 20-124 SEQ ID NO: 40 (SEQ ID NO: 41)) бета-ланцюга C5. У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з епітопом у межах фрагмента, який складається з амінокислот 33-124 бета-ланцюга C5 (SEQ ID NO: 40). В іншому варіанті здійснення антитіло не зв'язується з фрагментом, який є коротшим за фрагмент, який складається з амінокислот 33-124 бета-ланцюга C5, наприклад, з фрагментом, який складається з амінокислот 45-124, 52-124, 33-111, 33-108 або 45-111 бета-ланцюга C5 (SEQ ID NO: 40).

В іншому аспекті винаходом пропонуються антитіла проти C5, які демонструють характеристики залежного від pH зв'язування. Як застосовується у цьому описі, вираз "залежне від pH зв'язування" означає, що антитіло демонструє "ослаблене зв'язування з C5 при кислотному pH, порівняно з його зв'язуванням при нейтральному pH" (для цілей цього опису обидва вирази можна застосовувати як взаємозамінні). Наприклад, антитіла "з характеристиками залежного від pH зв'язування" включають антитіла, які зв'язуються з C5 з вищою афінністю при нейтральному pH, ніж при кислотному pH. У певних варіантах здійснення антитіла цього винаходу зв'язуються з C5 з афінністю при нейтральному pH, яка принаймні у 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 або більше разів перебільшує афінність при кислотному pH. У деяких варіантах здійснення антитіла зв'язуються з C5 з вищою афінністю при pH 7,4, ніж при pH 5,8. У подальших варіантах здійснення антитіла цього винаходу зв'язуються з C5 з афінністю при pH 7,4, яка принаймні у 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 або більше разів перебільшує афінність при pH 5,8.

"Афінність" антитіла до C5 для цілей цього опису виражається як KD антитіла. KD антитіла означає рівноважну константу дисоціації взаємодії антитіла з антигеном. Чим вище значення KD для зв'язування антитіла з його антигеном, тим слабкішою є його афінність зв'язування до цього певного антигену. Отже, як застосовується у цьому описі, вираз "вища афінність при нейтральному pH, ніж при кислотному pH" (або еквівалентний вираз "залежне від pH зв'язування") означає, що KD для зв'язування антитіла з C5 при кислотному pH є більшою, ніж KD для зв'язування антитіла з C5 при нейтральному pH. Наприклад, у контексті цього винаходу, вважають, що антитіло зв'язується з C5 з вищою афінністю при нейтральному pH, ніж при кислотному pH, якщо KD зв'язування антитіла з C5 при кислотному pH принаймні у 2 рази перебільшує KD зв'язування антитіла з C5 при нейтральному pH. Таким чином, цей винахід включає антитіла, які зв'язуються з C5 при кислотному pH з KD, яка принаймні у 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 або більше разів перебільшує KD зв'язування антитіла з C5 при нейтральному pH. В іншому варіанті здійснення значення KD антитіла при нейтральному pH може становити 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M або менше. В іншому варіанті здійснення значення KD антитіла при кислотному pH може становити 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M або більше.

У подальших варіантах здійснення вважають, що антитіло зв'язується з C5 з вищою афінністю при нейтральному pH, ніж при кислотному pH, якщо KD зв'язування антитіла з C5 при pH 5,8 принаймні у 2 рази перебільшує KD зв'язування антитіла з C5 при pH 7,4. У деяких варіантах здійснення запропоновані антитіла зв'язуються з C5 при pH 5,8 з KD, яка принаймні у 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 або більше разів перебільшує KD зв'язування антитіла з C5 при pH 7,4. В іншому варіанті здійснення значення KD антитіла при pH 7,4 може становити 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M або менше. В іншому варіанті здійснення значення KD антитіла при pH 5,8 може становити 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M або більше.

Зв'язувальні властивості антитіла стосовно певного антигену можна також виразити як kd антитіла. kd антитіла означає константу швидкості дисоціації антитіла відносно певного антигену, та вона визначається у обернених секундах (тобто секунда$^{-1}$). Підвищення значення kd вказує на слабкіше зв'язування антитіла з його антигеном. Отже, цей винахід включає антитіла, які зв'язуються з C5 з вищим значенням kd при кислотному pH, ніж при нейтральному pH. Цей винахід включає антитіла, які зв'язуються з C5 при кислотному pH з kd, яка принаймні у 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 або більше разів перебільшує kd антитіл, які зв'язуються з C5 при нейтральному pH. В іншому варіанті здійснення значення kd антитіла при нейтральному pH може становити 10^{-2} 1/c, 10^{-3} 1/c, 10^{-4} 1/c, 10^{-5} 1/c, 10^{-6} 1/c або менше. В іншому варіанті здійснення значення kd антитіла при кислотному pH може становити 10^{-3} 1/c, 10^{-2} 1/c, 10^{-1} 1/c або більше. Винахід також включає антитіла, які зв'язуються з C5 з вищим значенням kd при pH 5,8, ніж при pH 7,4. Цей винахід включає антитіла, які зв'язуються з C5 при pH 5,8 з kd, яка принаймні у 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 або більше разів

перебільшує kd антитіл, які зв'язуються з C5 при pH 7,4. В іншому варіанті здійснення значення kd антитіла при pH 7,4 може становити 10^{-2} 1/с, 10^{-3} 1/с, 10^{-4} 1/с, 10^{-5} 1/с, 10^{-6} 1/с або менше. В іншому варіанті здійснення значення kd антитіла при pH 5,8 може становити 10^{-3} 1/с, 10^{-2} 1/с, 10^{-1} 1/с або більше.

У певних випадках "ослаблене зв'язування з C5 при кислотному pH порівняно з його зв'язуванням при нейтральному pH" виражається як відношення значення KD антитіла, яке зв'язується з C5 при кислотному pH, до значення KD антитіла, яке зв'язується з C5 при нейтральному pH (або навпаки). Наприклад, для цілей цього винаходу, можна вважати, що антитіло демонструє "ослаблене зв'язування з C5 при кислотному pH порівняно з його зв'язуванням при нейтральному pH", якщо антитіло демонструє відношення KD в кислотних умовах / KD в нейтральних умовах, яке становить 2 або більше. У певних прикладах варіантів здійснення відношення KD при pH 5,5 / KD при pH 7,4 для антитіла цього винаходу становить 2 або більше. У певних прикладах варіантів здійснення відношення KD в кислотних умовах / KD в нейтральних умовах для антитіла цього винаходу може становити 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 або більше. В іншому варіанті здійснення значення KD антитіла при нейтральному pH може становити 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M або менше. В іншому варіанті здійснення значення KD антитіла при кислотному pH може становити 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M або більше. У подальших випадках, для цілей цього винаходу, можна вважати, що антитіло демонструє "ослаблене зв'язування з C5 при кислотному pH порівняно з його зв'язуванням при нейтральному pH", якщо антитіло демонструє відношення KD при pH 5,8 / KD при pH 7,4, яке становить 2 або більше. У певних прикладах варіантів здійснення відношення KD при pH 5,8 / KD при pH 7,4 для антитіла цього винаходу може становити 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 або більше. В іншому варіанті здійснення значення KD антитіла при pH 7,4 може становити 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M або менше. В іншому варіанті здійснення значення KD антитіла при pH 5,8 може становити 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M або більше.

У певних випадках "ослаблене зв'язування з C5 при кислотному pH порівняно з його зв'язуванням при нейтральному pH" виражається як відношення значення kd антитіла, яке зв'язується з C5 при кислотному pH, до значення kd антитіла, яке зв'язується з C5 при нейтральному pH (або навпаки). Наприклад, для цілей цього винаходу, можна вважати, що антитіло демонструє "ослаблене зв'язування з C5 при кислотному pH порівняно з його зв'язуванням при нейтральному pH", якщо антитіло демонструє відношення kd в кислотних умовах / kd в нейтральних умовах, яке становить 2 або більше. У певних прикладах варіантів здійснення відношення kd при pH 5,5 / kd при pH 7,4 для антитіла цього винаходу становить 2 або більше. У певних прикладах варіантів здійснення відношення kd в кислотних умовах / kd в нейтральних умовах для антитіла цього винаходу може становити 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 або більше. У подальших прикладах варіантів здійснення відношення kd при pH 5,8 / kd при pH 7,4 для антитіла цього винаходу може становити 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 або більше. В іншому варіанті здійснення значення kd антитіла при нейтральному pH може становити 10^{-2} 1/с, 10^{-3} 1/с, 10^{-4} 1/с, 10^{-5} 1/с, 10^{-6} 1/с або менше. У подальшому варіанті здійснення значення kd антитіла при pH 7,4 може становити 10^{-2} 1/с, 10^{-3} 1/с, 10^{-4} 1/с, 10^{-5} 1/с, 10^{-6} 1/с або менше. В іншому варіанті здійснення значення kd антитіла при кислотному pH може становити 10^{-3} 1/с, 10^{-2} 1/с, 10^{-1} 1/с або більше. У подальшому варіанті здійснення значення kd антитіла при pH 5,8 може становити 10^{-3} 1/с, 10^{-2} 1/с, 10^{-1} 1/с або більше.

Як застосовується у цьому описі, вираз "кислотне pH" означає pH від 4,0 до 6,5. Вираз "кислотне pH" включає значення pH за будь-яким з 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 та 6,5. В особливих аспектах "кислотне pH" становить 5,8.

Як застосовується у цьому описі, вираз "нейтральне pH" означає pH від 6,7 до приблизно 10,0. Вираз "нейтральне pH" включає значення pH за будь-яким з 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 та 10,0. В особливих аспектах "нейтральне pH" становить 7,4.

Значення KD та значення kd, як виражено у цьому описі, можна визначити, застосовуючи біосенсор на основі поверхневого плазмонного резонансу, щоб характеризувати взаємодії антитіла-антигену. (Дивись, наприклад, Приклад 3 у цьому описі). Значення KD та значення kd можна визначити при 25 °C або при 37 °C.

У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з епітопом у межах бета-ланцюга C5, який складається з домену MG1(SEQ ID NO: 41). У певних варіантах

здійснення антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з епітопом у межах бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5, який включає принаймні один фрагмент, вибраний з групи, що складається з амінокислот 47-57, 70-76 та 107-110. У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з епітопом у межах фрагмента бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5, який включає принаймні одну амінокислоту, вибрану з групи, що складається з Thr47, Glu48, Ala49, Phe50, Asp51, Ala52, Thr53, Lys57, His70, Val71, His72, Ser74, Glu76, Val107, Ser108, Lys109 та His110. У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з епітопом у межах фрагмента бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5, який включає принаймні одну амінокислоту, вибрану з групи, що складається з Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 та His110. У певних варіантах здійснення зв'язування антитіла проти C5 цього винаходу з мутантом C5 є ослабленим, порівняно з його зв'язуванням з природним C5, де мутантний C5 має принаймні одне амінокислотне заміщення на позиції, вибраній з групи, що складається з Glu48, Asp51, His72 та Lys109. В іншому варіанті здійснення залежне від pH зв'язування антитіла проти C5 цього винаходу з мутантом C5 є ослабленим, порівняно з його залежним від pH зв'язуванням з природним C5, де мутант C5 має принаймні одне амінокислотне заміщення на позиції, вибраній з групи, що складається з His70, His72 та His110. У подальшому варіанті здійснення у мутанті C5 амінокислота на позиції, вибраній з Glu48, Asp51 та Lys109, заміщена аланіном, а амінокислота на позиції, вибраній з His70, His72 та His110, заміщена тирозином.

У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL, вибрану з наступного: (a) VH SEQ ID NO: 1 та VL SEQ ID NO: 11; (b) VH SEQ ID NO: 22 та VL SEQ ID NO: 26; (c) VH SEQ ID NO: 21 та VL SEQ ID NO: 25; (d) VH SEQ ID NO: 5 та VL SEQ ID NO: 15; (e) VH SEQ ID NO: 4 та VL SEQ ID NO: 14; (f) VH SEQ ID NO: 6 та VL SEQ ID NO: 16; (g) VH SEQ ID NO: 2 та VL SEQ ID NO: 12; (h) VH SEQ ID NO: 3 та VL SEQ ID NO: 13; (i) VH SEQ ID NO: 9 та VL SEQ ID NO: 19; (j) VH SEQ ID NO: 7 та VL SEQ ID NO: 17; (k) VH SEQ ID NO: 8 та VL SEQ ID NO: 18; (l) VH SEQ ID NO: 23 та VL SEQ ID NO: 27 та (m) VH SEQ ID NO: 10 та VL SEQ ID NO: 20.

У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з C5 та контактує з амінокислотою Asp51 (D51) SEQ ID NO: 39. У додаткових варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з C5 та контактує з амінокислотою Lys109 (K109) SEQ ID NO: 39. У подальшому варіанті здійснення антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з C5 та контактує з амінокислотою Asp51 (D51) та амінокислотою Lys109 (K109) SEQ ID NO: 39.

У певних варіантах здійснення зв'язування антитіла проти C5 цього винаходу з мутантом C5 є ослабленим, порівняно з його зв'язуванням з природним C5, де мутант C5 має заміщення Glu48Ala (E48A) в SEQ ID NO: 39. В іншому варіанті здійснення залежне від pH зв'язування антитіла проти C5 цього винаходу з мутантом C5 є ослабленим, порівняно з його залежним від pH зв'язуванням з природним C5, де мутант C5 має заміщення Glu48Ala (E48A) в SEQ ID NO: 39.

У подальшому варіанті здійснення антитіло проти C5 зв'язується з білком C5, який складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 39, проте не зв'язується з білком C5, який складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 39 із заміщенням H72Y, де білок C5 та білок C5 із заміщенням H72Y готують та піддають скринінгу в однакових умовах. У подальшому варіанті здійснення антитіло проти C5 зв'язується з білком C5, який складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 39 при pH 7,4, проте не зв'язується з білком C5 із заміщенням H72Y при pH 7,4.

Не обмежуючись якоюсь певною теорією, можна передбачити, що зв'язування антитіла проти C5 з C5 ослаблюється (або майже втрачається), коли амінокислотний залишок в C5 заміщений іншою амінокислотою, що означає, що цей амінокислотний залишок в C5 є вирішальним для взаємодій між антитілом проти C5 та C5 та що антитіло може розпізнавати епітоп навколо цього амінокислотного залишку в C5.

У цьому винаході було визначено, що група антитіл проти C5, які конкурують один з одним або зв'язуються з однаковим епітопом, можуть демонструвати характеристики залежного від pH зв'язування. Серед амінокислот гістидин, значення pKa якого становить приблизно від 6,0 до 6,5, може мати різні стани протонної дисоціації між нейтральним та кислотним pH. Отже, залишок гістидину в C5 спроможний сприяти залежним від pH взаємодіям між антитілом проти C5 та C5. Не обмежуючись якоюсь певною теорією, можна передбачити, що антитіло проти C5 може розпізнавати конформаційну структуру навколо залишку гістидину в C5, яка є варіабельно залежною від pH. Таке передбачення може узгоджуватися з експериментальними результатами, описаними нижче, що залежність від pH антитіла проти C5 знижується (або майже втрачається), коли залишок гістидину в C5 заміщений іншою амінокислотою (тобто антитіло проти C5 з характеристиками залежного від pH зв'язування зв'язується з мутантом C5

із заміщеним гістидином з афінністю, подібною до афінності природного C5 при нейтральному pH, при цьому таке саме антитіло зв'язується з мутантом C5 із заміщеним гістидином з вищою афінністю, порівняно з афінністю при зв'язуванні з природним C5 при кислотному pH).

У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу зв'язується з C5 від більш ніж одного виду тварин. У подальших варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 від людини та тварини, яка не є людиною. У подальших варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 від людини та мавпи (наприклад, яванської макаки (cynomolgus), макаки резус, мартишки, шимпанзе або павіана).

В одному аспекті винаходом пропонуються антитіла проти C5, які інгібують активацію C5. У певних варіантах здійснення пропонуються антитіла проти C5, які попереджають розщеплення C5, внаслідок якого утворюються C5a та C5b, що, у свою чергу, попереджає генерування анафілатоксичної активності, пов'язаної з C5a, а також попереджає зборку мембраноатакуючого комплексу C5b-9 (MAC), пов'язаного з C5b. У певних варіантах здійснення пропонуються антитіла проти C5, які блокують перетворення C5 на C5a та C5b конвертазою C5. У певних варіантах здійснення пропонуються антитіла проти C5, які блокують доступ конвертази C5 до сайту розщеплення в C5. У певних варіантах здійснення пропонуються антитіла проти C5, які блокують гемолітичну активність, яка є наслідком активації C5. У подальших варіантах здійснення антитіла проти C5 цього винаходу інгібують активацію C5 класичним шляхом та/або альтернативним шляхом.

В одному аспекті винаходом пропонуються антитіла проти C5, які інгібують активацію варіанта C5. Термін "варіант C5" означає генетичний варіант C5, який є наслідком генетичної варіації, такої як мутація, поліморфізм або алельна варіація. Генетична варіація може включати делецію, заміщення або вставку одного або більше нуклеотидів. Варіант C5 може мати одну або більше генетичних варіацій у C5. У певних варіантах здійснення варіант C5 має біологічну активність, подібну до біологічної активності природного C5. Такий варіант C5 може мати принаймні одну варіацію, вибрану з групи, що складається з V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N та E1437D. У цьому описі R885H, наприклад, позначає генетичну варіацію, де аргінін на позиції 885 заміщений гістидином. У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу інгібує активацію як природного C5, так і принаймні одного варіанта C5, вибраного з групи, що складається з V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N та E1437D.

В одному аспекті винаходом пропонується антитіло проти C5, яке включає принаймні одну, дві, три, чотири, п'ять або шість гіперваріабельних ділянок (HVR), вибраних з наступного: (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 45-54; (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55-64; (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65-74; (d) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 75-84; (e) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 85-94; та (f) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95-104.

В одному аспекті винаходом пропонується антитіло, яке включає принаймні одну, принаймні дві або усі три послідовності HVR VH, вибрані з наступного: (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 45-54; (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55-64; та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65-74. В одному варіанті здійснення антитіло включає HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65-74. В іншому варіанті здійснення антитіло включає HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65-74, та HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95-104. У подальшому варіанті здійснення антитіло включає HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65-74, HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95-104, та HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55-64. У подальшому варіанті здійснення антитіло включає (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 45-54; (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55-64; та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65-74.

В одному аспекті винаходом пропонується антитіло, яке включає принаймні одну, принаймні дві або усі три послідовності HVR VL, вибрані з наступного: (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 75-84; (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 85-94; та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95-104. В одному варіанті здійснення

антитіло включає (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 75-84; (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 85-94; та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95-104.

В одному аспекті антитіло винаходу включає (a) домен VH, який включає принаймні одну, принаймні дві або усі три послідовності HVR VH, вибрані з наступного: (i) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 45-54, (ii) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55-64, та (iii) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65-74; та (b) домен VL, який включає принаймні одну, принаймні дві або усі три послідовності HVR VL, вибрані з наступного: (i) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 75-84, (ii) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 85-94, та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95-104.

В іншому аспекті винаходом пропонується антитіло, яке включає (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 45-54; (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55-64; (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65-74; (d) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 75-84; (e) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 85-94; та (f) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95-104.

В одному аспекті винаходом пропонується антитіло проти C5, яке включає принаймні одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з наступного: (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126; (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127; (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128; (d) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129; (e) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130; та (f) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131.

В одному аспекті винаходом пропонується антитіло, яке включає принаймні одну, принаймні дві або усі три послідовності HVR VH, вибрані з наступного: (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126; (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127; та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128. В одному варіанті здійснення антитіло включає HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128. В іншому варіанті здійснення антитіло включає HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128, та HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131. У подальшому варіанті здійснення антитіло включає HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128, HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131, та HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127. У подальшому варіанті здійснення антитіло включає (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126; (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127; та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128.

В іншому аспекті винаходом пропонується антитіло, яке включає принаймні одну, принаймні дві або усі три послідовності HVR VL, вибрані з наступного: (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129; (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130; та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131. В одному варіанті здійснення антитіло включає (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129; (b) HVR-L2 яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130; та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131.

В одному аспекті антитіло винаходу включає (a) домен VH, який включає принаймні одну, принаймні дві або усі три послідовності HVR VH, вибрані з наступного: (i) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126, (ii) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127, та (iii) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128; та (b) домен VL, який включає принаймні одну, принаймні дві або усі три послідовності HVR VL,

вибрані з наступного: (i) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129, (ii) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130, та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131.

В іншому аспекті винаходом пропонується антитіло, яке включає (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126; (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127; (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128; (d) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129; (e) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130; та (f) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131.

У певних варіантах здійснення будь-яка одна або більше амінокислот антитіла проти C5, як запропоновано вище, заміщені на наступних позиціях HVR: (a) у HVR-H1 (SEQ ID NO: 45) на позиціях 5 та 6; (b) у HVR-H2 (SEQ ID NO: 55) на позиціях 1, 3, 9, 11, 13 та 15; (c) у HVR-H3 (SEQ ID NO: 65) на позиціях 2, 5, 6, 12 та 13; (d) у HVR-L1 (SEQ ID NO: 75) на позиціях 1, 5, 7 та 9; (e) у HVR-L2 (SEQ ID NO: 85) на позиціях 4, 5 та 6 та (f) у HVR-L3 (SEQ ID NO: 95) на позиціях 2, 4 та 12.

У певних варіантах здійснення заміщення - це консервативні заміщення, як запропоновано у цьому описі. У певних варіантах здійснення будь-яке одне або більше з наступних заміщень можна виконати у будь-якій комбінації: (a) у HVR-H1 (SEQ ID NO: 45) M5V або C6A; (b) у HVR-H2 (SEQ ID NO: 55) C1A або G, Y3F, T9D або E, Y11K або Q, S13D або E, або A15V; (c) у HVR-H3 (SEQ ID NO: 65) G2A, V5Q або D, T6Y, Y12H, або L13Y; (d) у HVR-L1 (SEQ ID NO: 75) Q1R, N5Q або G, G7S, D9K або S; (e) у HVR-L2 (SEQ ID NO: 85) K4T або E, L5T або A6H, A6E або A6Q; (f) у HVR-L3 (SEQ ID NO: 95) C2S, C2N або C2T, F4K; або A12T або A12H.

Усі можливі комбінації вищезгаданих заміщень охоплюються консенсусними послідовностями SEQ ID NO: 126, 127, 128, 129, 130 та 131 для HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 та HVR-L3, відповідно.

У будь-якому з вищезгаданих варіантів здійснення антитіло проти C5 є гуманізованим. В одному варіанті здійснення антитіло проти C5 включає HVR, як у будь-якому з вищезгаданих варіантів здійснення, та також включає акцепторну каркасну ділянку людини, наприклад, каркасну ділянку імуноглобуліну людини або консенсусну каркасну ділянку людини. В іншому варіанті здійснення антитіло проти C5 включає HVR, як у будь-якому з вищезгаданих варіантів здійснення, та також включає VH або VL, які включають послідовність FR, де послідовності FR є наступними. Для варіабельного домену важкого ланцюга FR1 включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 132-134, FR2 включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 135-136, FR3 включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 137-139, FR4 включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 140-141. Для варіабельного домену легкого ланцюга FR1 включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 142-143, FR2 включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 144-145, FR3 включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 146-147, FR4 включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 148.

В іншому аспекті антитіло проти C5 включає послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH), яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за будь-якою з SEQ ID NO: 1-10. У певних варіантах здійснення послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у будь-які з SEQ ID NO: 1-10. У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад, у FR). Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VH у будь-якій з SEQ ID NO: 1-10, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VH включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 45-54, (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55-64, та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65-74.

В іншому аспекті пропонується антитіло проти C5, де антитіло включає послідовність варіабельного домену легкого ланцюга (VL), яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за будь-якою

з SEQ ID NO: 11-20. У певних варіантах здійснення послідовність VL, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у будь-якій з SEQ ID NO: 11-20. У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад, у FR). Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VL у будь-якій з SEQ ID NO: 11-20, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VL включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 75-84, (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 85-94, та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95-104.

В іншому аспекті пропонується антитіло проти C5, де антитіло включає VH, як у будь-якому з варіантів здійснення, запропонованих вище, та VL, як у будь-якому з варіантів здійснення, запропонованих вище. В одному варіанті здійснення антитіло включає послідовності VH та VL у будь-якій з SEQ ID NO: 1-10 та у будь-якій з SEQ ID NO: 11-20, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації таких послідовностей.

В іншому аспекті антитіло проти C5 включає послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH), яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за будь-якою з SEQ ID NO: 10, 106-110. У певних варіантах здійснення послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у будь-якій з SEQ ID NO: 10, 106-110. У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад, у FR). Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VH у будь-якій з SEQ ID NO: 10, 106-110, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VH включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126, (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127, та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128.

В іншому аспекті антитіло проти C5 включає послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за будь-якою з SEQ ID NO: 10, 106-110. У певних варіантах здійснення послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у будь-якій з SEQ ID NO: 10, 106-110. У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад, у FR). Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VH у будь-якій з SEQ ID NO: 10, 106-110, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VH включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126, (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127, та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128.

В іншому аспекті антитіло проти C5 включає послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за SEQ ID NO: 10. У певних варіантах здійснення послідовність VH - це амінокислотна послідовність за SEQ ID NO: 10. У певних варіантах здійснення послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у SEQ ID NO: 10. У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад, у FR).

Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VH у SEQ ID NO: 10, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VH включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 64, та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 74.

В іншому аспекті антитіло проти C5 включає послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за SEQ ID NO: 106. У певних варіантах здійснення послідовність VH - це амінокислотна послідовність за SEQ ID NO: 106. У певних варіантах здійснення послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у SEQ ID NO: 106. У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад, у FR). Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VH у SEQ ID NO: 106, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VH включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 117, (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 118, та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 121.

В іншому аспекті антитіло проти C5 включає послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за SEQ ID NO: 107. У певних варіантах здійснення послідовність VH - це амінокислотна послідовність за SEQ ID NO: 107. У певних варіантах здійснення послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у SEQ ID NO: 107. У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад, у FR). Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VH у SEQ ID NO: 107, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VH включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 117, (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 119, та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 121.

В іншому аспекті антитіло проти C5 включає послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за SEQ ID NO: 108. У певних варіантах здійснення послідовність VH - це амінокислотна послідовність за SEQ ID NO: 108. У певних варіантах здійснення послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у SEQ ID NO: 108. У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад, у FR). Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VH у SEQ ID NO: 108, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VH включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 117, (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 118, та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 121.

В іншому аспекті антитіло проти C5 включає послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за SEQ ID NO: 109. У певних варіантах здійснення послідовність VH - це амінокислотна послідовність за SEQ ID NO: 109. У певних варіантах здійснення послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у SEQ ID NO: 109. У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад,

у FR). Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VH у SEQ ID NO: 109, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VH включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 117, (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 118, та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 121.

В іншому аспекті антитіло проти C5 включає послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за SEQ ID NO: 110. У певних варіантах здійснення послідовність VH - це амінокислотна послідовність за SEQ ID NO: 110. У певних варіантах здійснення послідовність VH, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у SEQ ID NO: 110. У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад, у FR). Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VH у SEQ ID NO: 110, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VH включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 117, (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 120, та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 121.

В іншому аспекті пропонується антитіло проти C5, де антитіло включає послідовність варіабельного домену легкого ланцюга (VL), яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за будь-якою з SEQ ID NO: 20, 111-113. У певних варіантах здійснення послідовність VL, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у будь-якій з SEQ ID NO: 20, 111-113. У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад, у FR). Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VL у будь-якій з SEQ ID NO: 20, 111-113, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VL включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129, (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130, та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131.

В іншому аспекті пропонується антитіло проти C5, де антитіло включає VL, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за SEQ ID NO: 20. У певних варіантах здійснення послідовність VL - це амінокислотна послідовність за SEQ ID NO: 20. У певних варіантах здійснення послідовність VL, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у SEQ ID NO: 20. У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад, у FR). Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VL у SEQ ID NO: 20, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VL включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 84, (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 94, та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 104.

В іншому аспекті пропонується антитіло проти C5, де антитіло включає VL, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за SEQ ID NO: 111. У певних варіантах здійснення послідовність VL - це амінокислотна послідовність за SEQ ID NO: 111. У певних варіантах здійснення послідовність VL, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у SEQ ID NO: 111. У певних варіантах

здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад, у FR). Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VL у SEQ ID NO: 111, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VL включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 122, (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 123, та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 125.

В іншому аспекті пропонується антитіло проти C5, де антитіло включає VL, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за SEQ ID NO: 112. У певних варіантах здійснення послідовність VL - це амінокислотна послідовність за SEQ ID NO: 112. У певних варіантах здійснення послідовність VL, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у SEQ ID NO: 112. У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад, у FR). Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VL у SEQ ID NO: 112, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VL включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 122, (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 123, та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 125.

В іншому аспекті пропонується антитіло проти C5, де антитіло включає VL, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною амінокислотній послідовності за SEQ ID NO: 113. У певних варіантах здійснення послідовність VL - це амінокислотна послідовність за SEQ ID NO: 113. У певних варіантах здійснення послідовність VL, яка є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), вставки або делеції відносно посилальної послідовності, проте антитіло проти C5, яке включає таку послідовність, зберігає спроможність зв'язуватися з C5. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було заміщено, вставлено та/або стерто у SEQ ID NO: 113. У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції відбуваються у ділянках за межами HVR (наприклад, у FR). Довільно, антитіло проти C5 включає послідовність VL у SEQ ID NO: 113, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. В особливому варіанті здійснення VL включає одну, дві або три HVR, вибрані з наступного: (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 122, (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 124, та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 125.

В іншому аспекті пропонується антитіло проти C5, де антитіло включає VH, як описано у будь-якому з варіантів здійснення, запропонованих вище, та VL, як у будь-якому з варіантів здійснення, запропонованих вище. В одному варіанті здійснення антитіло включає послідовності VH та VL у будь-якій з SEQ ID NO: 10, 106-110 та у будь-якій з SEQ ID NO: 20, 111-113, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей. В одному варіанті здійснення антитіло включає послідовність VH за SEQ ID NO: 10 та послідовність VL за SEQ ID NO: 20. В одному варіанті здійснення антитіло включає послідовність VH за SEQ ID NO: 106 та послідовність VL за SEQ ID NO: 111. В одному варіанті здійснення антитіло включає послідовність VH за SEQ ID NO: 107 та послідовність VL за SEQ ID NO: 111. В одному варіанті здійснення антитіло включає послідовність VH за SEQ ID NO: 108 та послідовність VL за SEQ ID NO: 111. В одному варіанті здійснення антитіло включає послідовність VH за SEQ ID NO: 109 та послідовність VL за SEQ ID NO: 111. В одному варіанті здійснення антитіло включає послідовність VH за SEQ ID NO: 109 та послідовність VL за SEQ ID NO: 112. В одному варіанті здійснення антитіло включає послідовність VH за SEQ ID NO: 109 та послідовність VL за SEQ ID NO: 113. В одному варіанті здійснення антитіло включає послідовність VH за SEQ ID NO: 110 та послідовність VL за SEQ ID NO: 113.

В одному аспекті пропонується антитіло проти C5, де антитіло включає послідовність VH, яка містить (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 64, та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 74, та послідовність VL, яка містить (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 84; (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 94; та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 104.

В іншому аспекті пропонується антитіло проти C5, де антитіло включає послідовність VH,

яка містить (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 117, (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 118, та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 121, та послідовність VL, яка містить (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 122; (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 123; та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 125.

В іншому аспекті пропонується антитіло проти C5, де антитіло включає послідовність VH, яка містить (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 117, (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 119, та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 121, та послідовність VL, яка містить (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 122; (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 123; та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 125.

В іншому аспекті пропонується антитіло проти C5, де антитіло включає послідовність VH, яка містить (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 117, (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 118, та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 121, та послідовність VL, яка містить (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 122; (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 124; та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 125.

В іншому аспекті пропонується антитіло проти C5, де антитіло включає послідовність VH, яка містить (a) HVR-H1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 117, (b) HVR-H2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 120, та (c) HVR-H3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 121, та послідовність VL, яка містить (a) HVR-L1, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 122; (b) HVR-L2, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 124; та (c) HVR-L3, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 125.

У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу включає VH, як у будь-якому з варіантів здійснення, запропонованих вище, та константну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 33, 34, 35, 114, 115 та 116. У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу включає VL, як у будь-якому з варіантів здійснення, запропонованих вище, та константну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність за будь-якою з SEQ ID NO: 36, 37 та 38.

В іншому аспекті винаходом пропонується антитіло, яке зв'язується з таким самим епітопом, що і запропоноване у цьому описі антитіло проти C5. Наприклад, у певних варіантах здійснення пропонується антитіло, яке зв'язується з таким самим епітопом, що і антитіло, наведене у Таблиці 2. Як продемонстровано нижче робочими прикладами, усі наведені у Таблиці 2 антитіла проти C5 згруповані в одну й ту ж епітопну групу стосовно C5, та вони демонструють характеристики залежного від pH зв'язування.

У додатковому аспекті винаходом пропонується антитіло, яке зв'язується з таким самим епітопом, що і запропоноване у цьому описі антитіло. У подальшому аспекті винаходом пропонується антитіло, яке зв'язується з таким самим епітопом, що і антитіло, наведене у Таблиці 7 або 8. У певних варіантах здійснення пропонується антитіло, яке зв'язується з епітопом у межах фрагмента, який складається з амінокислот 33-124 бета-ланцюга C5 (SEQ ID NO: 40). У певних варіантах здійснення пропонується антитіло, яке зв'язується з епітопом у межах бета-ланцюга C5 (SEQ ID NO: 40), який включає принаймні один фрагмент, вибраний з групи, що складається з амінокислот 47-57, 70-76 та 107-110. У певних варіантах здійснення пропонується антитіло, яке зв'язується з епітопом у межах фрагмента бета-ланцюга C5 (SEQ ID NO: 40), який включає принаймні одну амінокислоту, вибрану з групи, що складається з Thr47, Glu48, Ala49, Phe50, Asp51, Ala52, Thr53, Lys57, His70, Val71, His72, Ser74, Glu76, Val107, Ser108, Lys109 та His110. В іншому варіанті здійснення епітоп антитіла проти C5 цього винаходу - це конформаційний епітоп.

У подальшому аспекті винаходу антитіло проти C5 згідно з будь-яким з вищезгаданих варіантів здійснення - це моноклональне антитіло, включаючи химерне антитіло, гуманізоване антитіло та антитіло людини. В одному варіанті здійснення антитіло проти C5 - це фрагмент антитіла, наприклад, Fv, Fab, Fab', scFv, діатіло або фрагмент $F(ab')_2$. В іншому варіанті здійснення антитіло - це повнорозмірне антитіло, наприклад, інтактне антитіло IgG1 або IgG4, або інший клас або ізотип антитіла, як визначається у цьому описі.

У подальшому аспекті антитіло проти C5 згідно з будь-яким з вищезгаданих варіантів здійснення може включати будь-які ознаки, окремо або у комбінації, як описано у Розділах 1-7

нижче.

1. Афінність антитіла

У певних варіантах здійснення запропоноване у цьому описі антитіло має константу дисоціації (Kd):

≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 0,1 нМ, ≤ 0,01 нМ або ≤ 0,001 нМ

(наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М).

В одному варіанті здійснення Kd вимірюється за допомогою аналізу зв'язування міченого ізотопом антигену (RIA). В одному варіанті здійснення RIA виконується з версією Fab антитіла, яке представляє інтерес, та його антигеном. Наприклад, афінність зв'язування розчину Fab з антигеном вимірюється за допомогою урівноваження Fab мінімальною концентрацією міченого (^{125}I) антигену у присутності титраційних серій неміченого антигену з наступним захопленням зв'язаного антигену планшетом, на який нанесено антитіло проти Fab (дивись, наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)). Для того, щоб задати умови аналізу на планшети з багатьма комірками MICROTITER (зареєстрована торговельна марка) (Thermo Scientific) нанесли на ніч 5 мкг/мл захоплюючого антитіла проти Fab (Cappel Labs) у 50 мМ карбонаті натрію (pH 9,6), а потім блокували за допомогою 2 % (маса/об'єм) бичачим сироватковим альбуміном у PBS протягом від 2 до 5 годин при кімнатній температурі (приблизно 23 °C). У неадсорбуючому планшеті (Nunc #269620) 100 пМ або 26 пМ [^{125}I]-антигену змішали з серійними розведеннями Fab, що представляє інтерес (наприклад, який узгоджується з оцінкою антитіла проти VEGF, Fab-12, у Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Fab, який представляє інтерес, потім інкубують протягом ночі; однак, інкубація може тривати протягом тривалішого періоду (наприклад, приблизно 65 годин), щоб переконатися, що урівноваження досягнуто. Після цього суміші переносять до захоплюючого планшета для інкубування при кімнатній температурі (наприклад, протягом однієї години). Розчин потім видаляють та планшет промивають вісім разів 0,1 % полісорбатом 20 (TWEEN-20 (зареєстрована торговельна марка)) у PBS. Коли планшети висушено, тоді додають 150 мкл/комірку сцинтилятору (MICROSCINT-20™; Packard) та планшети рахують на гамма-лічильнику TOPCOUNT™ (Packard) протягом 10 хвилин. Концентрації кожного Fab, які дають менш, ніж 20 % від максимального зв'язування або рівно 20 % від нього, вибирають для застосування в аналізі конкурентного зв'язування.

Згідно з іншим варіантом здійснення Kd вимірюється за допомогою аналізу поверхневого плазмонного резонансу BIACORE (зареєстрована торговельна марка). Наприклад, аналіз із застосуванням BIACORE (зареєстрована торговельна марка)-2000 або BIACORE (зареєстрована торговельна марка)-3000 (BIACORE (зареєстрована торговельна марка), Inc., Piscataway, NJ) виконується при 25 °C з чипами іммобілізованого антигену CM5 при приблизно 10 одиницях відповіді (RU). В одному варіанті здійснення біосенсорні чипи з карбоксиметилованого декстрану (CM5, BIACORE (зареєстрована торговельна марка), Inc.) активуються за допомогою N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)-карбодііміду гідрохлориду (EDC) та N-гідроксисукциніміду (NHS) згідно з інструкціями постачальника. Антиген розводять 10 мМ ацетатом натрію, pH 4,8, до 5 мкг/мл (приблизно 0,2 мкМ) перед впорскуванням з витратою потоку 5 мкл/хвилину, щоб досягти приблизно 10 одиниць відповіді (RU) зв'язаного білку. Після впорскування антигену 1 М етаноламін впорскується, щоб блокувати групи, які не вступили в реакцію. Для вимірювання кінетики двократні серійні розведення Fab (від 0,78 до 500 нМ) впорскуються у PBS з поверхнево-активною речовиною (PBST) 0,05 % полісорбату 20 (TWEEN-20™) при 25 °C із витратою потоку приблизно 25 мкл/хвилину. Константи асоціації (k_{on}) та константи дисоціації (k_{off}) розраховуються за допомогою моделі зв'язування один-до-одного Langmuir (BIACORE (зареєстрована торговельна марка) Evaluation Software версія 3.2) шляхом одночасного зіставлення сенсограм асоціації та дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (Kd) розраховують як відношення k_{off}/k_{on}. Дивись, наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Якщо константа асоціації перебільшує 10^6 M^{-1} c^{-1} у вищезгаданому аналізі поверхневого плазмонного резонансу, то константу асоціації можна визначити за допомогою способу гасіння флюоресценції, при якому вимірюється підвищення або зниження інтенсивності флуоресцентного випромінювання (збудження = 295 нм; випромінювання = 340 нм, 16 нм смуга пропускання) при 25 °C 20 нМ антитіла проти антигену (форма Fab) у PBS, pH 7,2, у присутності зростаючих концентрацій антигену, що вимірюється у спектрометрі, такому як спектрофотометр, спроможний вимірювати за методом зупинки потоку (Aviv Instruments), або спектрофотометр SLM-AMINCO™ серії 8000 (ThermoSpectronic) з кюветою, де здійснюється перемішування.

2. Фрагменти антитіл

У певних варіантах здійснення запропоноване у цьому описі антитіло - це фрагмент

антитіла. Фрагменти антитіл включають, проте не обмежуються ними, фрагменти Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv та scFv та інші фрагменти, описані нижче. Для огляду певних фрагментів антитіл дивись Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003). Для огляду фрагментів scFv дивись, наприклад, Pluckthun, у The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); дивись також WO 93/16185 та патенти США №№ 5,571,894 та 5,587,458. Обговорення фрагментів Fab та $F(ab')_2$, які включають залишки епітопу зв'язування з рецептором реутилізації та які мають подовжене напівжиття in vivo, дивись у патенті США № 5,869,046.

Діатіла - це фрагменти антитіл з двома антигензв'язувальними сайтами, які можуть бути двовалентними або біспецифічними. Дивись, наприклад, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); та Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993). Триатіла та тетратіла також описано у Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Однодоменні антитіла - це фрагменти антитіл, які включають увесь або частину варіабельного домену важкого ланцюга або увесь або частину варіабельного домену легкого ланцюга антитіла. У певних варіантах здійснення однодоменне антитіло - це однодоменне антитіло людини (Domantis, Inc., Waltham, MA; дивись, наприклад, патент США № 6,248,516).

Фрагменти антитіл можна отримати за різними способами, включаючи, проте не обмежуючись ними, протеолітичне перетравлення інтактного антитіла, а також продукування рекомбінантними клітинами-хазяїнами (наприклад, E. Coli або фаг), як описується у цьому описі.

3. Химерні та гуманізовані антитіла

У певних варіантах здійснення запропоноване у цьому описі антитіло - це химерне антитіло. Певні химерні антитіла описано, наприклад, у патенті США № 4,816,567; та Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). В одному прикладі химерне антитіло включає варіабельну ділянку, яка не є людською (наприклад, варіабельну ділянку, яка походить від миші, щура, хом'яка, кроля або примата, який не є людиною, такого як мавпа), та константну ділянку людини. У подальшому прикладі химерне антитіло - це антитіло з "перемкнутим класом", у якому клас або підклас початкового антитіла змінено. Химерні антитіла включають їх антигензв'язувальні фрагменти.

У певних варіантах здійснення химерне антитіло - це гуманізоване антитіло. Зазвичай, антитіло, яке не є людським, гуманізують з метою зниження імуногенності для людей, при цьому зберігаються специфічність та афінність початкового антитіла, яке не є людським. Взагалі, гуманізоване антитіло включає один або більше варіабельних доменів, у яких HVR, наприклад, CDR (або їх частини) походять від антитіла, яке не є людським, та FR (або їх частини) походять з послідовностей антитіла людини. Гуманізоване антитіло довільно також включатиме принаймні частину константної ділянки людини. У деяких варіантах здійснення деякі залишки FR у гуманізованому антитілі заміщені відповідними залишками з антитіла, яке не є людським, (наприклад, антитіла, з якого походять залишки HVR), наприклад, щоб відновити або покращити специфічність або афінність антитіла.

Огляд гуманізованих антитіл та способів їх отримання наведено, наприклад, у Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008), та вони далі описуються, наприклад, у Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); патентах США №№ 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321 та 7,087,409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (де описується трансплантація ділянки, що визначає специфічність (SDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (де описується "перекладання" ("resurfacing")); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (де описується "перестановка FR" ("FR shuffling")); та Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) та Klimka et al., Br. J. Cancer. 83:252-260 (2000) (де описується підхід "керованої селекції" ("guided selection") до перемішування FR).

Каркасні ділянки людини, які можна застосовувати для гуманізації, включають, проте не обмежуються ними: каркасні ділянки, які вибираються із застосуванням способу "найкращої відповідності" ("best-fit") (дивись, наприклад, Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)); каркасні ділянки, які походять від консенсусної послідовності антитіл людини певної підгрупи варіабельних ділянок легкого та важкого ланцюга (дивись, наприклад, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); та Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)); зрілі (соматично мутовані) каркасні ділянки людини або каркасні ділянки зародкової лінії людини (дивись, наприклад, Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)); та каркасні ділянки, які отримані внаслідок скринінгу бібліотек FR (дивись, наприклад, Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) та Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).

4. Антитіла людини

У певних варіантах здійснення запропоноване у цьому описі антитіло - це антитіло людини. Антитіла людини можна отримати, застосовуючи різні відомі у цій галузі способи. Антитіла

людини описано взагалі у van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-374 (2001) та Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008).

Антитіла людини можна отримати шляхом введення імуногену трансгенній тварині, яку модифікували, щоб отримати інтактні антитіла людини або інтактні антитіла з варіабельними ділянками людини у відповідь на щеплення антигеном. Такі тварини зазвичай містять усі або частину локусів імуноглобуліну людини, які заміщують локуси ендогенного імуноглобуліну, або які присутні назовні хромосом або довільно інтегровані у хромосоми тварини. У таких трансгенних мишей локуси ендогенного імуноглобуліну зазвичай інактивовані. Огляд способів отримання антитіл людини від трансгенних тварин дивись у Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). Дивись також, наприклад, патенти США №№ 6,075,181 та 6,150,584, які описують технологію XENOMOUSE™; патент США № 5,770,429, який описує технологію HuMab (зареєстрована торговельна марка); патент США № 7,041,870, який описує технологію K-M MOUSE (зареєстрована торговельна марка) та публікацію патентної заявки США № 2007/0061900, яка описує технологію VelociMouse (зареєстрована торговельна марка). Варіабельні ділянки людини від інтактних антитіл, вироблених такими тваринами, можна далі модифікувати, наприклад, шляхом поєднання з відмінною константною ділянкою людини.

Антитіла людини можна також отримати за способами на основі гібридом. Було описано клітинні лінії мієломи людини та гетеромієломи миші-людини для отримання моноклональних антитіл людини. (Дивись, наприклад, Kozbor J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Dekker, Inc., New York, 1987); та Boerner et al., J. Immunol. 147:86 (1991)). Антитіла людини, одержані за допомогою технології з використанням гібридоми В-клітин людини також описано у Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-3562 (2006). Додаткові способи включають способи, описані, наприклад, у патенті США № 7,189,826 (який описує отримання моноклональних антитіл IgM людини від гибридомних клітинних ліній) та Ni, Xiandai Mianyixue 26(4):265-268 (2006) (де описуються гібридоми типу "людина-людина"). Технологію з використанням гібридоми людини (технологія Триоми) (Trioma technology) також описано у Vollmers, Histology and Histopathology 20(3):927-937 (2005) та Vollmers, Methods and Findings в Experimental and Clinical Pharmacology 27(3):185-191 (2005).

Антитіла людини можна також генерувати шляхом виділення послідовностей варіабельного домену клону Fv, вибраних з бібліотек фагового дисплея, які походять від людини. Такі послідовності варіабельного домену можна потім поєднувати з бажаним константним доменом людини. Способи вибору антитіл людини з бібліотек антитіл описано нижче.

5. Антитіла, які походять з бібліотек

Антитіла винаходу можна виділити шляхом скринінгу комбінаторних бібліотек щодо антитіл з бажаною активністю або видами активності. Наприклад, у цій галузі відомі різноманітні способи генерування бібліотек фагового дисплея та скринінгу таких бібліотек щодо антитіл, яким притаманні бажані характеристики зв'язування. Огляд таких способів наведено, наприклад, у Hoogenboom et al., Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001), та вони також описані, наприклад, у McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992); Marks, Meth.Mol. Biol. 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004).

У певних способах фагового дисплея репертуари генів VH та VL окремо клонуються за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції (PCR) та довільно рекомбінуються у фагові бібліотеки, які потім можна піддати скринінгу щодо антигензв'язувального фагу, як описано у Winter et al., Ann. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994). Фаг зазвичай відображує фрагменти антитіла або як одноланцюгові фрагменти Fv (scFv), або як фрагменти Fab. Бібліотеки з імунізованих джерел пропонують високоафінні до імуногену антитіла без необхідності побудови гібридом. Альтернативно, нативний репертуар можна клонувати (наприклад, від людини), щоб отримати єдине джерело антитіл для широкого діапазону як аутоантигенів, так і не-аутоантигенів без будь-якої імунізації, як описано у Griffiths et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). Зрештою, нативні бібліотеки можна також отримати за допомогою синтезу шляхом клонування сегментів нереаранжированого V-гена зі стовбурових клітин із застосуванням праймерів PCR, які містять довільну послідовність, щоб кодувати гіперваріабельні ділянки CDR3, та виконати реаранжирування in vitro, як описано у Hoogenboom, J. Mol. Biol. 227:381-388 (1992). Патентні публікації, у яких описано фагові бібліотеки антитіл людини, включають, наприклад: патент США № 5,750,373 та патентні публікації США №№ 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 та 2009/0002360.

Вважають, що антитіла або фрагменти антитіл, виділені з бібліотек антитіл людини, - це описані у цьому описі антитіла людини або фрагменти антитіл людини.

6. Мультиспецифічні антитіла

У певних варіантах здійснення запропоноване у цьому описі антитіло - це мультиспецифічне антитіло, наприклад, біспецифічне антитіло. Мультиспецифічні антитіла - це моноклональні антитіла, які мають специфічність зв'язування з принаймні двома різними сайтами. У певних варіантах здійснення одна зі специфічностей зв'язування - це специфічність до C5, а інша - специфічність до будь-якого іншого антигену. У певних варіантах здійснення біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися з двома різними епітопами C5. Біспецифічні антитіла можна також застосовувати для локалізації цитотоксичних агентів стосовно клітин, які експресують C5. Біспецифічні антитіла можна отримати як повнорозмірні антитіла або як фрагменти антитіл.

Способи отримання мультиспецифічних антитіл включають, проте не обмежуються ними, рекомбінантну спільну експресію двох імуноглобулінових пар важкого ланцюга та легкого ланцюга, які мають відмінну специфічність (дивись Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983)), WO 93/08829 та Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991)), та конструкцію типу "виступ-у-западину" (дивись, наприклад, патент США № 5,731,168). Мультиспецифічні антитіла можна також отримати шляхом інженерії ефектів електростатичного регулювання для отримання гетеродимерних Fc-молекул антитіла (WO 2009/089004A1); шляхом перехресного зшивання двох або більше антитіл або фрагментів (дивись, наприклад, патент США № 4,676,980 та Brennan et al., Science, 229:81 (1985)); шляхом застосування лейцинової застібки для отримання біспецифічних антитіл (дивись, наприклад, Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)); шляхом застосування технології "діатіла" для отримання фрагментів біспецифічних антитіл (дивись, наприклад, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)); та шляхом застосування одноланцюгових димерів Fv (scFv) (дивись, наприклад, Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994)); та шляхом приготування триспецифічних антитіл, як описано, наприклад, у Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

У цей опис також включено отримані шляхом побудови антитіла з трьома або більше функціональними антигензв'язувальними сайтами, включаючи "антитіла-восьминоги" ("octopus antibodies") (дивись, наприклад, US 2006/0025576).

У цьому описі антитіло або фрагмент також включає "FAb подвійної дії" (Dual Acting FAb) або "DAF", що включає антигензв'язувальний сайт, який зв'язується з C5, а також з іншим, відмінним, антигеном (дивись, наприклад, US 2008/0069820).

7. Варіанти антитіл

У певних варіантах здійснення передбачаються варіанти амінокислотних послідовностей запропонованих у цьому описі антитіл. Наприклад, може бути бажаним покращити афінність зв'язування та/або інші біологічні властивості антитіла. Варіанти амінокислотних послідовностей антитіла можна отримати шляхом здійснення відповідних модифікацій нуклеотидної послідовності, яка кодує антитіло, або шляхом синтезу пептидів. Такі модифікації включають, наприклад, делеції з, та/або вставки в, та/або заміщення залишків у межах амінокислотних послідовностей антитіла. Будь-яку комбінацію делеції, вставки та заміщення можна виконати, щоб отримати кінцеву конструкцію, за умови, що кінцевій конструкції притаманні бажані характеристики, наприклад, зв'язування з антигеном.

a. Варіанти заміщень, вставок та делецій

У певних варіантах здійснення пропонуються варіанти антитіла, які мають одне або більше амінокислотних заміщень. Сайти, які представляють інтерес для замісного мутагенезу, включають HVR та FR. Консервативні заміщення наведено у Таблиці 1 під заголовком "переважні заміщення". Найбільш суттєві зміни запропоновані у Таблиці 1 під заголовком "типові заміщення", та вони описуються нижче з посиланням на класи амінокислотних бічних ланцюгів. Амінокислотні заміщення можна зробити в антитілі, яке представляє інтерес, та продукти можна піддати скринінгу щодо бажаної активності, наприклад, стосовно збереження / покращення зв'язування з антигеном, зниження імуногенності або покращення ADCC або CDC.

Таблиця 1

Початковий залишок	Типові заміщення	Переважні заміщення
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Gln; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser

Таблиця 1

Початковий залишок	Типові заміщення	Переважні заміщення
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Амінокислоти можна згрупувати згідно із загальними властивостями бічних ланцюгів: (1) гідрофобні: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) кислотні: Asp, Glu; (4) лужні: His, Lys, Arg; (5) залишки, які впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro; та (6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміщення будуть передбачати обмін члена одного з цих класів на інший клас.

Один тип варіанта, отриманого внаслідок заміщення, залучає заміщення одного або більше залишків гіперваріабельної ділянки початкового антитіла (наприклад, гуманізованого антитіла або антитіла людини). Взагалі, отриманий (отримані) варіант (варіанти), вибраний (вибрані) для подальшого дослідження, будуть мати модифікації (наприклад, покращення) певних біологічних властивостей (наприклад, підвищення афінності, зниження імуногенності) порівняно з початковим антитілом та/або матиме (матимуть) по суті збережені певні біологічні властивості початкового антитіла. Приклад варіанта, отриманого внаслідок заміщення, - це антитіло зі зрілою афінністю, яке можна отримати зручним способом, наприклад, застосовуючи способи визрівання афінності на основі фагового дисплея, такі як способи, описані у цьому описі. Стисло кажучи, один або більше залишків HVR мутують, та варіанти антитіл відображаються на оболонці фага, та їх піддають скринінгу стосовно певної біологічної активності (наприклад, афінності зв'язування).

Зміни (наприклад, заміщення) можна здійснювати у HVR, наприклад, щоб покращити афінність антитіла. Такі зміни можна здійснювати у варіативних точках ("hotspots") HVR, тобто на залишках, які кодуються кодонами, які зазнають мутації з високою частотою під час процесу соматичного визрівання (дивись, наприклад, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)), та/або на залишках, які контактують з антигеном, при цьому отриманий варіант VH або VL тестується щодо афінності зв'язування. Визрівання афінності внаслідок побудови та повторного відбору з вторинних бібліотек описано, наприклад, у Hoogenboom et al., у Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001). У деяких варіантах здійснення визрівання афінності роблять різноманітні зміни у мінливих генах, вибраних для визрівання, за будь-яким з численних способів (наприклад, PCR, що припускає помилки, переміщування ланцюгів або олігонуклеотид-спрямований мутагенез). Потім створюється вторинна бібліотека. Цю бібліотеку потім піддають скринінгу, щоб ідентифікувати варіанти антитіла з бажаною афінністю. У іншому способі досягнення різноманітності застосовуються HVR-спрямовані підходи, при яких рандомізуються декілька залишків HVR (наприклад, 4-6 залишків одночасно). Залишки HVR, що залучаються у зв'язування з антигеном, можна специфічно ідентифікувати, наприклад, застосовуючи аланін-скануючий мутагенез або моделювання. Зокрема, CDR-H3 та CDR-L3 часто вибирають мішенями.

У певних варіантах здійснення заміщення, вставки або делеції можуть здійснюватися у межах однієї або більше HVR, доки такі зміни суттєво не зменшують спроможність антитіла зв'язуватися з антигеном. Наприклад, консервативні зміни (наприклад, консервативні заміщення, як запропоновано у цьому описі), які суттєво не зменшують афінність зв'язування, можна здійснити у HVR. Такі зміни можуть бути, наприклад, у HVR поза залишків, що контактують з антигеном. У певних варіантах здійснення варіантних послідовностей VH та VL,

запропонованих вище, кожна з HVR або не змінена, або містить не більш ніж одне, два або три амінокислотні заміщення.

Корисний спосіб ідентифікації залишків або ділянок антитіла, які можуть бути мішенями мутагенезу, називається "аланін-скануючий мутагенез", як описано у Cunningham, Science 244:1081-1085 (1989). У цьому способі залишок або група залишків-мішеней (наприклад, заряджених залишків, таких як arg, asp, his, lys та glu) ідентифікують та заміщують нейтральною або негативно зарядженою амінокислотою (наприклад, аланіном або поліаланіном), щоб визначити, чи здійснюється вплив на взаємодію антитіла з антигеном. Подальші заміщення можна зробити на амінокислотних позиціях, демонструючи функціональну чутливість до початкових заміщень. Альтернативно або додатково, за кристалічною структурою комплексу антиген-антитіло ідентифікують точки контакту між антитілом та антигеном. Такі контактні залишки або сусідні залишки можуть бути мішенями, або їх можна видалити як кандидатів на заміщення. Варіанти можна піддати скринінгу, щоб визначити, чи містять вони бажані властивості.

Вставки амінокислотних послідовностей включають аміно- та/або карбоксил-кінцеві злиття, довжина яких змінюється у діапазоні від одного залишку до поліпептидів, які містять сто або більше залишків, а також вставки в послідовності одного або численних амінокислотних залишків. Приклади кінцевих вставок включають антитіло з N-кінцевим метіонільним залишком. Інші варіанти вставок молекули антитіла включають злиття N- або C-кінця антитіла з ферментом (наприклад, ADEPT) або поліпептидом, який подовжує напівжиття антитіла у сироватці.

b. Варіанти глікозилування

У певних варіантах здійснення запропоноване у цьому винаході антитіло змінюють, щоб підвищити або знизити ступінь, до якого антитіло глікозиловане. Додавання сайтів глікозилування до антитіла або їх делецію можна традиційно виконати шляхом зміни амінокислотної послідовності, так щоб утворити або видалити один або більше сайтів глікозилування.

Там, де антитіло включає Fc-ділянку, можна змінити приєднаний до неї вуглевод. Нативні антитіла, що виробляються клітинами ссавців, зазвичай включають розгалужений 2-антенарний олігосахарид, який зазвичай приєднується шляхом N-зшивання з Asn297 домену CH2 Fc-ділянки. Дивись, наприклад, Wright et al., TIBTECH 15:26-32 (1997). Цей олігосахарид може включати різні вуглеводи, наприклад, манозу, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), галактозу та сіалову кислоту, а також фукозу, приєднані до GlcNAc у "стовбурі" структури 2-антенарного олігосахариду. У деяких варіантах здійснення модифікації олігосахариду в антитілі винаходу можна виконати для того, щоб утворити варіанти антитіла з певними покращеними властивостями.

В одному варіанті здійснення пропонуються варіанти антитіла, які мають вуглеводневу структуру, якій бракує фукози, приєднаної (безпосередньо або опосередковано) до Fc-ділянки. Наприклад, кількість фукози у такому антитілі може становити від 1 % до 80 %, від 1 % до 65 %, від 5 % до 65 % або від 20 % до 40 %. Кількість фукози визначається шляхом розрахунку середньої кількості фукози у межах цукрового ланцюга на Asn297 відносно суми усіх глікоструктур (наприклад, складних, гібридних та високоманозних структур), приєднаних до Asn297, що вимірюється за допомогою мас-спектроскопії MALDI-TOF, як описано, наприклад, у WO 2008/077546. Asn297 позначає аспарагіновий залишок, розташований на приблизно позиції 297 у Fc-ділянці (Європейська номенклатура залишків Fc-ділянок); проте, Asn297 може також розташовуватися приблизно на +/- 3 амінокислоти праворуч або ліворуч від позиції 297, тобто, між позиціями 294 та 300, що є наслідком незначних варіацій послідовностей в антитілах. Такі варіанти фукозилування можуть мати покращену функцію ADCC. Дивись, наприклад, патентні публікації США №№ US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Приклади публікацій, пов'язаних з "дефукозилованими" або "фукоза-дефіцієнтними" варіантами антитіла включають: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki et al., J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87:614 (2004). Приклади клітинних ліній, спроможних виробляти дефукозиловані антитіла, включають клітини Lec13 CHO з дефіцитом фукозилування білка (Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); опублікована патентна заявка США 2003/0157108, Presta, L; та WO 2004/056312, Adams et al., особливо у Прикладі 11), та нокаутні клітинні лінії, такі як клітини CHO, що є нокаутними щодо гену альфа-1,6-фукозилтрансферази, FUT8, (дивись, наприклад, Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng.

87:614 (2004); Kanda et al., Biotechnol. Bioeng. 94(4):680-688 (2006); та WO 2003/085107).

Далі пропонуються варіанти антитіл з розділеними навпіл олігосахаридами, наприклад, олігосахаридами, у яких 2-антенарний олігосахарид, приєднаний до Fc-ділянки антитіла, розділяється навпіл N-ацетилглюкозаміном (GlcNAc). Такі варіанти антитіл можуть мати зменшене фукозилування та/або покращену функцію ADCC. Приклади таких варіантів антитіл описано, наприклад, у WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патенті США № 6,602,684 (Umana et al.) та у US 2005/0123546 (Umana et al.). Також пропонуються варіанти антитіл з принаймні одним залишком галактози в олігосахариді, приєднаному до Fc-ділянки. Такі варіанти антитіл можуть мати покращену функцію CDC. Такі варіанти антитіл описано, наприклад, у WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.) та WO 1999/22764 (Raju, S.).

c. Варіанти Fc-ділянок

У певних варіантах здійснення одну або більше амінокислотних модифікацій можна зробити у Fc-ділянці запропонованого у цьому описі антитіла, тим самим генеруючи варіант Fc-ділянки. Варіант Fc-ділянки може включати послідовність Fc-ділянки людини (наприклад, Fc-ділянки IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 людини), яка має амінокислотну модифікацію (наприклад, заміщення) на одній або більше амінокислотних позиціях.

У певних варіантах здійснення винахід передбачає варіант антитіла, якому притаманні деякі, але не всі ефекторні функції, які роблять його бажаним кандидатом для застосування, при якому напівжиття антитіла in vivo є важливим, при цьому певні ефекторні функції (такі як CDC та ADCC) є необов'язковими або шкідливими. Аналізи цитотоксичності in vitro та/або in vivo, можна виконувати, щоб підтвердити зниження/виснаження активності CDC та/або ADCC. Наприклад, аналізи зв'язування з рецептором Fc (FcR) можна виконувати, щоб переконатися, що антитілу бракує зв'язування з Fc-гамма-R (внаслідок цього ймовірна недостатня активність ADCC), але воно зберігає спроможність зв'язування з FcRn. Первинні клітини для опосередковування ADCC, клітини NK, експресують тільки Fc-гамма-RIII, тоді як моноцити експресують Fc-гамма-RI, Fc-гамма-RII та Fc-гамма-RIII. Експресію FcR на кровотворних клітинах узагальнено у Таблиці 3 на сторінці 464 в статті Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Необмежувальні приклади аналізів in vitro для оцінювання активності ADCC молекули, яка представляє інтерес, описано у патенті США № 5,500,362 (дивись, наприклад, Hellstrom et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) та Hellstrom et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); у патенті США № 5,821,337 (дивись Bruggemann et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Альтернативно, можна застосовувати способи нерадіоактивних аналізів (дивись, наприклад, нерадіоактивний аналіз цитотоксичності ACTI™ для проточної цитометрії (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); та нерадіоактивний аналіз цитотоксичності CytoTox 96 (зареєстрована торговельна марка) (Promega, Madison, WI)). Корисні ефекторні клітини для таких аналізів включають мононуклеари периферійної крові (PBMC) та клітини-природні кілери (NK). Альтернативно або додатково, активність ADCC молекули, що представляє інтерес, можна оцінювати in vivo, наприклад, на тваринній моделі, так, як описано у Clynes et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Аналізи зв'язування з C1q можна також здійснювати, щоб підтвердити, що антитіло не спроможне зв'язуватися з C1q, та, як наслідок, йому бракує активності CDC. Дивись, наприклад, ELISA зі зв'язуванням з C1q та C3c у WO 2006/029879 та WO 2005/100402. Щоб оцінити активацію комплементу, можна виконувати аналіз CDC (дивись, наприклад, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg et al., Blood 101:1045-1052 (2003); та Cragg et al., Blood 103:2738-2743 (2004)). Визначення зв'язування з FcRn та кліренсу/напівжиття in vivo можна також виконувати, застосовуючи відомі у цій галузі способи (дивись, наприклад, Petkova et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Антитіла зі зниженою ефекторною функцією включають антитіла із заміщенням одного або більше залишків Fc-ділянки: 238, 265, 269, 270, 297, 327 та 329 (патент США № 6,737,056). Такі мутанти Fc включають мутанти Fc із заміщеннями на двох або більше з наступних амінокислотних позицій: 265, 269, 270, 297 та 327, включаючи, так званий, мутант Fc "DANA" із заміщенням залишків 265 та 297 на аланін (патент США № 7,332,581).

Описані певні варіанти антитіл із покращеним або ослабленим зв'язуванням з FcRn. (Дивись, наприклад, патент США № 6,737,056; WO 2004/056312 та Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)).

У певних варіантах здійснення варіант антитіла включає Fc-ділянку з одним або більше амінокислотними заміщеннями, які покращують ADCC, наприклад, заміщеннями на позиціях 298, 333 та/або 334 Fc-ділянки (Європейська номенклатура залишків).

У деяких варіантах здійснення у Fc-ділянці здійснюють зміни, які призводять до зміни (тобто покращення або ослаблення) зв'язування з C1q та/або комплементзалежної цитотоксичності (CDC), наприклад, як описано у патенті США № 6,194,551, WO 1999/51642 та Idusogie et al., J.

Immunol. 164:4178-4184 (2000).

Антитіла з подовженим напівжиттям та покращеним зв'язуванням з неонатальним рецептором Fc (FcRn), який відповідає за перенесення материнських IgG плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) та Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), описуються у US2005/0014934 (Hinton et al.). Ці антитіла включають Fc-ділянку з одним або більше заміщеннями в ній, які покращують зв'язування Fc-ділянки з FcRn. Такі варіанти Fc включають варіанти із заміщеннями на одному або більше залишках Fc-ділянки: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434, наприклад, із заміщенням залишку 434 Fc-ділянки (патент США № 7,371,826).

Дивись також Duncan, Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5,648,260; патент США № 5,624,821 та WO 1994/29351, які розглядають інші приклади варіантів Fc-ділянки.

d. Варіанти антитіл, сконструйовані з використанням цистеїну

У певних варіантах здійснення може бути бажаним створити антитіла, сконструйовані з використанням цистеїну, наприклад, "thioMAb", у яких один або більше залишків антитіла заміщені залишками цистеїну. В особливих варіантах здійснення заміщення залишків здійснюють на доступних сайтах антитіла. Внаслідок заміщення цих залишків цистеїном реакційноздатні тіолові групи розташовуються на доступних сайтах антитіла, та їх можна застосовувати, щоб з'єднати антитіло з іншими складовими, такими як складові-ліки або складові "лінкер-ліки", щоб утворити імунокон'югат, як описано далі у цьому описі. У певних варіантах здійснення будь-який один або більше з наступних залишків можна замістити цистеїном: V205 (номенклатура Кебота) Fc-ділянки легкого ланцюга; A118 (Європейська номенклатура) Fc-ділянки важкого ланцюга та S400 (Європейська номенклатура) Fc-ділянки важкого ланцюга. Антитіла, сконструйовані з використанням цистеїну, можна отримувати, як описано, наприклад, у патенті США № 7,521,541.

e. Похідні антитіла

У певних варіантах здійснення запропоноване у цьому описі антитіло можна далі модифікувати так, щоб воно містило додаткові небілковоподібні складові, які відомі у цій галузі та легко доступні. Складові, придатні для отримання похідних антитіл, включають, проте не обмежуються ними, водорозчинні полімери. Необмежувальні приклади водорозчинних полімерів включають, проте не обмежуються ними, поліетиленгліколь (ПЕГ), співполімери етиленгліколю/пропіленгліколю, карбоксиметилцелюлозу, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, полі-1,3-діоксолан, полі-1,3,6-триоксан, співполімер етилену і малеїнового ангідриду, поліамінокислоти (або гомополімери, або випадкові співполімери), та декстран або полі(n-вінілпіролідон)поліетиленгліколь, гомополімери пропіленгліколю, співполімери поліпропілен оксиду/етиленоксиду, поліоксиетиловані поліоли (наприклад, гліцерини), полівініловий спирт та їх суміші. Поліетиленгліколь-пропіональдегід може мати переваги під час виробництва завдяки його стійкості у воді. Полімер може мати будь-яку молекулярну масу, та він може бути розгалуженим або нерозгалуженим. Кількість полімерів, приєднаних до антитіла, може різнитися, та, якщо приєднаний більш ніж один полімер, вони можуть бути однаковими або різними молекулами. Зазвичай, кількість та/або тип полімерів, які застосовуються для отримання похідних, можна визначити на основі міркувань стосовно властивостей, які включають, проте не обмежуються ними, особливі властивості або функції антитіла, призначеного для покращення, щоб похідне антитіло застосовувалося під час терапії за визначених умов, тощо.

В іншому варіанті здійснення пропонуються кон'югати антитіла та небілковоподібної складової, яку можна вибірково нагрівати, піддавши опромінюванню. В одному варіанті здійснення небілковоподібна складова - це вуглецева нанотрубка (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605 (2005)). Опромінювання може мати будь-яку довжину хвилі, та воно має, проте не обмежується нею, довжину хвилі, яка не є шкідливою для звичайних клітин, але нагріває небілковоподібну складову до температури, при якій клітини, наближені до небілковоподібної складової антитіла, гинуть.

B. Рекомбінантні способи та композиції

Антитіла можна отримати, застосовуючи рекомбінантні способи та композиції, наприклад, як описано у патенті США № 4,816,567. В одному варіанті здійснення пропонується виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло проти C5, описане у цьому описі. Така нуклеїнова кислота може кодувати амінокислотну послідовність, яка включає VL антитіла, та/або амінокислотну послідовність, яка включає VH антитіла (наприклад, легкий та/або важкий ланцюги антитіла). У подальшому варіанті здійснення пропонуються один або більше векторів (наприклад, вектори експресії), які включають таку нуклеїнову кислоту. У подальшому варіанті здійснення пропонується клітина-хазяїн, яка містить таку нуклеїнову кислоту. В одному такому

варіанті здійснення клітина-хазяїн містить (наприклад, була трансформована ними): (1) вектор, який включає нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, яка включає VL антитіла, та амінокислотну послідовність, яка включає VH антитіла, або (2) перший вектор, який включає нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, яка включає VL антитіла, та другий вектор, який включає нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, яка включає VH антитіла. В одному варіанті здійснення клітина-хазяїн - це еукаріотична клітина, наприклад, клітина яєчника китайського хом'яка (CHO), або лімфоїдна клітина (наприклад, клітина Y0, NS0, Sp20). В одному варіанті здійснення пропонується спосіб отримання антитіла проти C5, де спосіб включає культивування клітини-хазяїна, яка містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло, як запропоновано вище, в умовах, придатних для експресії антитіла, та, довільно, отримання антитіла від клітини-хазяїна (або культурного середовища клітини-хазяїна).

Для рекомбінантного отримання антитіла проти C5 нуклеїнову кислоту, яка кодує це антитіло, наприклад, як описано вище, виділяють та вставляють в один або більше векторів для подальшого клонування та/або експресії у клітині-хазяїні. Таку нуклеїнову кислоту можна легко виділити та секвенувати, застосовуючи традиційні способи (наприклад, застосовуючи олінуклеотидні зонди, які спроможні специфічно зв'язуватися з генами, які кодують важкий та легкий ланцюги антитіла).

Придатні клітини-хазяїни для клонування або експресії векторів, що кодують антитіло, включають прокаріотичні або еукаріотичні клітини, описані у цьому описі. Наприклад, антитіла можна виробляти в бактеріях, особливо, коли глікозилування та ефекторні функції Fc не є потрібними. Стосовно експресії фрагментів антитіла та поліпептидів в бактеріях дивись, наприклад, патенти США №№ 5,648,237, 5,789,199 та 5,840,523. (Дивись також Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, де описується експресія фрагментів антитіла у E. coli). Після експресії антитіло можна виділити з бактеріальноклітинної пасти у вигляді розчинної фракції та далі очистити.

Окрім прокаріотичних, еукаріотичні мікроби, такі як міцеліальні гриби або дріжджі, є придатними хазяїнами для клонування або експресії векторами, що кодують антитіло, та вони включають штами грибів та дріжджів, чиї каскади глікозилування "гуманізували", внаслідок чого отримують антитіло з частковим або повним профілем людського глікозилування. Дивись Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), та Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006).

Придатні клітини-хазяїни для експресії глікозилованого антитіла також походять від багатоклітинних організмів (безхребетних та хребетних). Приклади клітин безхребетних включають клітини рослин та комах. Були ідентифіковані численні бакуловірусні штами, які можна застосовувати у зв'язку з клітинами комах, особливо для трансфекції клітин Spodoptera frugiperda.

Як хазяїнів можна також застосовувати культури рослинних клітин. Дивись, наприклад, патенти США №№ 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 та 6,417,429 (де описано технологію PLANTIBODIES™ для отримання антитіл у трансгенних рослинах).

Як хазяїнів можна також застосовувати клітини хребетних. Наприклад, можна застосовувати клітинні лінії ссавців, які адаптовані до росту у суспензії. Інші приклади корисних ліній клітин-хазяїнів ссавців - це лінія CV1 нирки мавпи, трансформована за допомогою SV40 (COS-7); лінія ембріональної нирки людини (293 або клітини 293, як описано, наприклад, у Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клітини нирки новонародженого хом'яка (BHK); мишачі клітини Сертолі (клітини TM4, як описано, наприклад, у Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клітини нирки мавпи (CV1); клітини нирки африканської зеленої мартишки (VERO-76); клітини карциноми шийки матки людини (HELA); клітини нирки собаки (MDCK); клітини печінки сірого щура (BRL 3A); клітини легеня людини (W138); клітини печінки людини (Hep G2); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562); клітини TRI, як описано, наприклад, у Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982); клітини MRC 5 та клітини FS4. Інші корисні лінії клітин-хазяїнів ссавців включають клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), включаючи клітини DHFR-CHO (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); та мієломні клітинні лінії, такі як Y0, NS0 та Sp2/0. Для огляду певних ліній клітин-хазяїнів ссавців, придатних для виробництва антитіла, дивись, наприклад, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

Поліклональні антитіла переважно утворюються у тваринах внаслідок численних підшкірних (sc) або внутрішньочеревних (ip) ін'єкцій відповідного антигену та ад'юванту. Може бути корисним кон'югувати відповідний антиген з білком, який є імуногенним для того виду тварин, що підлягає імунізації, наприклад, з гемоціаніном лімфи равлика, сироватковим альбуміном, бичачим тироглобуліном або соєвим інгібітором трипсину, застосовуючи при цьому біфункціональний або деривативуючий агент, наприклад, малеімідобензоїл-

сульфосукцинімідний естер (кон'югування через цистеїнові залишки), N-гідроксисукцинімід (через лізинові залишки), глютаральдегід, бурштиновий ангідрид, $SOCl_2$ або $R^1N=C=NR$, де R та R^1 - це різні алкільні групи.

Тварин (зазвичай ссавців, які не є людиною) імунізують проти антигену, імуногенних кон'югатів або похідних шляхом поєднання 100 мкг або 5 мкг білка або кон'югату (для кролів або мишей, відповідно) з 3 об'ємами повного ад'юванту Фрейнда та введення цього розчину шляхом крізьшкірної ін'єкції в численних місцях. За один місяць після цього тварин повторно стимулюють від 1/5 до 1/10 від оригінальної кількості пептиду або кон'югату у повному ад'юванті Фрейнда шляхом підшкірної ін'єкції в численних місцях. За 7-14 днів після цього у тварин беруть кров, а сироватку аналізують щодо титру антитіла. Тварин стимулюють, поки титр не стабілізується. Переважно тварину стимулюють кон'югатом такого ж самого антигену, проте кон'югованого з відмінним білком та/або через інший реагент перехресного зшивання. Кон'югати можна також отримати у культурі рекомбінантних клітин як білки злиття. Крім того, агенти, які сприяють агрегації, такі як галун, придатним чином застосовуються для підсилення імунної реакції.

Моноклональні антитіла отримують з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла, які складають популяцію, є ідентичними за винятком можливих природних мутацій та/або посттрансляційних модифікацій (наприклад, ізомеризації, амідування), які можуть бути присутніми у незначних кількостях. Отже, термін "моноклональне" вказує на такий характер антитіла, коли воно не є сумішшю різних антитіл.

Наприклад, моноклональні антитіла можна отримати, застосовуючи спосіб гібридом, який вперше було описано Kohler et al., Nature 256(5517):495-497 (1975). У способі гібридом мишу або іншу придатну тварину-хазяїна, таку як хом'як, імунізують, як описано вище у цьому описі, щоб утворити лімфоцити, які або виробляють, або спроможні виробляти антитіла, які будуть специфічно зв'язуватися з білком, який застосовується для імунізації. Альтернативно, лімфоцити можна імунізувати in vitro.

Імунізуючий агент буде зазвичай включати антигенний білок або його варіант злиття. Взагалі, застосовуються будь-які з лімфоцитів периферійної крові (PBL), якщо бажаними є клітини, які походять від людини, або застосовуються клітини селезінки або клітини лімфатичних вузлів, якщо бажаними є джерела-ссавці, які не є людьми. Лімфоцити потім зливаються з безсмертними клітинними лініями із застосуванням придатного для злиття агенту, такого як поліетиленгліколь, щоб утворити гібридомну клітину (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986), pp. 59-103).

Безсмертні клітинні лінії - це зазвичай трансформовані клітини ссавців, зокрема, мієломні клітини, які походять від гризунів, великої рогатої худоби та людей. Зазвичай, застосовуються лінії мієломних клітин щурів або мишей. Отримані в такий спосіб гібридомні клітини сіють та вирощують у придатному культуральному середовищі, яке переважно містить одну або більше речовин, які інгібують ріст або виживання незлитих початкових мієломних клітин. Наприклад, якщо початковим мієломним клітинам бракує ферменту гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансферази (HGPRT або HPRT), то культуральне середовище для гібридом зазвичай включатиме гіпоксантин, аміноптерин та тимідин (середовище HAT), які є речовинами, що попереджають ріст клітин з дефіцитом HGPRT.

Переважні безсмертні мієломні клітини - це клітини, які ефективно зливаються, підтримують стійке виробництво антитіла на високому рівні вибраними клітинами, що виробляють антитіло, та які є чутливими до середовища, такого як середовище HAT. Серед них переважними є мієломні лінії мишей, наприклад, які походять від пухлин мишей MOPC-21 та MPC-11, доступних від Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, та клітин SP-2 (та їх похідних, наприклад, X63-Ag8-653), доступних від American Type Culture Collection, Manassas, Virginia USA. Лінії мієломних клітин людини та гетеромієломних клітин миші-людини для виробництва моноклональних антитіл людини також було описано (Kozbor et al. J. Immunol. 133(6):3001-3005 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 51-63 (1987)).

Культуральне середовище, у якому зростають гібридомні клітини, аналізується щодо виробництва моноклональних антитіл проти антигену. Переважно, специфічність зв'язування моноклональних антитіл, вироблених гібридомними клітинами, визначають за допомогою імунопреципітаційного аналізу або за допомогою аналізу зв'язування in vitro, такого як радіоімунологічний аналіз (RIA) або твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA). Такі способи та аналізи відомі у цій галузі. Наприклад, афінність зв'язування можна визначити за допомогою аналізу Скетчарда, див. Munson, Anal. Biochem. 107(1):220-239 (1980).

Після ідентифікації гібридомних клітин, які виробляють антитіла бажаної специфічності,

афінності та/або активності, ці клони можна субклонувати за допомогою способів обмежувального розведення та вирощувати за стандартними способами (Goding, вище). Придатні культуральні середовища для цієї мети включають, наприклад, середовище D-MEM або RPMI-1640. Крім того, гібридомні клітини можна вирощувати in vivo як пухлини у ссавця.

Моноклональні антитіла, які виділяються субклонами, придатним способом виділяють з культурального середовища, рідини асцитів або сироватки за допомогою традиційних способів очищення імуноглобуліну, таких як, наприклад, хроматографія на сефарозі з білком А, хроматографія на гідроксіапатиті, гель-електрофорез, діаліз або афінна хроматографія.

Антитіла можна отримати шляхом імунізації відповідної тварини-хазяїна проти антигену. В одному варіанті здійснення антиген - це поліпептид, який включає повнорозмірний С5. В одному варіанті здійснення антиген - це поліпептид, який включає бета-ланцюг (SEQ ID NO: 40) С5. В одному варіанті здійснення антиген - це поліпептид, який включає домен MG1-MG2 (SEQ ID NO: 43) бета-ланцюга С5. В одному варіанті здійснення антиген - це поліпептид, який включає домен MG1 (SEQ ID NO: 41) бета-ланцюга С5. В одному варіанті здійснення антиген - це поліпептид, який включає ділянку, яка відповідає амінокислотам на позиціях від 19 до 180 бета-ланцюга С5. В одному варіанті здійснення антиген - це поліпептид, який включає ділянку, яка відповідає амінокислотам на позиціях від 33 до 124 бета-ланцюга С5. В одному варіанті здійснення антиген - це поліпептид, який включає принаймні один фрагмент, вибраний з амінокислот 47-57, 70-76 та 107-110 бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) С5. В одному варіанті здійснення антиген - це поліпептид, який включає фрагмент бета-ланцюга С5, який включає принаймні одну амінокислоту, вибрану з групи, що складається з Thr47, Glu48, Ala49, Phe50, Asp51, Ala52, Thr53, Lys57, His70, Val71, His72, Ser74, Glu76, Val107, Ser108, Lys109 та His110. В одному варіанті здійснення антиген - це поліпептид, який включає фрагмент бета-ланцюга С5, який включає принаймні одну амінокислоту, вибрану з групи, що складається з Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 та His110. У цей винахід також включено антитіла, отримані внаслідок імунізації тварини проти антигену. Ці антитіла можуть включати будь-які ознаки, окремо або у комбінації, як описано вище у розділі "Приклади антитіл проти С5".

С. Аналізи

Запропоновані у цьому описі антитіла проти С5 можна ідентифікувати, піддавати скринінгу або характеризувати щодо їх фізичних/хімічних властивостей та/або різних видів біологічної активності за допомогою різноманітних аналізів, відомих у галузі.

1. Аналізи зв'язування та інші аналізи

В одному аспекті антитіло винаходу тестують щодо його активності зв'язування з антигеном, наприклад, за допомогою відомих способів, таких як ELISA, вестерн-блотинг, BIACORE (зареєстрована торговельна марка) тощо.

В іншому аспекті конкурентні аналізи можна застосовувати для того, щоб ідентифікувати антитіло, яке конкурує за зв'язування з С5 з антитілом проти С5, описаним у цьому описі. У певних варіантах здійснення, коли таке конкуруюче антитіло присутнє у надмірній кількості, воно блокує (наприклад, ослаблює) зв'язування посилального антитіла з С5 принаймні на 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % або більше. У деяких випадках зв'язування інгібується принаймні на 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або більше. У певних варіантах здійснення таке конкуруюче антитіло зв'язується з таким самим епітопом (наприклад, лінійним або конформаційним епітопом), який зв'язується антитілом проти С5, описаним у цьому описі (наприклад, антитілом проти С5, наведеним у Таблиці 2). Докладні приклади способів картування епітопу, з яким зв'язується антитіло, наведено у Morris, "Epitope Mapping Protocols, " в Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ) (1996).

У прикладі конкурентного аналізу іммобілізований С5 інкубується у розчині, який містить перше мічене (посилальне) антитіло, яке зв'язується з С5, та друге немічене антитіло, яке тестується щодо його спроможності конкурувати з першим антитілом за зв'язування з С5. Друге антитіло може бути присутнім у надосадовій рідині гібридоми. Як контрольний, іммобілізований С5 інкубується у розчині, який включає перше мічене антитіло, проте не включає друге немічене антитіло. Після інкубування в умовах, які сприяють зв'язуванню першого антитіла з С5, решта незв'язаного антитіла видаляється та вимірюється кількість міток, асоційованих із іммобілізованим С5. Якщо кількість міток, асоційованих з іммобілізованим С5, є суттєво зниженою у випробовуваному зразку порівняно з контрольним зразком, то це вказує на те, що друге антитіло конкурує з першим антитілом за зв'язування з С5. Дивись Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) (1988).

В іншому прикладі конкурентного аналізу застосовується аналіз BIACORE (зареєстрована торговельна марка) для визначення спроможності випробовуваного антитіла проти С5

конкурувати за зв'язування з C5 з другим (посилальним) антитілом проти C5. У подальшому аспекті, у якому прилад BIACORE (зареєстрована торговельна марка) (наприклад, BIACORE (зареєстрована торговельна марка) 3000) застосовується згідно з рекомендаціями виробника, білок C5 захоплюється на чип CM5 BIACORE (зареєстрована торговельна марка) за допомогою стандартного відомого у галузі способу для того, щоб отримати поверхню з нанесеним C5. Зазвичай 200-800 резонансних одиниць C5 зчіплюються з чипом (це така кількість, яка дозволяє легко вимірювати рівні зв'язування, але яку можна легко насичити при концентраціях випробовуваного антитіла, що застосовуються). Два антитіла (тобто, випробовуване та посилальне антитіла), які слід оцінювати стосовно їх спроможності конкурувати одне з одним, змішують при молярному співвідношенні 1:1 сайтів зв'язування у придатному буфері, щоб утворити суміш, що тестується. Коли концентрації розраховують на основі сайту зв'язування, тоді вважають, що молекулярна маса випробовуваного або посилального антитіла є загальною молекулярною масою відповідного антитіла, поділеною на кількість сайтів зв'язування з C5 на антитілі. Концентрація кожного антитіла (тобто, випробовуваного та посилального антитіл) у суміші, що тестується, мусить бути достатньо високою, щоб легко насичити сайти зв'язування для цього антитіла на молекулах C5, захоплених на чипі BIACORE (зареєстрована торговельна марка). Випробовуване та посилальне антитіла у суміші мають однакову молярну концентрацію (на основі зв'язування), яка зазвичай становить від 1,00 до 1,5 мікромоль (на основі сайту зв'язування). Також готують окремі розчини, які містять тільки випробовуване антитіло та тільки посилальне антитіло. Випробовуване антитіло та посилальне антитіло у цих розчинах мають бути в однаковому буфері та мати однакову концентрацію та однакові умови з умовами для суміші, що тестується. Суміш, яка тестується та яка містить випробовуване антитіло та посилальне антитіло, пропускається над чипом BIACORE (зареєстрована торговельна марка) з нанесеним C5, та реєструється загальна кількість зв'язувань. Чип потім обробляють таким чином, щоб видалити зв'язане випробовуване антитіло або посилальне антитіло, не пошкоджуючи при цьому зв'язаний з чипом C5. Зазвичай, це виконується шляхом обробки чипа 30 мМ HCl протягом 60 секунд. Розчин тільки випробовуваного антитіла потім пропускають над поверхнею з нанесеним C5 та реєструють кількість зв'язувань. Чип знов обробляють так, щоб видалити усе зв'язане антитіло, не пошкоджуючи при цьому зв'язаний з чипом C5. Розчин тільки посилального антитіла потім пропускають над поверхнею з нанесеним C5 та реєструють кількість зв'язувань. Потім розраховують максимальне теоретичне зв'язування суміші випробовуваного антитіла та посилального антитіла, та це є сумою зв'язування кожного антитіла (тобто, випробовуваного та посилального), коли їх окремо пропускають над поверхнею з C5. Якщо дійсно зареєстроване зв'язування суміші є меншим, ніж цей теоретичний максимум, то випробовуване антитіло та посилальне антитіло конкурують один з одним за зв'язування з C5. Отже, взагалі, конкуруюче випробовуване антитіло проти C5 - це антитіло, яке буде зв'язуватися з C5 у вищеописаному аналізі блокування BIACORE (зареєстрована торговельна марка), так що під час аналізу та у присутності посилального антитіла проти C5 зареєстроване зв'язування становить від 80 % до 0,1 % (наприклад, між 80 % > до 4 %) від максимального теоретичного зв'язування, специфічно від 75 % до 0,1 % (наприклад, 75 % - 4 %) від максимального теоретичного зв'язування та більш специфічно від 70 % до 0,1 % (наприклад, 70 % - 4 %) від максимального теоретичного зв'язування (як визначається вище) випробовуваного антитіла та посилального антитіла у комбінації.

У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL, вибрану з антитіла CFA0341 та CFA0330. У деяких варіантах здійснення антитіло проти C5 конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, вибраним з: CFA0538, CFA0501, CFA0599, CFA0307, CFA0366, CFA0675 та CFA0672. У деяких варіантах здійснення антитіло проти C5 конкурує за зв'язування з C5 з антитілом CFA0329. У деяких варіантах здійснення антитіло проти C5 конкурує за зв'язування з C5 з антитілом CFA0666.

У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL антитіла CFA0305 або 305LO5.

У подальших варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 з вищою афінністю при нейтральному pH, ніж при кислотному pH. У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL, вибрану з: CFA0538, CFA0501, CFA0599, CFA0307, CFA0366, CFA0675 та CFA0672. У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 конкурує за зв'язування з C5 з антитілом CFA0666. У подальших варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 з вищою афінністю при pH 7,4, ніж при pH 5,8.

У подальших варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 з вищою афінністю при нейтральному pH, ніж при кислотному pH. У певних варіантах здійснення антитіло проти C5

цього винаходу конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL антитіла CFA0305 або 305LO5. У подальших варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 з вищою афінністю при pH 7,4, ніж при pH 5,8.

У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL, вибрану з VH за SEQ ID NO: 22 та VL за SEQ ID NO: 26, або VH за SEQ ID NO: 21 та VL за SEQ ID NO: 25. У деяких варіантах здійснення антитіло проти C5 конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL, вибрану з: (a) VH за SEQ ID NO: 5 та VL за SEQ ID NO: 15; (b) VH за SEQ ID NO: 4 та VL за SEQ ID NO: 14; (c) VH за SEQ ID NO: 6 та VL за SEQ ID NO: 16; (d) VH за SEQ ID NO: 2 та VL за SEQ ID NO: 12; (e) VH за SEQ ID NO: 3 та VL за SEQ ID NO: 13; (f) VH за SEQ ID NO: 1 та VL за SEQ ID NO: 11; (g) VH за SEQ ID NO: 9 та VL за SEQ ID NO: 19; (h) VH за SEQ ID NO: 7 та VL за SEQ ID NO: 17; та (i) VH за SEQ ID NO: 8 та VL за SEQ ID NO: 18. У деяких варіантах здійснення антитіло проти C5 конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає VH за SEQ ID NO: 23 та VL за SEQ ID NO: 27. У деяких варіантах здійснення антитіло проти C5 конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає VH за SEQ ID NO: 7 та VL за SEQ ID NO: 17.

У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL, вибрану з: (a) VH за SEQ ID NO: 1 та VL за SEQ ID NO: 11; (b) VH за SEQ ID NO: 22 та VL за SEQ ID NO: 26; (c) VH за SEQ ID NO: 21 та VL за SEQ ID NO: 25; (d) VH за SEQ ID NO: 5 та VL за SEQ ID NO: 15; (e) VH за SEQ ID NO: 4 та VL за SEQ ID NO: 14; (f) VH за SEQ ID NO: 6 та VL за SEQ ID NO: 16; (g) VH за SEQ ID NO: 2 та VL за SEQ ID NO: 12; (h) VH за SEQ ID NO: 3 та VL за SEQ ID NO: 13; (i) VH за SEQ ID NO: 9 та VL за SEQ ID NO: 19; (j) VH за SEQ ID NO: 7 та VL за SEQ ID NO: 17; (k) VH за SEQ ID NO: 8 та VL за SEQ ID NO: 18; (l) VH за SEQ ID NO: 23 та VL за SEQ ID NO: 27; та (m) VH за SEQ ID NO: 10 та VL за SEQ ID NO: 20.

У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL, вибрану з (a) VH за SEQ ID NO: 22 та VL за SEQ ID NO: 26; (b) VH за SEQ ID NO: 21 та VL за SEQ ID NO: 25; (c) VH за SEQ ID NO: 5 та VL за SEQ ID NO: 15; (d) VH за SEQ ID NO: 4 та VL за SEQ ID NO: 14; (e) VH за SEQ ID NO: 6 та VL за SEQ ID NO: 16; (f) VH за SEQ ID NO: 2 та VL за SEQ ID NO: 12; (g) VH за SEQ ID NO: 3 та VL за SEQ ID NO: 13; (h) VH за SEQ ID NO: 9 та VL за SEQ ID NO: 19; (i) VH за SEQ ID NO: 7 та VL за SEQ ID NO: 17; (j) VH за SEQ ID NO: 8 та VL за SEQ ID NO: 18; (k) VH за SEQ ID NO: 23 та VL за SEQ ID NO: 27.

У певних варіантах здійснення антитіло проти C5 цього винаходу конкурує за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL, вибрану з VH за SEQ ID NO: 1 та VL за SEQ ID NO: 11, або VH за SEQ ID NO: 10 та VL за SEQ ID NO: 20.

У подальших варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 з вищою афінністю при нейтральному pH, ніж при кислотному pH. У деяких варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 з вищою афінністю при нейтральному pH, ніж при кислотному pH, та конкурує за зав'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL, вибрану з: (a) VH за SEQ ID NO: 1 та VL за SEQ ID NO: 11; (b) VH за SEQ ID NO: 5 та VL за SEQ ID NO: 15; (c) VH за SEQ ID NO: 4 та VL за SEQ ID NO: 14; (d) VH за SEQ ID NO: 6 та VL за SEQ ID NO: 16; (e) VH за SEQ ID NO: 2 та VL за SEQ ID NO: 12; (f) VH за SEQ ID NO: 3 та VL за SEQ ID NO: 13; (g) VH за SEQ ID NO: 9 та VL за SEQ ID NO: 19; (h) VH за SEQ ID NO: 7 та VL за SEQ ID NO: 17; (i) VH за SEQ ID NO: 8 та VL за SEQ ID NO: 18; та (j) VH за SEQ ID NO: 10 та VL за SEQ ID NO: 20. У подальших варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 з вищою афінністю при pH 7,4, ніж при pH 5,8.

У деяких варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 з вищою афінністю при нейтральному pH, ніж при кислотному pH, та конкурує за зав'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL, вибрану з: (a) VH за SEQ ID NO: 5 та VL за SEQ ID NO: 15; (b) VH за SEQ ID NO: 4 та VL за SEQ ID NO: 14; (c) VH за SEQ ID NO: 6 та VL за SEQ ID NO: 16; (d) VH за SEQ ID NO: 2 та VL за SEQ ID NO: 12; (e) VH за SEQ ID NO: 3 та VL за SEQ ID NO: 13; (f) VH за SEQ ID NO: 1 та VL за SEQ ID NO: 11; (g) VH за SEQ ID NO: 9 та VL за SEQ ID NO: 19; (h) VH за SEQ ID NO: 7 та VL за SEQ ID NO: 17; та (i) VH за SEQ ID NO: 8 та VL за SEQ ID NO: 18. У подальших варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 з вищою афінністю при pH 7,4, ніж при pH 5,8.

У деяких варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 з вищою афінністю при нейтральному pH, ніж при кислотному pH, та конкурує за зав'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH та VL, вибрану з VH за SEQ ID NO: 1 та VL за SEQ ID NO: 11 або VH за SEQ ID NO: 10 та VL за SEQ ID NO: 20. У подальших варіантах здійснення антитіло проти C5 зв'язується з C5 з вищою афінністю при pH 7,4, ніж при pH 5,8.

У певних варіантах здійснення, чи зв'язується антитіло проти C5 цього винаходу з певним епітопом, можна визначити наступним чином: точкові мутанти C5, у яких амінокислота (за виключенням аланіну) в C5 заміщена аланіном, експресують у клітинах 293, та зв'язування антитіла проти C5 з мутантами C5 тестують за допомогою ELISA, вестерн-блотингу або BIACORE (зареєстрована торговельна марка); де суттєве ослаблення або припинення зв'язування антитіла проти C5 з мутантом C5 відносно його зв'язування з природним C5 вказує на те, що антитіло проти C5 зв'язується з епітопом, який включає таку амінокислоту в C5. У певних варіантах здійснення амінокислота в C5, яку слід замістити аланіном, вибирається з групи, що складається з Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 та His110 бета-ланцюга C5 (SEQ ID NO: 40). У подальших варіантах здійснення амінокислота в C5, яку слід замістити аланіном, - це Asp51 або Lys109 бета-ланцюга C5 (SEQ ID NO: 40).

В іншому варіанті здійснення, чи зв'язується антитіло проти C5 з характеристиками залежного від pH зв'язування з певним епітопом, можна визначити наступним чином: точкові мутанти C5, у яких залишок гістидину в C5 заміщений іншою амінокислотою (наприклад, тирозином), експресують у клітинах 293, та зв'язування антитіла проти C5 з мутантами C5 тестують за допомогою ELISA, вестерн-блотингу або BIACORE (зареєстрована торговельна марка); де суттєве ослаблення зв'язування антитіла проти C5 з природним C5 при кислотному pH відносно його зв'язування з мутантом C5 при кислотному pH, вказує на те, що антитіло проти C5 зв'язується з епітопом, який включає такий залишок гістидину в C5. У подальших варіантах здійснення зв'язування антитіла проти C5 з природним C5 при нейтральному pH суттєво не ослаблюється відносно його зв'язування з мутантом C5 при нейтральному pH. У певних варіантах здійснення залишок гістидину в C5, який слід замістити іншою амінокислотою, вибирається з групи, що складається з His70, His72 та His110 бета-ланцюга C5 (SEQ ID NO: 40). У подальшому варіанті здійснення залишок гістидину His70 заміщений тирозином.

2. Аналізи активності

В одному аспекті пропонуються аналізи для ідентифікації антитіл проти C5, які мають біологічну активність. Біологічна активність може включати, наприклад, інгібування активності C5, перешкоджання розщепленню C5, внаслідок якого утворюються C5a та C5b, блокування доступу конвертази C5 до сайту розщеплення в C5, блокування гемолітичної активності, спричиненої активацією C5, тощо. Також пропонуються антитіла, які мають таку біологічну активність in vivo та/або in vitro.

У певних варіантах здійснення антитіло винаходу тестується щодо такої біологічної активності.

У певних варіантах здійснення, чи інгібує випробовуване антитіло розщеплення C5 на C5a та C5b, визначається за способами, описаними у, наприклад, Isenman et al., J Immunol. 124(1):326-331 (1980). В іншому варіанті здійснення це визначається за способами специфічного виявлення розщеплених білків C5a та/або C5b, наприклад, за допомогою ELISA або вестерн-блотингу. Там, де знижена кількість продукту розщеплення C5 (тобто C5a та/або C5b) виявляється у присутності випробовуваного антитіла (або внаслідок контакту з ним), випробовуване антитіло ідентифікують як антитіло, яке спроможне інгібувати розщеплення C5. У певних варіантах здійснення концентрацію та/або фізіологічну активність C5a можна виміряти за допомогою способів, наприклад, хемотаксичних аналізів, RIA або ELISA (Дивись, наприклад, Ward and Zvaifler J. Clin. Invest. 50(3):606-616 (1971)).

У певних варіантах здійснення, чи блокує випробовуване антитіло доступ конвертази C5 до C5, визначається за способами виявлення білкових взаємодій між конвертазою C5 та C5, наприклад, ELISA або BIACORE (зареєстрована торговельна марка). Там, де взаємодії ослаблюються у присутності випробовуваного антитіла (або внаслідок контакту з ним), випробовуване антитіло ідентифікується як антитіло, яке спроможне блокувати доступ конвертази C5 до C5.

У певних варіантах здійснення активність C5 можна виміряти як функцію його спроможності лізувати клітини у рідинах організму суб'єкта. Спроможність C5 лізувати клітини або зменшувати їх кількість можна виміряти за добре відомими у галузі способами, наприклад, за допомогою традиційного гемолітичного аналізу, такого як аналіз гемолізу, описаний Kabat and Mayer (eds), Experimental Immunochemistry, 2nd Edition, 135-240, Springfield, IL, CC Thomas (1961), сторінки 135-139, за допомогою традиційного варіанта такого аналізу, такого як спосіб гемолізу еритроцитів курчати, як описано у, наприклад, Hillmen et al., N. Engl. J. Med. 350(6): 552-559 (2004). У певних варіантах здійснення активність C5 або її інгібування кількісно визначається за допомогою аналізу CH50eq. Аналіз CH50eq - це спосіб вимірювання загальної класичної активності комплементу у сироватці. Цей тест - це аналіз лізису, при якому застосовуються сенсибілізовані антитілом еритроцити як активатор класичного шляху комплементу та різні

розведення випробовуваної сироватки для визначення кількості, необхідної для того, щоб відбувся 50 % лізис (CH50). Відсоткове відношення гемолізу можна визначити, наприклад, застосовуючи спектрофотометр. Аналіз CH50eq дозволяє виконувати непряме вимірювання утворення комплексу кінцевого комплементу (TCC), оскільки самі по собі TCC безпосередньо відповідають за гемоліз, який вимірюється. Інгібування активації C5 можна також виявити та/або виміряти, застосовуючи способи, які описані далі, та приклади яких наведено у робочих прикладах. Застосовуючи аналізи цих або інших придатних типів, можна зробити скринінг антитіл-кандидатів, спроможних інгібувати активацію C5. У певних варіантах здійснення інгібування активації C5 включає зниження активації C5 в аналізі принаймні на 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % або 40 % або більше порівняно з ефектом негативного контрольного антитіла в подібних умовах. У деяких варіантах здійснення це стосується інгібування активації C5 принаймні на 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % або 95 % або більше.

D. Імунокон'югати

У деяких варіантах здійснення винаходом пропонуються імунокон'югати, які включають розкрите у цьому описі антитіло проти C5, кон'юговане з одним або більше цитотоксичними агентами, такими як хіміотерапевтичні агенти або ліки, агенти інгібування росту, токсини (наприклад, білкові токсини, ферментативно активні токсини бактеріального, грибкового, рослинного або тваринного походження, або їх фрагменти), або радіоактивні ізотопи.

В одному варіанті здійснення імунокон'югат - це кон'югат антитіло-ліки (ADC), у якому антитіло кон'юговано з одним або більше ліками, включаючи, проте не обмежуючись ними, майтанзиноїд (дивись патенти США №№ 5,208,020, 5,416,064 та європейський патент EP 0 425 235 B1); ауристатин, такий як складові DE та DF лікарського засобу монометилауристатин (MMAE та MMAF) (дивись патенти США №№ 5,635,483, та 5,780,588, та 7,498,298); доластатин; каліхеміцин або його похідне (дивись патенти США №№ 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 та 5,877,296; Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); та Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)); антрациклін, такий як дауноміцин або доксорубіцин (дивись Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002); та патент США № 6,630,579); метотрексат; віндезин; таксан, такий як доцетаксел, паклітаксел, ларотаксел, тезетаксел та ортатаксел; трихотецен; та CC1065.

В іншому варіанті здійснення імунокон'югат включає антитіло, як описано у цьому описі, кон'юговане з ферментативно активним токсином або його фрагментом, включаючи, проте не обмежуючись ними, A-ланцюг дифтерії, незв'язувальні активні фрагменти токсину дифтерії, A-ланцюг екзотоксину (з Pseudomonas aeruginosa), A-ланцюг рицину, A-ланцюг абрину, A-ланцюг модецину, альфа-сарцин, білки Aleurites fordii, діантинові білки, білки Phytolaca Americana (PAPI, PAPII та PAP-S), інгібітор, одержаний з гіркого огірка (momordica charantia), курцин, кротин, інгібітор, одержаний з мильнянки лікарської (sapaonaria officinalis), гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин та трикотецен.

В іншому варіанті здійснення імунокон'югат включає описане у цьому описі антитіло, кон'юговане з радіоактивним атомом, щоб утворити радіоактивний кон'югат. Для виробництва радіоактивних кон'югатів доступні різноманітні радіоактивні ізотопи. Приклади включають At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} та радіоактивні ізотопи Lu. Коли радіоактивний кон'югат застосовується для виявлення, тоді він може включати радіоактивний атом для сцинтиграфічних досліджень, наприклад tc99m або I123, або спін-мітку для здійснення ядерної магнітно-резонансної (NMR) томографії (також відома як магнітно-резонансна томографія, mri), таку як йод-123 ("iodine-123 again"), йод 131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, магній та залізо.

Кон'югати антитіла та цитотоксичного агента можна отримати, застосовуючи різноманітні агенти зшивання біфункціональних білків, такі як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеімідометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), іміноТіолан (IT), біфункціональні похідні імідоестерів (такі як диметиладипімідат HCl), активні естери (такі як дисукцинімідил суберат), альдегіди (такі як глютаральдегід), біс-азидні сполуки (такі як біс(р-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(р-діазонійбензоїл)-етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол 2,6-діізоціанат) та біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, рициновий імунотоксин можна отримати, як описано у Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Мічена вуглецем-14 1-ізотіоціанатобензил-3-метилдіетилен-триамінопентаоцтова кислота (MX-DTPA) - це приклад хелатуючого агента для кон'югування

радіоактивного нуклеотиду з антитілом. Дивись WO94/11026. Лінкер може бути "лінкером, який може розщеплюватися" та який сприяє вивільненню цитотоксичних ліків у клітині. Наприклад, можна застосовувати нестійкий до кислоти лінкер, чутливий до пептидази лінкер, нестійкий до світла лінкер, диметиловий лінкер або лінкер, що містить дисульфід (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); патент США № 5,208,020).

Імунокон'югати або кон'югати антитіло-ліки (ADC), описані у цьому описі, які особливо передбачаються, проте не обмежуються ними, - це такі кон'югати, які отримані за допомогою реагентів перехресного зшивання, які включають, проте не обмежуються ними, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, та сульфо-SMPB, та SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон)бензоат), які є комерційно доступними (наприклад, від Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

E. Способи та композиції для діагностики та виявлення

У певних варіантах здійснення будь-яке запропоноване у цьому описі антитіло проти C5 є корисним для виявлення присутності C5 у біологічному зразку. Термін "виявлення", як застосовується у цьому описі, охоплює кількісне та якісне виявлення. У певних варіантах здійснення біологічний зразок включає клітину або тканину, таку як сироватка, суцільна кров, плазма, зразок біопсії, зразок тканини, клітинна суспензія, слина, мокротиння, ротова рідина, спинномозкова рідина, навколоплідна рідина, асцитна рідина, молоко, молозиво, виділення молочної залози, лімфа, сеча, піт, слізна рідина, шлунковий сік, синовіальна рідина, рідина черевної порожнини, внутрішньоочна рідина та слиз.

В одному варіанті здійснення пропонується антитіло проти C5 для застосування у способі діагностики або виявлення. У подальшому аспекті пропонується спосіб виявлення присутності C5 у біологічному зразку. У певних варіантах здійснення спосіб включає контактування біологічного зразка з антитілом проти C5, як описано у цьому описі, в умовах, які дозволяють антитілу проти C5 зв'язуватися з C5, та виявлення того, чи утворився комплекс між антитілом проти C5 та C5. Такий спосіб може бути способом in vitro або in vivo. В одному варіанті здійснення антитіло проти C5 застосовується для вибору суб'єктів, придатних для лікування антитілом проти C5, наприклад коли C5 є біологічним маркером вибору пацієнтів.

У певних варіантах здійснення пропонуються мічені антитіла проти C5. Мітки включають, проте не обмежуються ними, мітки або складові, які виявляються безпосередньо (такі як флуоресцентні, хромофорні мітки, непроникні для електронів мітки, хемілюмінесцентні та радіоактивні мітки), а також складові, такі як ферменти або ліганди; які виявляються опосередковано, наприклад, через ферментативну реакцію або молекулярну взаємодію. Приклади міток включають, проте не обмежуються ними, радіоізотопи ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H та ^{131}I, флуорофори, такі як хелати рідкоземельних елементів або флюоресцеїн та його похідні, родамін та його похідні, данзил, умбеліферон, люциферази, наприклад, люцифераза світлячка та бактеріальна люцифераза (патент США № 4,737,456), люциферин, 2,3-дигідрофталазиндіони, пероксидазу хріну (HRP), лужну фосфатазу, бета-галактозидазу, глюкоамілазу, лізоцим, оксидази сахаридів, наприклад, оксидазу глюкози, оксидазу галактози та глюкоза-6-фосфат дегідрогеназу, гетероциклічні оксидази, такі як уриказа та ксантиноксидаза, зчеплені з ферментом, який застосовує пероксид водню, щоб окислити початковий барвник, такий як HRP, лактопероксидаза або мікропероксидаза, біотин/авідин, спін-мітки, бактеріофагові мітки, стійкі вільні радикали та їм подібне.

F. Фармацевтичні склади

Фармацевтичні склади антитіла проти C5, як описано у цьому описі, отримують шляхом змішування такого антитіла, яке має бажаний ступінь чистоти, з одним або більше довільними фармацевтично прийнятними носіями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), у формі ліофілізованих складів або водних розчинів. Фармацевтично прийнятні носії є зазвичай нетоксичними для реципієнтів у дозах та концентраціях, що застосовуються, та вони включають, проте не обмежуються ними: буфери, такі як фосфат, цитрат та інші органічні кислоти; антиоксиданти, які включають аскорбінову кислоту та метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензиламонію хлорид; гексаметонію хлорид; бензалконію хлорид; бензетонію хлорид; фенол; бутил або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол та m-крезол); низькомолекулярні (менш ніж приблизно 10 залишків) поліпептиди; білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глютамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, такі як EDTA; цукри, такі як цукроза, маніт, трегалоза або сорбіт; противоіони, що утворюють сіль, такі як натрій; металеві

комплекси (наприклад, комплекси Zn-білок) та/або неіонні поверхнево-активні речовини, такі як поліетиленгліколь (PEG). У цьому описі приклади фармацевтично прийнятних носіїв також включають агенти диспергування ліків у міжклітинному просторі, такі як розчинні нейтрально-активні гіалуронідазні глікопротеїни (sHASEGP), наприклад, розчинні гіалуронідазні глікопротеїни людини PH-20, такі як rHuPH20 (HYLENEX (зареєстрована торговельна марка), Baxter International, Inc.). Певні приклади sHASEGP та способи їх застосування, включаючи rHuPH20, описано у публікаціях США №№ 2005/0260186 та 2006/0104968. В одному аспекті sHASEGP поєднується з однією або більше додатковими глікозамінгліканазами, такими як хондроітинази.

Приклади ліофілізованих фармацевтичних складів антитіла описано у патенті США № 6,267,958. Водні фармацевтичні склади антитіла включають склади, описані у патенті США № 6,171,586 та WO 2006/044908, при цьому фармацевтичні склади з останнього посилання включають гістидин-ацетатний буфер.

У цьому описі фармацевтичний склад може також містити більш ніж один активний інгредієнт, якщо це необхідно для особливого показання лікування, переважно ті інгредієнти, що мають сумісні види активності, які не впливають шкідливо один на одного. Такі активні інгредієнти придатним чином присутні у комбінації у кількості, яка є ефективною для призначеної мети.

Активні інгредієнти можуть бути поміщені у мікрокапсули, отримані, наприклад, за способами коацервації або шляхом міжфазної полімеризації, наприклад, мікрокапсули з гідроксиметилцелюлози або желатинові мікрокапсули та мікрокапсули з полі-(метил-метакрилату), відповідно, у колоїдні системи доставки ліків (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікрокульки, мікроемульсії, наночастинки та нанокапсули) або у макроемульсії. Такі способи описано у Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Можна отримати препарати з уповільненим вивільненням. Придатні приклади препаратів з уповільненим вивільненням включають напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло, при цьому матриці - це сформовані вироби, наприклад, плівки або мікрокапсули.

Фармацевтичні склади, які призначені для введення in vivo, є зазвичай стерильними. Стерильності можна легко досягти, наприклад, за допомогою фільтрування крізь стерильні фільтраційні мембрани.

G. Терапевтичні способи та композиції

Запропоноване у цьому описі антитіло проти C5 можна застосовувати у терапевтичних способах.

В одному аспекті пропонується антитіло проти C5 для застосування як лікарського засобу. У подальших аспектах пропонується антитіло проти C5 для застосування під час лікування хвороби. У певних варіантах здійснення пропонується антитіло проти C5 для застосування у способі лікування. У певних варіантах здійснення винаходом пропонується антитіло проти C5 для застосування у способі лікування індивідуума, який має хворобу, при цьому спосіб включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла проти C5. В одному такому варіанті здійснення спосіб також включає введення індивідууму ефективної кількості принаймні одного додаткового терапевтичного агента. "Індивідуум" згідно з будь-яким з вищезгаданих варіантів здійснення - це переважно людина.

У подальшому аспекті винаходом пропонується застосування антитіла проти C5 у виробництві або приготуванні лікарського засобу. В одному варіанті здійснення лікарський засіб призначений для лікування хвороби. У подальшому варіанті здійснення лікарський засіб призначений для застосування у способі лікування хвороби, при цьому спосіб включає введення індивідууму, який має хворобу, ефективної кількості лікарського засобу. В одному такому варіанті здійснення спосіб також включає введення індивідууму ефективної кількості принаймні одного додаткового терапевтичного агента. "Індивідуум" згідно з будь-яким з вищезгаданих варіантів здійснення - це переважно людина.

У подальшому аспекті винаходом пропонується спосіб лікування хвороби. В одному варіанті здійснення спосіб включає введення індивідууму, який має хворобу, ефективної кількості антитіла проти C5. В одному такому варіанті здійснення спосіб також включає введення індивідууму ефективної кількості принаймні одного додаткового терапевтичного агента. "Індивідуум" згідно з будь-яким з вищезгаданих варіантів здійснення - це переважно людина.

У подальшому аспекті винаходом пропонуються фармацевтичні склади, які включають будь-які запропоновані у цьому описі антитіла проти C5, наприклад, для застосування у будь-якому із вищезгаданих терапевтичних способів. В одному варіанті здійснення фармацевтичний склад містить будь-яке із запропонованих у цьому описі антитіл проти C5 та фармацевтично

прийнятний носій. В іншому варіанті здійснення фармацевтичний склад включає будь-яке із запропонованих у цьому описі антитіл проти C5 та принаймні один додатковий терапевтичний агент.

У подальшому аспекті фармацевтичний склад призначений для лікування хвороби. В одному варіанті здійснення фармацевтичний склад вводиться індивідууму, який має хворобу. "Індивідуум" згідно з будь-яким з вищезгаданих варіантів здійснення - це переважно людина.

У подальшому аспекті винаходом пропонуються способи отримання лікарського засобу або фармацевтичного складу, при цьому способи включають змішування будь-якого із запропонованих у цьому описі антитіл проти C5 з фармацевтично прийнятним носієм, наприклад, для застосування у будь-якому з вищезгаданих терапевтичних способів. В одному варіанті здійснення способи приготування лікарського засобу або фармацевтичного складу також включають додавання принаймні одного додаткового терапевтичного агента до лікарського засобу або фармацевтичного складу.

Антитіла цього винаходу можна застосовувати або окремо, або у комбінації з іншими агентами під час лікування. Наприклад, антитіло цього винаходу можна вводити разом з принаймні одним додатковим терапевтичним агентом.

Такі зазначені вище комбіновані терапії охоплюють комбіноване введення (де два або більше терапевтичних агентів включено в один і той же або окремий фармацевтичний склад) та окреме введення, у випадку якого введення антитіла цього винаходу може відбуватися до, одночасно та/або після введення додаткового терапевтичного агента або агентів. В одному варіанті здійснення введення антитіла проти C5 та введення додаткового терапевтичного агента здійснюють одне відносно іншого у межах приблизно одного місяця, або у межах приблизно одного, двох або трьох тижнів, або у межах приблизно одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти або шести днів.

Антитіло винаходу (та будь-який додатковий терапевтичний агент) можна вводити за будь-якими придатними способами, включаючи парентеральне, внутрішньолегеневе та внутрішньоносове введення та, якщо це бажано для місцевого лікування, введення в осередок ураження. Парентеральні інфузії включають внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревне або підшкірне введення. Введення дози можна здійснювати за будь-яким придатним способом, наприклад шляхом ін'єкцій, таких як внутрішньовенні або підшкірні ін'єкції, частково залежно від того, чи введення є короткочасним або постійним. У цьому описі передбачаються різні схеми введення препаратів, включаючи, проте не обмежуючись ними, одноразове або багаторазові введення через проміжки часу, болюсне введення або імпульсну інфузію.

Антитіла цього винаходу будуть включатися до фармацевтичного складу, дозуватися та вводитися за способом, що відповідає гарній медичній практиці. Фактори, які слід враховувати у цьому контексті, включають специфічний розлад, який слід лікувати, специфічного ссавця, якого слід лікувати, клінічну умову окремого пацієнта, причину розладу, ділянку доставки агента, спосіб введення, режим введення та інші фактори, відомі медикам-практикам. Антитіло не обов'язково, проте довільно входить до фармацевтичного складу з одним або більше агентами, які у цей час застосовуються для попередження або лікування даного розладу. Ефективна кількість таких інших агентів залежить від кількості антитіла, присутнього у фармацевтичному складі, типу розладу або лікування та інших факторів, що обговорюються вище. Їх зазвичай застосовують у таких самих дозах та зі способами введення, описаними у цьому описі, або приблизно від 1 % до 99 % від доз, описаних у цьому описі, або будь-якій дозі або за допомогою будь-якого способу введення, які емпірично/клінічно визначено як доречні.

Для профілактики або лікування хвороби відповідне дозування антитіла цього винаходу (коли воно застосовується окремо або у комбінації з одним або більше додатковими терапевтичними агентами) залежатиме від типу хвороби, яку слід лікувати, типу антитіла, суворості та протікання хвороби, а також від того, чи вводиться антитіло з метою профілактики або з метою лікування, попередньої терапії, історії хвороби пацієнта, та реакції на антитіло, та розсудливості лікаря, який веде пацієнта. Антитіло придатним чином вводиться пацієнтові одноразово або протягом сеансів лікування. Залежно від типу та суворості хвороби приблизно від 1 мкг/кг до 15 мг/кг (наприклад, 0,1 мг/кг - 10 мг/кг) антитіла може бути початковою дозою-кандидатом для введення пацієнтові, чи то, наприклад, шляхом одного або більше окремих введень, чи то шляхом тривалої інфузії. Одна звичайна щоденна доза може становити діапазон від приблизно 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більше, що залежить від вищезгаданих факторів. Для багаторазового введення протягом декількох днів або тривалішого часу, залежно від стану, лікування буде зазвичай продовжуватися, доки не відбудеться бажане пригнічення симптомів хвороби. Один приклад дозування антитіла буде становити діапазон від приблизно 0,05 мг/кг до

приблизно 10 мг/кг. Отже, одну або більше доз, які становлять приблизно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг або 10 мг/кг (або будь-яку їх комбінацію), можна вводити пацієнтові. Такі дози можна вводити с проміжками, наприклад, кожного тижня або кожні три тижні (наприклад так, щоб пацієнт отримував від приблизно двох до приблизно двадцяти або, наприклад, шести доз антитіла). Можна вводити початкову вищу ударну дозу з наступними однією або більше нижчими дозами. Прогрес цього лікування легко відстежується за допомогою традиційних способів та аналізів.

Зрозуміло, що будь-які з вищезгаданих складів та терапевтичних способів можна здійснювати, застосовуючи імунокон'югат винаходу замість або на додаток до антитіла проти C5.

H. Промислові вироби

В одному аспекті винаходом пропонується промисловий виріб, що містить матеріали, корисні для лікування, профілактики та/або діагностики розладів, описаних вище. Промисловий виріб включає контейнер та етикетку або листок-вкладиш, що або супроводжує контейнер, або розміщений на контейнері. Придатні контейнери включають, наприклад, пляшки, ампули, шприци, мішечки з розчином для внутрішньовенних ін'єкцій тощо. Контейнери можна виготовити з різних матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнер містить композицію, яка самостійно або у комбінації з іншою композицією є ефективною для лікування, профілактики або діагностики стану, та він може мати засіб для стерильного доступу (наприклад, контейнер може бути мішечком з розчином для внутрішньовенних ін'єкцій або ампулою, які мають пробку, що проколюється голкою для підшкірної ін'єкції). Принаймні один активний агент у композиції - це антитіло винаходу. На етикетці або у листку-вкладиші вказується, що композиція застосовується для лікування стану за вибором. Крім того, промисловий виріб може містити (a) перший контейнер з композицією, яка міститься в ньому, де композиція містить антитіло винаходу; та (b) другий контейнер з композицією, що міститься в ньому, де композиція містить додатковий цитотоксичний агент або терапевтичний агент іншої дії. Промисловий виріб у цьому варіанті здійснення винаходу може також включати листок-вкладиш, на якому вказується, що композиції можна застосовувати для лікування певного стану. Альтернативно або додатково промисловий виріб може також включати другий (або третій) контейнер, який містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWFI), сольовий розчин з фосфатним буфером, розчин Рінгера та розчин декстрози. Він може також включати інші матеріали, бажані з комерційної та споживчої точки зору, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки та шприци.

Зрозуміло, що будь-які з вищезгаданих промислових виробів можуть включати імунокон'югат винаходу замість або на додаток до антитіла проти C5.

Приклади

Далі описуються приклади способів та композицій винаходу. Зрозуміло, що на практиці можна застосовувати інші різноманітні варіанти здійснення, беручи до уваги запропонований вище загальний опис.

Приклад 1

Отримання C5

Експресія та очищення рекомбінантного C5 людини та яванської макаки

Рекомбінантний C5 людини (NCBI GenBank номер доступу: NP_001726.2, SEQ ID NO: 39) транзієнтно експресували, застосовуючи клітинну лінію FreeStyle293-F (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, США). Кондиційовані середовища, які експресують C5 людини, розвели рівним об'ємом води milliQ, потім нанесли на аніонообмінну колонку Q-sepharose FF або Q-sepharose HP (GE healthcare, Uppsala, Швеція) з наступним елююванням в градієнті NaCl. Зібрали фракції, що містили C5 людини, а потім довели концентрацію солі NaCl та pH до 80 мМ та pH 6,4, відповідно. Отриманий зразок нанесли на катіонообмінну колонку SP-sepharose HP (GE healthcare, Uppsala, Швеція) та елюювали в градієнті NaCl. Фракції, що містили C5 людини, зібрали та завантажили у керамічну гідроксіапатітову колонку CHT (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, США). Елюат C5 людини потім завантажили до гель-фільтраційної колонки Superdex 200 (GE healthcare, Uppsala, Швеція). Фракції, що містили C5 людини, об'єднали та зберігали при -150 °C.

Експресію та очищення рекомбінантного C5 яванської макаки (NCBI GenBank номер доступу: XP_005580972, SEQ ID NO: 44) виконували за таким самим способом, як і людський аналог.

1.2. Очищення C5 яванської макаки (cynoC5) від плазми

Зразок плазми яванської макаки нанесли на агарозу SSL7 (Invivogen, San Diego, CA, США) з наступним елююванням 100 мМ ацетатом натрію, pH 3,5. Фракції, що містили cynoC5, одразу

нейтралізували та піддали обробці на колонці HP з Білком A (GE healthcare, Uppsala, Швеція), а потім агарозою з Пептидом M (Invivogen, San Diego, CA, США). Потік крізь фракцію потім спрямували до гель-фільтраційної колонки Superdex 200 (GE healthcare, Uppsala, Швеція). Фракції, що містили cynoC5, об'єднали та зберігали при -80 °C.

Приклад 2

Отримання антитіл проти C5

2.1. Скринінг антитіл

Антитіла проти C5 отримали, вибрали на проаналізували наступним чином.

Кролів NZW (новозеландських білих кролів) віком від 12 до 16 тижнів імунізували C5 людини та/або C5 мавпи (50-100 мкг/дозу/кроля) шляхом інтрадермальної ін'єкції. Цю дозу повторювали 4-5 разів протягом 2 місяців. За один тиждень після кінцевої імунізації у імунізованих кролів узяли селезінку та кров. Антиген-специфічні B-клітини забарвили міченим антигеном, сортували за допомогою клітинного сортера FCM (FACS aria III, BD) та помістили у планшети з 96 комірками із щільністю по одній клітині/комірку разом з 25000 клітинами/комірку клітин EL4 (European Collection of Cell Cultures) та активованим кондиційованим середовищем кролячих T-клітин, розведеним у 20 разів, а потім культивували протягом 7-12 днів. Клітини EL4 обробляли мітоміцином C (Sigma, Cat No. M4287) протягом 2 годин та заздалегідь промили тричі. Активоване кондиційоване середовище кролячих T-клітин отримали шляхом культивування кролячих тимоцитів у RPMI-1640, що містило фітогемаглютинін-M (Roche, Cat No. 1 1082132-001), форбол 12-міристат 13-ацетат (Sigma, Cat No. P1585) та 2 % FBS. Після культивування культуральні надосадові рідини B-клітин зібрали для подальшого аналізу, а дебрис зберігали при низьких температурах.

Аналіз ELISA застосовували для тестування специфічності антитіл у культуральній надосадовій рідині B-клітин. Шар стрептавідину (GeneScript, Cat No. Z02043) нанесли на MAXISorp з 384 комірками (Nunc, Cat No. 164688) при 50 нМ у PBS на 1 годину при кімнатній температурі. Планшети потім блокували Blocking One (Nacalai Tesque, Cat No. 03953-95), розведеним у 5 разів. C5 людини або мавпи мітили NHS-PEG4-Biotin (PIERCE, Cat No. 21329) та додали до заблокованих планшетів ELISA, інкубували протягом 1 години та промили. Культуральні надосадові рідини B-клітин додали до планшетів ELISA, інкубували протягом 1 години та промили. Зв'язування виявили за допомогою кон'югату пероксидази хріну з антитілом кози проти кролячого IgG (BETHYL, Cat No. A120-111P), а потім додали ABTS (KPL, Cat No. 50-66-06).

Аналіз ELISA застосовували для оцінки залежного від pH зв'язування антитіл проти C5.

Fc козла проти IgG кроля (BETHYL, Cat No. A120-111A), розведену до 1 мкг/мл PBS(-) додали до MAXISorp з 384 комірками (Nunc, Cat No. 164688), інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі та блокували Blocking One (Nacalai Tesque, Cat No. 03953-95), розведеним у 5 разів. Після інкубування планшети промили та додали культуральні надосадові рідини B-клітин. Планшети інкубували протягом 1 години, промили, та додали 500 пМ біотинілованого C5 людини або мавпи, та інкубували протягом 1 години. Після інкубування планшети промили та інкубували з буфером MES pH 5,8 (20 мМ MES, 150 мМ NaCl та 1,2 мМ $CaCl_2$) або буфером MES pH 5,8 (20 мМ MES, 150 мМ NaCl та 1 мМ EDTA) протягом 1 години при кімнатній температурі. Після інкубування виявили зв'язування біотинілованого C5 за допомогою кон'югату пероксидаза хріну-стрептавідин (Thermo Scientific, Cat No. 21132), а потім додали ABTS (KPL, Cat No. 50-66-06).

Систему Octet RED384 (Pall Life Sciences) застосовували для оцінювання афінності та залежного від pH зв'язування антитіл проти C5. Антитіла, секретовані у культуральну надосадову рідину B-клітин, завантажили на кінчик біосенсора Білка A (Pall Life Sciences) та занурили у 50 нМ C5 людини або мавпи у буфері MES pH 7,4, щоб проаналізувати кінетику зв'язування. Кінетику дисоціації проаналізували як у буфері MES pH 7,4, так і у буфері MES pH 5,8.

Загалом 41439 ліній B-клітин піддали скринінгу щодо афінності та залежного від pH зв'язування з C5 людини або мавпи та 677 ліній відібрали та позначили CFA0001-0677. РНК вибраних ліній очистили від дебрису кріоконсервованих клітин, застосовуючи набори ZR-96 Quick-RNA (ZYMO RESEARCH, Cat No. R1053). ДНК, яка кодує варіабельні ділянки важкого ланцюга антитіла, у вибраних лініях ампліфікували за допомогою PCR зі зворотною транскрипцією та рекомбінували за допомогою ДНК, яка кодує константну ділянку важкого ланцюга F760G4 (SEQ ID NO: 33) або F939G4 (SEQ ID NO: 34). ДНК, яка кодує варіабельні ділянки легкого ланцюга антитіла, ампліфікували за допомогою PCR зі зворотною транскрипцією та рекомбінували за допомогою ДНК, яка кодує константну ділянку легкого ланцюга k0MTC (SEQ ID NO: 36). Окремо синтезували гени важкого та легкого ланцюгів

існуючого гуманізованого антитіла проти C5, екулізумабу (EcuH-G2G4, SEQ ID NO: 29 та EcuL-k0, SEQ ID NO: 30). ДНК, яка кодує VH (EcuH, SEQ ID NO: 31), злили у рамці з ДНК, яка кодує модифіковану CH IgG4 людини (F760G4, SEQ ID NO: 33), а дНК, яка кодує VL (EcuL, SEQ ID NO: 32), злили у рамці з ДНК, яка кодує константну ділянку легкого ланцюга k0 (SEQ ID NO: 37). Кожну зі злитих кодувальних послідовностей також клонували у вектор експресії. Антитіла експресували у клітинах FreeStyle™ 293-F (Invitrogen) та очищали від культуральної надосадової рідини, щоб оцінити функціональну активність. Нейтралізуючу активність антитіл оцінювали шляхом тестування інгібування активності комплементу, застосовуючи аналіз лізису ліпосом, як описано у Прикладі 5.1.

2.2. Аналіз зв'язування епітопу за допомогою сендвіч-ELISA

Для подальшого аналізу вибрали антитіла проти C5 з високою афінністю, залежністю від pH та нейтралізуючою активністю. Аналіз сендвіч-ELISA застосовували, щоб згрупувати вибрані антитіла у різні епітопні групи, що зв'язуються з однаковими епітопами білка C5 або епітопами, що перекриваються. Немічені захоплені антитіла розвели PBS (-) до 1 мкг/мл та додали до планшетів MAXISorp з 384 комірками (Nunc, Cat No. 164688). Планшети інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі та блокували розведеним у 5 разів Blocking One (Nacalai Tesque, Cat No. 03953-95). Планшети інкубували протягом 1 години, промили, додали 2 нМ C5 людини та інкубували протягом 1 години. Після інкубування планшети промили та додали мічені антитіла для виявлення (1 мкг/мл, біотиніловані за допомогою NHS-PEG4-Biotin). Після інкубування протягом 1 години виявили зв'язування біотинілованого антитіла за допомогою кон'югату пероксидаза хріну-стрептавідин (Thermo Scientific, Cat No. 21132), після чого додали ABTS (KPL, Cat No. 50-66-06).

Усі антитіла проти C5 застосовували як антитіло захоплення і як антитіло виявлення та їх спарували у повному обсязі. Як показано на Фігурі 1, антитіла, що взаємно конкурують, згрупували у 7 епітопних груп: CFA0668, CFA0334 та CFA0319 згрупували в епітопну групу A, CFA0647, CFA0589, CFA0341, CFA0639, CFA0635, CFA0330 та CFA0318 згрупували в епітопну групу B, CFA0538, CFA0501, CFA0599, CFA0307, CFA0366, CFA0305, CFA0675, CFA0666 та CFA0672 згрупували в епітопну групу C, екулізумаб та CFA0322 згрупували в епітопну групу D, CFA0329 згрупували в епітопну групу E, CFA0359 та CFA0217 згрупували в епітопну групу F, та CFA0579, CFA0328 та CFA0272 згрупували в епітопну групу G. Фігура 1 демонструє зв'язування з епітопом деяких химерних антитіл проти C5. Послідовності VH та VL антитіл проти C5, згрупованих в епітопну групу C, наведено у Таблиці 2.

Таблиця 2

Антитіла проти C5, згруповані в епітоп C

	SEQ ID NO:							
Антитіло	VH	VL	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
CFA0305	1	11	45	55	65	75	85	95
CFA0307	2	12	46	56	66	76	86	96
CFA0366	3	13	47	57	67	77	87	97
CFA0501	4	14	48	58	68	78	88	98
CFA0538	5	15	49	59	69	79	89	99
CFA0599	6	16	50	60	70	80	90	100
CFA0666	7	17	51	61	71	81	91	101
CFA0672	8	18	52	62	72	82	92	102
CFA0675	9	19	53	63	73	83	93	103

2.3. Гуманізація та оптимізація

Гуманізацію варіабельної ділянки деяких антитіл проти C5 виконували з метою зниження можливої імуногенності антитіл. Гіперваріабельні ділянки (CDR) антитіла кроля проти C5 трансплантували на гомологічні каркасні ділянки (FR) антитіла людини, застосовуючи традиційний для трансплантації CDR підхід (Nature 321:522-525 (1986)). Гени, які кодують гуманізовані VH та VL, синтезували та поєднали з модифікованою CH людини (SG402, SEQ ID NO: 35) та CL IgG людини (SK1, SEQ ID NO: 38), відповідно, та кожну з комбінованих послідовностей клонували у вектор експресії.

Ряд мутацій та комбінацій мутацій досліджували, щоб ідентифікувати мутації та комбінації мутацій, які покращили властивості зв'язування деяких антитіл-лідерів. Численні мутації потім зробили в гуманізованих варіабельних ділянках, щоб підвищити афінність зв'язування з C5 при

нейтральному pH або щоб знизити афінність зв'язування з C5 при кислотному pH. Внаслідок цього з CFA0305 отримали один з оптимізованих варіантів, 305LO5 (VH, SEQ ID NO: 10; VL, SEQ ID NO: 20; HVR-H1, SEQ ID NO: 54; HVR-H2, SEQ ID NO: 64; HVR-H3, SEQ ID NO: 74; HVR-L1, SEQ ID NO: 84; HVR-L2, SEQ ID NO: 94; та HVR-L3, SEQ ID NO: 104).

Антитіла експресували у клітинах HEK293, спільно трансфектованих сумішшю векторів експресії важкого та легкого ланцюгів, та очистили Білком A.

Приклад 3

Характеристика зв'язування антитіл проти C5

3.1. Експресія та очищення рекомбінантних антитіл

Рекомбінантні антитіла транзієнтно експресували, застосовуючи клітинну лінію FreeStyle293-F (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, США). Очищення від кондиційованих середовищ, які експресують антитіла, виконували, застосовуючи традиційний спосіб з використанням Білка A. За необхідністю, далі виконували гель-фільтрацію.

3.2. Оцінка залежності від pH

Кінетичні параметри антитіл проти C5 стосовно рекомбінантного C5 людини оцінювали при pH 7,4 та pH 5,8 при 37 °C, застосовуючи прилад T200 BIACORE (зареєстрована торговельна марка) (GE Healthcare). ProA/G (Pierce) іммобілізували на сенсорному чипі CM4, застосовуючи набір амінного зчеплення (GE Healthcare) згідно з рекомендованими налаштуваннями GE Healthcare. Антитіла та аналіти розвели у відповідних рухомих буферах, ACES pH 7,4 та pH 5,8 (20 мМ ACES, 150 мМ NaCl, 1,2 мМ $CaCl_2$, 0,05 % Tween 20, 0,005 % NaN_3). Кожне антитіло захопили на сенсорну поверхню за допомогою ProA/G. Рівні захоплення антитіла становили зазвичай 60-90 резонансних одиниць (RU). Після цього рекомбінантний C5 людини впорскували при концентраціях 10 нМ та 20 нМ або 20 нМ та 40 нМ, після чого відбувалася дисоціація. Поверхню регенерували за допомогою 20 мМ NaOH. Кінетичні параметри в умовах обох pH визначили шляхом узгодження сенсограм з моделлю зв'язування 1:1 із застосуванням програмного забезпечення для оцінки, T200 BIACORE (зареєстрована торговельна марка), версія 2.0 (GE Healthcare). Сенсограми усіх антитіл наведено на Фігурах 2A та 2B. Швидкість асоціації (ka), швидкість дисоціації (kd) та афінність зв'язування (KD) антитіл наведено у Таблиці 3. Усі антитіла, за виключенням CFA0330 (VH, SEQ ID NO: 21 та VL, SEQ ID NO: 25) та CFA0341 (VH, SEQ ID NO: 22 та VL, SEQ ID NO: 26), демонстрували відносно вищу швидкість дисоціації при pH 5,8, ніж при pH 7,4.

Таблиця 3

Кінетичні параметри антитіл проти C5 при pH 7,4 та pH 5,8

Назва антитіла	pH7,4			pH5,8		
	ka	kd	KD	ka	kd	KD
CFA0305	3.82E+04	5.89E-04	1.54E-08	4.27E+04	1.83E-02	4.30E-07
CFA0307	3.24E+05	2.63E-03	8.13E-09	2.04E+05	3.34E-02	1.64E-07
CFA0366	1.04E+06	9.34E-03	8.99E-09	9.35E+05	7.03E-02	7.52E-08
CFA0501	4.74E+05	1.69E-03	3.56E-09	1.50E+05	2.62E-02	1.74E-07
CFA0538	4.73E+05	1.85E-03	3.91 E-09	1.22E+05	3.01 E-02	2.46E-07
CFA0599	4.74E+05	2.81 E-03	5.93E-09	4.54E+05	3.73E-02	8.21 E-08
CFA0666	3.65E+05	6.26E-04	1.71 E-09	2.82E+05	9.39E-03	3.33E-08
CFA0672	5.23E+05	1.83E-04	3.51E-10	7.11E+04	9.78E-03	1.38E-07
CFA0675	3.83E+05	4.12E-04	1.08E-09	3.89E+05	6.61 E-03	1.70 E-08
305-LO5	4.48E+05	2.11 E-04	4.71E-10	2.03E+06	2.85E-02	1.40E-08
CFA0330	1.66E+06	2.02E-04	1.22E-10	1.22E+06	2.24E-04	1.84E-10
CFA0341	6.28E+05	9.77E-05	1.55E-10	1.24E+06	7.39E-05	5.95E-11

3.3. Перевірка перехресної реактивності

Для того, щоб спостерігати перехресну реактивність антитіл проти C5 стосовно C5 людини (hC5) та C5 яванської макаки (cynoC5), виконували кінетичний аналіз BIACORE (зареєстрована торговельна марка). Налаштування аналізу були такими самими, як описано у Прикладі 3.2. Рекомбінантний cynoC5 впорскували при концентраціях 2, 10 та 50 нМ. Кінетичні параметри визначили за допомогою такого ж узгодження даних, як описано у Прикладі 3.2. Кінетичні параметри та афінність зв'язування при pH 7,4 наведено у Таблиці 4. Кінетичні параметри стосовно hC5, наведені у Таблиці 4, - це результати з Прикладу 3.2. Усі антитіла проти C5, за виключенням CFA0672, демонстрували порівнянне KD стосовно hC5 та cynoC5. KD антитіла

CFA0672 стосовно супоС5 було у 8 разів слабшим, ніж стосовно hC5.

Таблиця 4

Кінетичні параметри та афінність зв'язування антитіл проти С5 стосовно hC5 та супоС5 при pH 7,4

Назва антитіла	афінність до hC5			афінність до супоCS		
	ка	kd	KD	ка	kd	KD
CFA0305	3.82E+04	5.89E-04	1.54E-08	1.21E+04	6.70E-04	5.54E-09
CFA0307	3.24E+05	2.63E-03	8.13E-09	2.90E+05	2.23E-03	7.68E-09
CFA0366	1.04E+06	9.34E-03	8.99E-09	5.04E+05	9.04E-03	1.79E-08
CFA0501	4.74E+05	1.69E-03	3.56E-09	2.66E+05	1.56E-03	5.88E-09
CFA0538	4.73E+05	1.85E-03	3.91 E-09	3.05E+05	1.66E-03	5.44E-09
CFA0599	4.74E+05	2.81 E-03	5.93E-09	5.42E+05	2.35E-03	4.33E-09
CFA0666	3.65E+05	6.26E-04	1.71 E-09	3.14E+05	4.93E-04	1.57E-09
CFA0672	5.23E+05	1.83E-04	3.51E-10	6.41 E+05	1.85E-03	2.88E-09
CFA0675	3.83E+05	4.12E-04	1.08E-09	2.94E+05	3.78E-04	1.29E-09

Приклад 4

Картування епітопів стосовно антитіл проти С5

4.1. Зв'язування MAb проти С5 з пептидами, що походять від бета-ланцюга С5

Моноклональні антитіла проти С5 (MAb) тестували щодо їх зв'язування з пептидами, що походять від бета-ланцюга С5, з використанням вестерн-блот аналізу. Пептиди С5: 19-180, 161-340, 321-500 та 481-660,- злиті з міткою GST (pGEX-4T-1, GE Healthcare Life Sciences, 28-9545-49), експресували у E. coli (DH5alpha, TOYOBO, DNA-903). Зразки E. coli зібрали після інкубування з 1 мМ ізопропіл-бета-D-1-тіогалактопірано-зидом (IPTG) протягом 5 годин при 37 °С та центрифугували при 20000 x g протягом 1 хвилини, та отримали осад. Осад суспендували у буферному розчині для зразків (2ME+) (Wako, 191-13272) та застосовували для вестерн-блот аналізу. Експресію кожного пептиду підтвердили антитілом проти GST (Abcam, ab9085) (Фігура 3). Стрілка вказує на пептиди С5, злиті з GST (46-49 кДа). MAb проти С5: CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672 та CFA0675, - зв'язані з пептидом 19-180 С5 (Фігура 3).

4.2. Експресія та очищення домену MG1-MG2 (1-225) С5 людини

Рекомбінантний домен MG1-MG2 (SEQ ID NO: 43) бета-ланцюга С5 людини транзієнтно експресували, застосовуючи клітинну лінію FreeStyle293-F (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, США). Кондиційовані середовища, які експресують домен MG1-MG2, розвели ½ об'єму води milliQ, а потім завантажили у аніонообмінну колонку Q-sepharose FF (GE healthcare, Uppsala, Швеція). Потік крізь фракцію з аніонообмінної колонки довели до pH 5,0 та завантажили у катіонообмінну колонку SP-sepharose HP (GE healthcare, Uppsala, Швеція) та елюювали в градієнті NaCl. Фракції, що містили домен MG1-MG2, одержали з елюенту та потім завантажили у гель-фільтраційну колонку Superdex 75 (GE healthcare, Uppsala, Швеція), урівноважену 1 x PBS. Фракції, що містили домен MG1-MG2, потім об'єднали та зберігали при -80 °С.

4.3. Спроможність зв'язування з доменом MG1-MG2

Спроможність зв'язування антитіл проти С5 з доменом MG1-MG2 вимірювали, застосовуючи такі самі налаштування для аналізу, як описано у Прикладі 3.2, за виключенням того, що вимірювання виконувалися тільки при pH 7,4. Домен MG1-MG2 впорскували при концентраціях 20 нМ та 40 нМ. Як показано на Фігурі 4, усі антитіла, за виключенням екулізумаб-760G4, демонстрували підсилення реакції зв'язування, вказуючи на те, що ці антитіла зв'язуються з MG1-MG2. Екулізумаб-F760G4, відоме як антитіло, що зв'язується з альфа-ланцюгом, не демонструвало зв'язування з доменом MG1-MG2.

4.4. Зв'язування MAb проти С5 з пептидами, що походять з домену MG1-MG2 С5

MAb проти С5 тестували щодо їх зв'язування з пептидами, що походять з домену MG1-MG2, із застосуванням вестерн-блот аналізу. Пептиди С5: 33-124, 45-124, 52-124, 33-111, 33-108 та 45-111 (SEQ ID NO: 40),- злиті з міткою GST, експресували у E. coli. Зразки E.coli зібрали після інкубування з 1мМ IPTG протягом 5 годин при 37 °С, та центрифугували при 20000 x g протягом 1 хвилини, та отримали осад. Осад суспендували у буферному розчині для зразків (2ME+) та застосовували для вестерн-блот аналізу. Експресію кожного пептиду, що походить з С5, підтвердили антитілом проти GST (Фігура 5A). CFA0305 зв'язалося тільки з пептидом 33-124 (Фігура 5B). CFA0305 зв'язалося з бета-ланцюгом рекомбінантного С5 людини (rhC5)

(приблизно 70 кДа), який застосовувався як контрольний. На Фігурі 5С узагальнено реакцію MAb проти C5 з пептидами, що походять з C5.

4.5. Зв'язування MAb проти C5 з мутантами C5

Оскільки внаслідок аналізу кристалічної структури було передбачено, що три амінокислотні залишки у бета-ланцюгу C5-E48, D51 та K109 - залучаються у зв'язування між C5 та MAb проти C5, то MAb проти C5 тестували щодо їх зв'язування з точковими мутантами C5 людини з використанням вестерн-блот аналізу. Точкові мутанти C5, у яких будь-який з E48, D51 та K109 був заміщений аланіном, експресували у клітинах FS293 за допомогою ліпофекції. Культуральні середовища зібрали за 5 днів після ліпофекції, а після цього застосовували для вестерн-блотингу. SDS-PAGE виконували при відновлювальних умовах. Результати наведено на Фігурі 6. Екулізумаб зв'язалося з альфа-ланцюгом природного (WT) C5 та трьома точковими мутантами C5, тоді як CFA0305 сильно зв'язалося з бета-ланцюгом WT C5, слабо зв'язалося з мутантом C5 E48A та не зв'язалося з бета-ланцюгом мутантів C5 D51A та K109A, що вказує на те, що ці три амінокислотні залишки залучаються до взаємодії антитіло/антиген. У Таблиці 5 наведено узагальнені результати вестерн-блот аналізу MAb проти C5 (CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672 та CFA0675). MAb проти C5 згруповано в одну епітопну групу C, проте профілі зв'язування незначно різняться між антитілами, що дозволяє припустити, що ділянки зв'язування C5 з MAb проти C5 розташовані близько одна до одної, проте вони не є ідентичними.

Таблиця 5

Узагальнення реакції MAb проти C5 з мутантами C5

	WT	E48A	D51A	K109A
Екулізумаб	+	+	+	+
CFA0305	+	+	-	-
CFA0307	+	-	-	-
CFA0366	+	-	-	-
CFA0501	+	-	-	-
CFA0538	+	-	-	-
CFA0599	+	-	-	+
CFA0666	+	-	-	+
CFA0672	+	-	-	+
CFA0675	+	+	-	+

4.6. Аналіз зв'язування BIACORE (зареєстрована торговельна марка) антитіл проти C5 з мутантами C5

Для того, щоб здійснити тест того, чи дійсно залишки E48, G51 та K109 залучаються у взаємодію антитіло/антиген, виконували аналіз зв'язування BIACORE (зареєстрована торговельна марка). Приготували три мутанти C5-E48A, G51A та K109A, - як описано у Прикладі 4.5. Зразки культуральних надосадових рідин, що містили мутантний C5, який надмірно експресувався у клітинах FS293, приготували у концентрації 40 мкг/мл мутантного C5. Для аналізу зв'язування BIACORE (зареєстрована торговельна марка) зразок розвели 10 х рухомим буфером BIACORE (зареєстрована торговельна марка) (ACES pH 7,4, 10 мг/мл BSA, 1 мг/мл карбоксиметилдекстрану) до кінцевої концентрації 4 мкг/мл зразка мутантного C5.

Взаємодії трьох мутантів C5 з антитілами проти C5 оцінювали при 37 °C за допомогою приладу T200 BIACORE (зареєстрована торговельна марка) (GE Healthcare), застосовуючи умови аналізу, описані у Прикладі 3.2. Буфер ACES pH 7,4, що містив 10 мг/мл BSA, 1 мг/мл карбоксиметилдекстрану, застосовували як рухомий буфер. Екулізумаб-F760G4 та 305LO5 захопили на різні потокові комірки за допомогою моноклонального мишачого антитіла проти IgG людини, яке є специфічним до фрагмента Fc (GE Healthcare). Потокову комірку 1 застосовували як посилальну поверхню. Білки природного та мутантного C5 впорскували на сенсорну поверхню у концентрації 4 мкг/мл, щоб вони взаємодіяли із захопленими антитілами. Наприкінці кожного циклу аналізу сенсорну поверхню регенерували за допомогою 3M $MgCl_2$. Результати проаналізували за допомогою програмного забезпечення Bia Evaluatio, версія 2.0 (GE Healthcare). Криві посилальної потокової комірки (потокова комірка 1) та холостих впорскувань рухомого буферу відняли від кривих потокової комірки із захопленими антитілами.

Як показано на Фігурі 7, усі три мутанти C5 змогли зв'язатися з екулізумабом з подібним до

природного C5 профілем зв'язування. Для 305LO5 усі три мутанти продемонстрували нижчу реакцію зв'язування з 305LO5, порівняно з природним C5. Мутанти D51A та K109A знизили зв'язування C5 з 305LO5 до початкового рівня.

4.7. Ідентифікація залишків His в C5, які сприяють залежній від pH взаємодії між антитілом проти C5 та C5

Аналіз кристалічної структури дозволив виявити, що три гістидинові залишки в C5 людини розташовані в зоні взаємодії антитіло/антиген. Відомо, що залишок гістидину зі звичайним pKa, що становить приблизно 6,0, сприяє залежній від pH взаємодії білок-білок (Igawa et al., Biochim Biophys Acta 1844(11):1943-1950 (2014)). Для того, щоб дослідити, які із залишків His в зоні взаємодії антитіло/антиген сприяють залежним від pH взаємодіям між антитілом проти C5 та C5, виконували аналіз зв'язування BIACORE (зареєстрована торговельна марка). Три мутанти C5 людини з єдиною мутацією His (H70Y, H72Y та H110Y) та мутанта з подвійною мутацією His (H70Y+H110Y) отримали наступним чином: мутантів з єдиним His, у яких будь-який з H70, H72 та H110 заміщений тирозином, та мутанта з подвійним His, у якому обидва H70 та H110 заміщені тирозином, експресували у клітинах FS293 за допомогою ліпофекції. Властивості антигенного зв'язування мутантів C5 із заміщеним His з 305LO5, що є залежним від pH антитілом проти C5, визначили за допомогою модифікованого аналізу BIACORE (зареєстрована торговельна марка), як описано у Прикладі 4.6. Стисло кажучи, додаткову фазу дисоціації при pH 5,8 здійснювали в аналізі BIACORE (зареєстрована торговельна марка) одразу після фази дисоціації при pH 7,4 для того, щоб оцінити залежну від pH дисоціацію утворених при pH 7,4 комплексів антитіла та антигену. Швидкість дисоціації при pH 5,8 визначили шляхом обробки та узгодження даних, застосовуючи програмне забезпечення узгодження кривих Scrubber 2.0 (BioLogic Software).

Як показано на Фігурі 8, єдина мутація His у C5 на H70 або H110 та подвійна мутація His (H70 + H110) не вплинули на зв'язування C5 з 305LO5 при нейтральному pH. Між тим, єдина мутація His на H72 демонструвала суттєве порушення зв'язування C5 з 305LO5. Константи дисоціації при pH 5,8 мутантів C5 із заміщеним His та білка природного C5 (C5-wt) наведено у Таблиці 6. Як показано у Таблиці 6, природний C5 демонстрував найшвидшу дисоціацію від 305LO5 при pH 5,8 серед антигенів C5, що тестувалися. Єдина мутація His на H70 демонструвала майже у два рази нижчу швидкість дисоціації при pH 5,8, а єдина мутація His на H110 спричинила незначно нижчу швидкість дисоціації при pH 5,8 порівняно з природним C5. Подвійна мутація на обох H70 та H110 зумовила більший вплив на залежне від pH зв'язування, при цьому швидкість дисоціації при pH 5,8 майже у три рази нижча, ніж у природного C5.

Таблиця 6

Значення констант дисоціації при pH 5,8 для мутантів His C5, що зв'язуються з 305LO5

Антигени	Kd (1/c)
C5-wt	1,1E-2
C5-H70Y	5,3E-3
C5-H110Y	9,3E-3
C5-H70Y, H110Y	3,9E-3

Приклад 5

Інгібувальна активність антитіл проти C5 стосовно активації C5

5.1. Інгібування активованого комплементом лізису ліпосом антитілами MAb проти C5

MAb проти C5 випробовували щодо інгібування активності комплементу за допомогою аналізу лізису ліпосом. 30 мкл сироватки здорової людини (6,7 %) (Biopredic, SER018) змішали з 20 мкл розведеного MAb у планшеті з 96 комірками та інкубували на шейкері протягом 30 хвилин при 25 °C. Ліпосоми, сенсибілізовані антитілами проти динітрофенілу (Autokit CH50, Wako, 995-40801), перенесли до кожної комірки та планшет розташували на шейкері на 2 хвилини при 25 °C. 50 мкл субстратного розчину (Autokit CH50) додали до кожної комірки та змішували шляхом збовтування протягом 2 хвилин при 25 °C. Кінцеву суміш інкубували при 37 °C протягом 40 хвилин, після цього виміряли оптичну щільність (OD) суміші при 340 нм. Відсоток лізису ліпосом визначили як 100 x [(OD $_{\text{MAb-OD фон сироватки та ліпосом}}$)]/ [(OD $_{\text{без MAb-OD фон сироватки та ліпосом}}$)]. Фігура 9A демонструє, що MAb проти C5: CFA0305, 0307, 0366, 0501, 0538, 0599, 0666, 0672 та 0675 - інгібували лізис ліпосом. Два не залежні від pH антитіла CFA0330 та 0341 також інгібували лізис (Фігура 9B).

5.2. Інгібування утворення C5a антитілами MAb проти C5

MAb проти C5 випробовували щодо утворення C5a під час лізису ліпосом, щоб підтвердити, що MAb проти C5 інгібують розщеплення C5 на C5a та C5b. Рівень C5a в надосадових рідинах з аналізу лізису ліпосом кількісно визначили, застосовуючи набір C5a ELISA (R&D systems, DY2037). Усі MAb інгібували утворення C5a в надосадових рідинах залежним від дози чином (Фігури 10A та 10B).

5.3. Інгібування активованого комплементом гемолізу антитілами MAb проти C5

MAb проти C5 тестували щодо інгібування класичної активності комплементу у гемолітичному аналізі. Еритроцити курчати (cRBCs) (Innovative research, IC05-0810) промили забуференим сольовим розчином з желатином/вероналом, який містив 0,5 мМ $MgCl_2$ та 0,15 мМ $CaCl_2$ (GVB++) (Boston BioProducts, IBB-300X), а потім сенсибілізували антитілом проти RBC курчати (Rockland 103-4139) у концентрації 1 мкг/мл протягом 15 хвилин при 4 °C. Клітини потім промили GVB++ та суспендували в такому ж самому буфері зі щільністю 5×10^7 клітин/мл. В окремому планшеті з 96 круглодонними комірками для мікротесту змішали 50 мкл сироватки здорової людини (20 %) (Biopredic, SER019) з 50 мкл розведеного MAb та інкубували на шейкері при 37 °C протягом 30 хвилин. 60 мкл суспензії сенсибілізованих cRBC потім додали до комірок, що містили сироватку, та суміш антитіла інкубували при 37 °C протягом 30 хвилин. Після інкубування планшет центрифугували при 1000 x g протягом 2 хвилин при 4 °C. Надосадові рідини (100 мкл) перенесли до комірок на планшеті з 96 комірками з пласким дном для мікротесту для вимірювання OD при 415 нм з посилальною довжиною хвилі 630 нм. Відсоток гемолізу визначили як 100 x [(OD $_{\text{MAb}}$-OD $_{\text{сироватка та cRBC}}$)]/ [(OD $_{\text{без MAb}}$-OD $_{\text{фон сироватки та cRBC}}$)]. Фігура 11 демонструє, що MAb проти C5-CFA0305 та 305LO5 - інгібували гемоліз cRBC.

5.4. Інгібування альтернативного шляху комплементу антитілами MAb проти C5

Гемолітичний аналіз для альтернативного шляху виконували подібним до класичного шляху способом гемолітичного аналізу. Кров, узяту у новозеландського білого кроля (InVivos), змішали з таким самим об'ємом розчину Alsever's (Sigma, A3551) та цю суміш застосовували як еритроцити кроля (rRBC). rRBC промили GVB з доданими 2 мМ $MgCl_2$ та 10 мМ EGTA та суспендували у такому ж самому буфері зі щільністю 7×10^8 клітин/мл. У планшеті з 96 круглодонними комірками для мікротесту змішали 40 мкл сироватки здорової людини (25 %) (Biopredic, SER019) з 40 мкл розведеного MAb та інкубували на шейкері протягом 30 хвилин при 37 °C. Потім до комірок, що містили сироватку, додали 20 мкл суспензії rRBC та інкубували суміш з антитілами при 37 °C протягом 60 хвилин. Після інкубування планшет центрифугували при 1000 x g протягом 2 хвилин при 4 °C. Надосадові рідини (70 мкл) перенесли до комірок на планшеті з 96 комірками з пласким дном для мікротесту для вимірювання OD при 415 нм з посилальною довжиною хвилі 630 нм. Фігура 12 демонструє, що MAb проти C5-CFA0305 та CFA0672 - інгібували гемоліз rRBC, що вказує на те, що ці антитіла інгібують альтернативні шляхи комплементу.

Приклад 6

Оптимізація моноклональних антитіл проти C5 (варіанти 305)

Зробили ряд мутацій в оптимізованій варіабельній ділянці антитіла проти C5 305LO5, щоб далі покращити його властивості, та отримали оптимізовані варіабельні ділянки 305LO15, 305LO16, 305LO18, 305LO19, 305LO20, 305LO22 та 305LO23. Амінокислотні послідовності VH та VL варіантів 305 наведено у Таблицях 7 та 8, відповідно. Гени, які кодують гуманізовану VH, поєднали з модифікованим варіантом CH IgG1 людини - SG115 (SEQ ID NO: 114) та модифікованими варіантами CH IgG4 людини - SG422 (SEQ ID NO: 115) або SG429 (SEQ ID NO: 116). Гени, які кодують гуманізовану VL, поєднали з CL людини (SK1, SEQ ID NO: 38). Окремо гени важкого та легкого ланцюгів, які кодують гуманізоване антитіло проти C5, BNJ441 (BNJ441H, SEQ ID NO: 149; BNJ441L, SEQ ID NO: 150), синтезували та кожен ген клонували у вектор експресії.

Антитіла експресувалися у клітинах HEK 293, трансфектованих спільно комбінацією векторів експресії важкого та легкого ланцюгів, та їх очистили Білком A.

Таблиця 7

Амінокислотні послідовності VH варіантів 305

Антитіло	VH	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3
305LO5	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 54 SSYYVA	SEQ ID NO: 64 AIYTGSGATYKASWAKG	SEQ ID NO: 74 DGGYDYPTHAMHY
305LO15	SEQ ID NO: 106	SEQ ID NO: 117 SSYYMA	SEQ ID NO: 118 AIFTGSGAEYKAEWAKG	SEQ ID NO: 121 DAGYDYPTHAMHY
305LO16	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 117 SSYYMA	SEQ ID NO: 119 AIFTGSGAEYKAEWVKG	SEQ ID NO: 121 DAGYDYPTHAMHY
305LO18	SEQ ID NO: 108	SEQ ID NO: 117 SSYYMA	SEQ ID NO: 118 AIFTGSGAEYKAEWAKG	SEQ ID NO: 121 DAGYDYPTHAMHY
305LO19	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 117 SSYYMA	SEQ ID NO: 118 AIFTGSGAEYKAEWAKG	SEQ ID NO: 121 DAGYDYPTHAMHY
305LO20	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 117 SSYYMA	SEQ ID NO: 118 AIFTGSGAEYKAEWAKG	SEQ ID NO: 121 DAGYDYPTHAMHY
305LO22	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 117 SSYYMA	SEQ ID NO: 118 AIFTGSGAEYKAEWAKG	SEQ ID NO: 121 DAGYDYPTHAMHY
305LO23	SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 117 SSYYMA	SEQ ID NO: 120 GIFTGSGATYKAEWAKG	SEQ ID NO: 121 DAGYDYPTHAMHY

Таблиця 8

Амінокислотні послідовності VL варіантів 305

Антитіло	VL	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
305LO5	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 84 QASQNIGSSLA	SEQ ID NO: 94 GASKTHS	SEQ ID NO: 104 QSTKVGSSYGNH
305LO15	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 122 RASQGISSSLA	SEQ ID NO: 123 GASETES	SEQ ID NO: 125 QNTKVGSSYGNT
305LO16	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 122 RASQGISSSLA	SEQ ID NO: 123 GASETES	SEQ ID NO: 125 QNTKVGSSYGNT
305LO18	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 122 RASQGISSSLA	SEQ ID NO: 123 GASETES	SEQ ID NO: 125 QNTKVGSSYGNT
305LO19	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 122 RASQGISSSLA	SEQ ID NO: 123 GASETES	SEQ ID NO: 125 QNTKVGSSYGNT
305LO20	SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 122 RASQGISSSLA	SEQ ID NO: 123 GASETES	SEQ ID NO: 125 QNTKVGSSYGNT
305LO22	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 122 RASQGISSSLA	SEQ ID NO: 124 GASTTQS	SEQ ID NO: 125 QNTKVGSSYGNT
305LO23	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 122 RASQGISSSLA	SEQ ID NO: 124 GASTTQS	SEQ ID NO: 125 QNTKVGSSYGNT

Приклад 7

Характеристика зв'язування антитіл проти C5 (варіантів 305)

Кінетичні параметри антитіл проти C5 стосовно рекомбінантного C5 людини оцінювали при 37 °C із застосуванням приладу T200 BIACORE (зареєстрована торговельна марка) (GE Healthcare) при трьох різних умовах: (1) асоціацію і дисоціацію вимірювали при pH 7,4, (2) асоціацію і дисоціацію вимірювали при pH 5,8 та (3) асоціацію вимірювали при pH 7,4, а дисоціацію вимірювали при pH 5,8. ProA/G (Pierce) іммобілізували на сенсорному чипі CM1, застосовуючи набір для амінного зчеплення (GE Healthcare) згідно з рекомендованими GE Healthcare налаштуваннями. Антитіла та аналіти для умов (1) та (3) розвели у буфері ACES pH 7,4 (20 мМ ACES, 150 мМ NaCl, 1,2 мМ $CaCl_2$, 0,05 % Tween 20, 0,005 % NaN_3), а для умови (2) їх розвели у буфері ACES pH 5,8 (20 мМ ACES, 150 мМ NaCl, 1,2 мМ $CaCl_2$, 0,05 % Tween 20, 0,005 % NaN_3). Кожне антитіло захопили на сенсорну поверхню за допомогою ProA/G. Рівні захоплення антитіла становили зазвичай 60-90 резонансних одиниць (RU). Після цього рекомбінантний C5 людини впорскували при від 3 нМ до 27 нМ або від 13,3 нМ до 129 нМ, отриманими внаслідок трикратного серійного розведення, а потім відбулася дисоціація. Поверхню регенерували, застосовуючи 25 мМ NaOH. Кінетичні параметри при умовах (1) та (2) визначили шляхом узгодження сенсограм з моделлю зв'язування 1:1, а константу дисоціації при умові (3) визначили шляхом узгодження сенсограм з дисоціацією 1:1 для моделі MCK, застосовуючи програмне забезпечення T200 Evaluation BIACORE (зареєстрована торговельна

марка), версія 2.0 (GE Healthcare). Залежність від pH усіх антитіл показано як відношення констант дисоціації для умов (2) та (1).

Константу асоціації (ka), константу дисоціації (kd), афінність зв'язування (KD) та залежність від pH наведено у Таблиці 9. Усі антитіла демонстрували більшу швидкість дисоціації при pH 5,8, ніж при pH 7,4, та їх залежність від pH була приблизно 20-кратною.

Таблиця 9

Кінетичні параметри варіантів антитіла проти C5 за умов pH 7,4 та pH 5,8

	7,4_7,4			5,8_5,8			7,4_5,8	pH
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)	kd (1/c)	залежність
LO15-SG422	1.40E+06	4.19E-04	3.00E-10	1.34E+05	8.79E-03	6.57E-08	1.61E-02	21.0
LO15-SG115	1.31E+06	3.54E-04	2.70E-10	9.49E+04	8.27E-03	8.72E-08	1.67E-02	23.4
LO16-SG422	1.28E+06	4.12E-04	3.21E-10	1.09E+05	8.69E-03	7.95E-08	1.61E-02	21.1
LO18-SG422	1.36E+06	4.26E-04	3.14E-10	1.39E+05	8.65E-03	6.24E-08	1.69E-02	20.3
LO19-SG422	1.37E+06	4.76E-04	3.46E-10	1.38E+05	8.30E-03	6.00E-08	1.61E-02	17.4
LO20-SG115	1.44E+06	4.67E-04	3.24E-10	1.41E+05	8.18E-03	5.81E-08	1.61E-02	17.5
LO20-SG422	1.35E+06	4.70E-04	3.49E-10	1.36E+05	8.15E-03	5.99E-08	1.55E-02	17.3
LO22-SG115	1.46E+06	3.82E-04	2.62E-10	1.71E+05	9.30E-03	5.45E-08	1.46E-02	24.3
LO23-SG115	1.53E+06	4.23E-04	2.77E-10	1.33E+05	8.55E-03	6.41E-08	1.73E-02	20.2

Афінність зв'язування антитіл проти C5 (BNJ441, екулізумаб та варіант 305) з рекомбінантним C5 людини при pH 7,4 та pH 5,8 визначили при 37 °C, застосовуючи прилад T200 BIACORE (зареєстрована торговельна марка) (GE Healthcare), щоб оцінити вплив pH на зв'язування антигену. Поліклональне антитіло козла проти Fc IgG людини (KPL #01-10-20) іммобілізували на сенсорному чипі CM4, застосовуючи набір для амінного зчеплення (GE Healthcare) згідно з рекомендованими виробником налаштуваннями. Антитіла та аналіти розвели буфером ACES pH 7,4 або буфером ACES pH 5,8, які містили 20 мМ ACES, 150 мМ NaCl, 1,2 мМ $CaCl_2$, 0,05 % Tween 20 та 0,005 % NaN_3. Антитіла захопили на сенсорну поверхню, застосовуючи спосіб анти-Fc, рівні захоплення зазвичай становили 50-80 резонансних одиниць (RU). Рекомбінантний C5 людини отримали внаслідок трикратного серійного розведення, починаючи з умов аналізу 27 нМ для pH 7,4 або з умов аналізу 135 нМ для pH 5,8. Поверхню регенерували, застосовуючи 20 мМ HCl, 0,01 % Tween 20. Дані обробили та узгодили з моделлю зв'язування 1:1, застосовуючи програмне забезпечення BiaEvaluation 2.0 (GE Healthcare).

Афінність зв'язування (KD) BNJ441, екулізумабу та варіанта 305 з рекомбінантним C5 людини при pH 7,4 та pH 5,8 наведено у Таблиці 10. Варіант 305 демонстрував відношення (KD при pH 5,8) / (KD при pH 7,4), яке становить майже 800, що у 8 разів перебільшує таке відношення для BNJ441, яке продемонструвало відношення (KD при pH 5,8) / (KD при pH 7,4), яке становило лише 93.

Таблиця 10

Антитіло	KD (M)		Відношення KD
	pH7,4	pH 5,8	При pH 5,8/pH7,4
Варіант 305LO5	1,66E-10	1,32E-07	795
Екулізумаб	1,42E-10	2,64E-09	19
BNJ441	1,38E-09	1,28E-07	93

Приклад 8

Інгібувальна активність антитіл проти C5 (варіанти 305) на активацію C5

8.1. Інгібування активованого комплементом лізису ліпосом антитілами MAb проти C5

MAb проти C5 тестували щодо інгібування активності комплементу за допомогою аналізу лізису ліпосом. 30 мкл сироватки здорової людини (6,7 %) (Biopredic, SER019) змішали з 20 мкл розведеного MAb у планшеті з 96 комірками та інкубували на шейкері протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Розчин ліпосом, сенсибілізований антитілами проти динітрофенілу (Autokit CH50, Wako, 995-40801), перенесли до кожної комірки та планшет розташували на шейкері на 2 хвилини при 37 °C. 50 мкл субстратного розчину (Autokit CH50) додали до кожної комірки та змішували шляхом збовтування протягом 2 хвилин при 37 °C. Кінцеву суміш

інкубували при 37 °С протягом 40 хвилин, а потім виміряли OD при 340 нм. Відсоток лізису ліпосом визначили як 100 х [(OD $_{\text{MAb-OD фон сироватки та ліпосом}}$)]/ [(OD $_{\text{без MAb-OD фон сироватки та ліпосом}}$)]. Фігура 13 демонструє, що MAb проти C5: 305LO15-SG422, 305LO16-SG422, 305LO18-SG422, 305LO19-SG422, 305LO20-SG422 та 305LO20-SG115 - інгібували лізис ліпосом. Антитіла з варіантами Fc, 305LO15-SG115 та 305LO23-SG429, також інгібували лізис ліпосом (Фігура 14).

MAb проти C5 тестували щодо інгібування рекомбінантного C5 людини (SEQ ID NO: 39). 10 мкл сироватки людини з дефіцитом C5 (Sigma, C1163) змішали з 20 мкл розведеного MAb та 20 мкл рекомбінантного C5 (0,1 мкг/мл) у планшеті з 96 комірками та планшет інкубували на шейкері протягом 1 години при 37 °С. Ліпосоми (Autokit CH50) перенесли до кожної комірки та планшет розташували на шейкері на 2 хвилини при 37 °С. 50 мкл субстратного розчину (Autokit CH50) додали до кожної комірки та змішували шляхом збовтування протягом 2 хвилин при 37 °С. Кінцеву суміш інкубували при 37 °С протягом 180 хвилин, а потім виміряли OD при 340 нм. Відсоток лізису ліпосом визначили, як описано вище. Фігура 15 демонструє, що MAb проти C5: 305LO22-SG115, 305LO22-SG422, 305LO23-SG115 та 305LO23-SG422 - інгібували лізис ліпосом.

8.2. Інгібування утворення C5a антитілами MAb проти C5

MAb проти C5 тестували щодо утворення C5a під час лізису ліпосом, щоб підтвердити, що MAb проти C5 інгібують розщеплення C5 на C5a та C5b. Рівні C5a в надосадових рідинах кількісно визначили з аналізу лізису ліпосом, застосовуючи набір C5a ELISA (R&D systems, DY2037). Усі MAb інгібували утворення C5a в надосадових рідинах залежним від дози чином (Фігури 16 та 17).

8.3. Вимірювання активності комплементу у плазмі яванської макаки

MAb проти C5 тестували щодо інгібування активності комплементу у плазмі яванської макаки. Мавпам ввели MAb проти C5 (20 мг/кг) та зразки плазми брали періодично до 56 дня. Еритроцити курчати (cRBC) (Innovative research, IC05-0810) промили забуференим сольовим розчином з желатином/вероналом, який містив 0,5 мМ $MgCl_2$ та 0,15 мМ $CaCl_2$ (GVB++) (Boston BioProducts, IBB-300X), та після цього сенсибілізували антитілом проти еритроцитів курчати (Rockland 103-4139) у концентрації 1 мкг/мл протягом 15 хвилин при 4 °С. Клітини потім промили GVB++ та суспендували у такому ж самому буфері із щільністю 1 × 10^8 клітин/мл. В окремому планшеті для мікротесту з 96 круглодонними комірками плазму мавпи інкубували з сенсибілізованими cRBC при 37 °С протягом 20 хвилин. Після інкубування планшет центрифугували при 1000 х g протягом 2 хвилин при 4 °С. Надосадові рідини перенесли до комірок на планшетах для мікротесту з 96 комірками з пласким дном для вимірювання OD при 415 нм з посилальною довжиною хвилі 630 нм. Відсоток гемолізу визначили як 100 х [(OD $_{\text{після введення - OD фон плазми та cRBC}}$)]/ [(OD $_{\text{до введення - OD фон плазми та cRBC}}$)]. Фігура 18 демонструє, що MAb проти C5: 305LO15-SG422, 305LO15-SG115, 305LO16-SG422, 305LO18-SG422, 305LO19-SG422, 305LO20-SG422, 305LO20-SG115 та 305LO23-SG115 - інгібували активність комплементу у плазмі.

8.4. Інгібування біологічної активності варіантів C5 антитілами MAb проти C5

MAb проти C5 тестували щодо інгібування варіантів рекомбінантного C5 людини: V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N та E1437D. Повідомлялося, що пацієнти з PNH, які мають мутацію R885H в C5, демонструють низьку реакцію на екулізумаб (дивись, наприклад, Nishimura et al., New Engl. J. Med. 370:632-639 (2014)). Кожен з варіантів C5 людини експресували у клітинах FS293 та надосадові рідини застосовували для наступного дослідження. 10 мкл сироватки людини з дефіцитом C5 (Sigma, C1163) змішали з 20 мкл розведеного MAb та 20 мкл культурального середовища клітин, яке містило варіант рекомбінантного C5 (2-3 мкг/мл), у планшеті з 96 комірками та інкубували на шейкері протягом 0,5 години при 37 °С. Ліпосоми (Autokit CH50) перенесли у кожну комірку та планшет розташували на шейкері на 2 хвилини при 37 °С. 50 мкл субстратного розчину (Autokit CH50) додали до кожної комірки та змішували шляхом збовтування протягом 2 хвилин при 37 °С. Кінцеву суміш інкубували при 37 °С протягом 90 хвилин, а після цього виміряли OD при 340 нм. Відсоток лізису ліпосом визначили, як описано вище. Фігура 19 демонструє, що MAb проти C5 (екулізумаб) не інгібував варіант C5 R885H, проте інгібував інші варіанти C5, що тестувалися. Фігура 20 демонструє, що MAb проти C5 (варіант 305) інгібував усі варіанти C5, що тестувалися.

8.5. Інгібування активованого комплементом лізису ліпосом антитілами MAb проти C5

MAb проти C5 тестували щодо інгібування активності комплементу за допомогою аналізу лізису ліпосом. 30 мкл сироватки здорової людини (6,7 %) (Biopredic, SER019) змішали з 20 мкл розведеного MAb у планшеті з 96 комірками та інкубували на шейкері протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Розчин ліпосом, сенсибілізований антитілами проти динітрофенілу (Autokit CH50, Wako, 995-40801), перенесли до кожної комірки та планшет розташували на

шейкері на 2 хвилини при 25 °C. 50 мкл субстратного розчину (Autokit CH50) додали до кожної комірки та змішували шляхом збовтування протягом 2 хвилин при 25 °C. Кінцеву суміш інкубували при 37 °C протягом 45 хвилин, а потім виміряли OD при 340 нм. Відсоток інгібування лізису ліпосом визначили як 100 x [(OD $_{\text{MAb-фон сироватки та ліпосом}}$)]/ [(OD $_{\text{без MAb-фон сироватки та ліпосом}}$)]. Фігура 21 демонструє, що MAb проти C5-BNJ441 та варіант 305 - інгібували лізис ліпосом та що варіант 305 має сильнішу активність зв'язування, ніж BNJ441.

Приклад 9

Рентгенівський аналіз кристалічної структури комплексу Fab варіанта 305 та домену MG1 C5 людини

9.1. Експресія та очищення домену MG1 (20-124) C5 людини

Домен MG1 (амінокислотні залишки 20-124 SEQ ID NO: 39), злитий з міткою GST за допомогою лінкера, що розщеплюється тромбіном (GST-MG1), експресували у штамі BL21 DE3 pLysS E. coli (Promega), застосовуючи вектор pGEX-4T-1 (GE healthcare). Експресію білка індукували 0,1 мМ ізопропіл-бета-D-1-тіогалактопіранозидом (IPTG) при 25 °C протягом 5 годин. Дебрис бактеріальних клітин піддали лізису із застосуванням коктейлю Bugbuster (Merck) з доданими лізоназою (Merck) та повним коктейлем інгібіторів протеаз ("complete protease inhibitor cocktail") (Roche), а потім GST-MG1 очищували від розчинної фракції, застосовуючи колонку GSTrap (GE healthcare) згідно з інструкцією виробника. Мітку GST відщепили тромбіном (Sigma) та отриманий домен MG1 далі очищували за допомогою гель-фільтрації на колонці Superdex 75 (GE healthcare). Фракції, що містили домен MG1, об'єднали та зберігали при -80 °C.

9.2. Отримання фрагмента Fab варіанта 305

Фрагменти Fab одного з оптимізованих варіантів, що походять від 305, отримали за традиційним способом, застосовуючи граничне перетравлення папаїном (Roche Diagnostics, Cat No. 1047825), а потім завантажили на колонку Білка A (MabSlect SuRe, GE Healthcare), щоб видалити фрагменти Fc, катіонообмінну колонку (HiTrap SP HP, GE Healthcare) та гель-фільтраційну колонку (Superdex200 16/60, GE Healthcare). Фракції, що містили фрагмент Fab, об'єднали та зберігали при -80 °C.

9.3. Отримання комплексу Fab варіанта 305 та домену MG1 C5 людини

Очищений домен MG1 рекомбінантного C5 людини змішали з очищеним фрагментом Fab варіанта 305 у молярному відношенні 1:1. Комплекс очистили шляхом гель-фільтраційної хроматографії (Superdex200, збільшення 10/300, GE Healthcare), застосовуючи колонку, урівноважену 20 мМ HEPES pH 7,5, 100 мМ NaCl.

9.4. Кристалізація

Очищені комплекси концентрували до приблизно 10 мг/мл та виконували кристалізацію за способом дифузії пари у сидячій краплі у комбінації зі способом посіву при 4 °C. Розчин резервуару складався з 0,2 М дегідрату форміату магнію, 15,0 % мас./об. поліетиленгліколю 3350. За декілька днів це перетворилося у пласкі кристали. Кристал занурили у розчин 0,2 М дегідрату форміату магнію, 25,0 % мас./об. поліетиленгліколю 3350 та 20 % гліцерину.

9.5. Збір даних та визначення структури

Дані рентгенівської дифракції вимірювали на виводі опромінювання BL32XU з джерела SPring-8. Під час опромінювання кристал постійно знаходився у потоці азоту при -178 °C, щоб підтримувати заморожений стан, та загалом зібрали 180 рентгенівських дифракційних зображень, застосовуючи детектор MX-225HS CCD (RAYONIX), приєднаний до виводу опромінювання, при цьому кристал обертався на 1,0 градус за один раз. Визначення параметрів комірки, індексування дифракційних плям та обробку дифракційних даних, отриманих з дифракційних зображень, виконували, застосовуючи програму Xia2 (J. Appl. Cryst. 43:186-190 (2010), XDS Package (Acta. Cryst. D66:125-132 (2010)) та Scala (Acta. Cryst. D62:72-82 (2006)) та зрештою отримали дані інтенсивності дифракції аж до 2,11 ангстрема розрізнення. Статистичні кристалографічні дані наведено у Таблиці 11.

Таблиця 11

Сукупність даних рентгенівського аналізу та характеристики узгодження

Сукупність даних	
Просторова група	P1
Елементарна комірка	
a,b,c (Å)	39,79, 55,10, 127,76
α,β,γ (°)	89,18, 86,24, 78,20
Розрізнення (Å)	49,49-2,11
Загальна кількість рефлексів	112102
Кількість специфічних рефлексів	56154
Завершеність (оболонка найвищого розрізнення) (%)	92,1 (95,8)
R_{megre}[a] (оболонка найвищого розрізнення) (%)	7,2 (31,7)
Узгодження	
Розрізнення (Å)	25,00-2,11
Кількість рефлексів	53398
R-фактор[b] (R_{free}[c]) (%)	20,42 (26,44)
Середньоквадратичне відхилення від ідеального	
Довжина зв'язків Å)	0,0088
Кути зв'язку(°)	1,3441

a) $R_{megre} = \sum hkl \sum j |Ij(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum hkl \sum j |Ij(hkl)|$, де $Ij(hkl)$ та $I(hkl)$ - це інтенсивність вимірювання J та середня інтенсивність для рефлексу з індексами hkl, відповідно.

b) $R_{фактор} = \sum hkl ||F_{calc}(hkl)| - |F_{obs}(hkl)|| / \sum hkl |F_{obs}(hkl)|$, де F_{obs} та F_{calc} - це амплітуди структурного фактора, які спостерігаються та розраховані, відповідно.

c) R_{free} є розрахованим з 5% відхиленням випадково заданого рефлексу.

Структуру визначили шляхом молекулярного заміщення за допомогою програми Phaser (J. Appl. Cryst. 40:658-674 (2007)). Модель дослідження домену Fab отримали з опублікованої кристалічної структури Fab IgG4 людини (PDB код:1BBJ), та модель дослідження домену MG1 походить від опублікованої кристалічної структури C5 людини (PDB код: 3CU7, Nat.Immunol. 9:753-760 (2008)). Модель побудували за допомогою програми Coot (Acta Cryst. D66:486-501 (2010)) та узгодили за допомогою програми Refmac5 (Acta Cryst. D67:355-367 (2011)). Кристалографічний фактор достовірності (R) для різних даних інтенсивності дифракції від 25-2,11 ангстрем становив 20,42 % зі значенням вільного R-фактора у 26,44 %. Характеристики узгодження структури наведено у Таблиці 11.

9.6. Загальна структура комплексу Fab варіанта 305 та домену C5-MG1

Фрагмент Fab оптимізованого варіанта ("305 Fab"), що походить від 305, зв'язаний з доменом C5-MG1 людини ("MG1") у відношенні 1:1, та асиметрична одиниця кристалічної структури містила два комплекси, Молекули 1 та 2, як зображено на Фігурі 22A. Молекули 1 та 2 можна взаємно зорієнтувати належним чином при 0,717 ангстрем RMSD, використовуючи позицію атома C-альфа в усіх залишках, як показано на Фігурі 22B. Фігури, що обговорюються нижче, отримали із застосуванням Молекули 1.

На Фігурах 23A та 23B епітоп контактної ділянки Fab 305 картований в амінокислотній послідовності MG1 та кристалічній структурі, відповідно. Епітоп включає амінокислотні залишки MG1, які містять один або більше атомів, розташованих у межах відстані 4,5 ангстрема від частини Fab 305 у кристалічній структурі. Крім того, епітоп у межах 3,0 ангстрема виділено на Фігурі 23A.

9.7. Взаємодії E48, D51 та K109

Як описано у Прикладах 4.5 та 4.6, MAb проти C5, які включають серію, що походить від антитіла 305, тестували щодо зв'язування з трьома точковими мутантами C5 людини - E48A, D51A та K109A - за допомогою аналізів зв'язування з використанням вестерн-блотингу та BIACORE (зареєстрована торговельна марка). У той час, коли варіанти 305 зв'язувалися сильно з природним C5, вони тільки слабо зв'язувалися з мутантом C5 E48A та не зв'язувалися з мутантами D51A та K109A. Кристалічна структура комплексу Fab305 та MG1 дозволила виявити, що три амінокислоти: E48, D51 та K109 - усі знаходяться у межах відстані 3,0 ангстрема від Fab305, утворюючи ряд водневих зв'язків з Fab, як показано на Фігурі 24A. Після

докладнішого дослідження залишок K109 MG1 заглиблюється у канавку, утворену на поверхні взаємодії важкого ланцюга Fab, та щільно взаємодіє з Fab за допомогою трьох водневих зв'язків з H-CDR3_G97, H-CDR3_Y100 та H-CDR3_T100b та за допомогою сольового містка з H-CDR3_D95 (Фігура 24D). D51 розташований між MG1 та важким ланцюгом Fab305 та утворює два водневі зв'язки з H-CDR1_Ser32 та H-CDR2_Ser54, заповнюючи простір (Фігура 24C). Це вказує на те, що як K109, так і D51 C5 є вирішальними залишками для зв'язування антитіл серії 305. З іншого боку, E48 розташований ближче до поверхні та утворює тільки один водневий зв'язок з Fab, що дозволяє припустити, що його внесок у зв'язування антитіла буде меншим, ніж внесок K109 та D51 (Фігура 24B). Ці взаємозв'язки відповідають результатам аналізів зв'язування з використанням вестерн-блотингу та BIACORE (зареєстрована торговельна марка) мутантів C5 людини (Приклади 4.5 та 4.6). Додаткове зауваження: нумерація залишків для амінокислот Fab базується на схемі номенклатури Кебота. (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991).

9.8. Взаємодії H70, H72 та H110 C5 людини та антитіл серії 305

Аналіз кристалічної структури дозволив виявити, що три залишки гістидину в C5 людини, а саме H70, H72 та H110, включені в епітоп Fab варіантів 305, як показано на Фігурі 23A та Фігурі 25A. Аналіз зв'язування BIACORE (зареєстрована торговельна марка) виконували для того, щоб дослідити внесок цих залишків гістидину до залежної від pH взаємодії білок-білок між C5 людини та Fab варіантів 305, застосовуючи мутантів C5 людини: H70Y, H72Y, H110Y та H70Y+H110Y (Приклад 4.7). H72Y зумовив повну втрату зв'язування Fab варіантів 305 з C5. Цей залишок C5 розташований у гаманці, утвореному петлею CDR2 важкого ланцюга Fab 305 та петлею MG1 (L73, S74 та E76), та щільно заповнює цей простір, як показано на Фігурі 25C. Крім того, залишок H72 C5 утворює водневий зв'язок з H-CDR2_Y58. Не очікується, що мутація H72Y буде допускатися, оскільки немає достатнього простору для розташування більш громіздкого бічного ланцюга тирозину. Також не може підтримуватися водневий зв'язок з H-CDR2_Y58. Щодо внеску H70 та H110 у залежність від pH, то внаслідок мутацій H70Y та H110Y уповільнилася дисоціація Fab варіантів 305 від C5 при pH 5,8. H70 утворює внутрішньомолекулярний водневий зв'язок з T53 MG1, який, як вважають, обірветься при pH 5,8, коли протонування H70 C5 спричиняє конформаційну зміну у відповідній частині поверхні взаємодії MG1 (Фігура 25B). Очікується, що для H110 протонування цього залишку C5 спричинить відштовхування заряду від Fab 305, що може бути підсиленим протонуванням сусіднього залишку гістидину H-CDR3_H100c (Фігура 25 D).

Незважаючи на те, що вищезазначений винахід було описано детально шляхом ілюстрацій та наведенням прикладів з метою сприяння розумінню, описи та приклади не слід розглядати як такі, що обмежують обсяг винаходу. Зміст усієї патентної та наукової літератури, процитованої у цьому описі винаходу, особливо включено у повному обсязі шляхом посилань.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ЧУГЕЙ СЕЙЯКУ КАБУСІКІ КАЙСЯ (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)

<120> АНТИТІЛА ПРОТИ C5 ТА СПОСОБИ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> C1-A1412P

<150> JP 2014-257647
<151> 2014-12-19

<160> 150

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 1

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

Leu Ala Val Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Ser Ser Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu
65 70 75 80

Gln Met Thr Ser Leu Thr Val Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Ser Asp Gly Gly Tyr Val Thr Pro Thr His Ala Met Tyr Leu Trp Gly
100 105 110

Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2
<211> 117
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 2

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

Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Asn Phe Tyr
20 25 30

Tyr Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Leu Ile
35 40 45

Ala Cys Ile Tyr Thr Val Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu
65 70 75 80

Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Leu His Ala Gly Ile Thr Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3

<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 3

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

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ala Gly Leu Asp Phe Ser Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ile Ile Tyr Tyr Ala Asn Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Pro Ser Ser Thr Thr Val Thr
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Thr Tyr Pro Thr Tyr Gly Asp Gly Gly His Ala Phe Asn Leu Trp
100 105 110

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 117
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 4

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Gly Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met
65 70 75 80

Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gln
85 90 95

Ile Tyr Ser Gly Asp Asn Asn Asp Asn Phe Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 117
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 5

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Gly Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met
65 70 75 80

Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gln
85 90 95

Ile Tyr Ser Gly Asp Asn Asn Asp Asn Phe Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 117
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 6

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Leu Ser Leu Ser Asp Asn Thr
20 25 30

Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Ile Ile Ser Phe Gly Gly Asp Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Pro Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Arg Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Val Gly
85 90 95

Ala Gly Asn Ile Phe Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 116
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 7

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Ala
20 25 30

Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Thr Ile Asp Thr Gly Asp Asn Ser Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asn Asp
85 90 95

Gly Ser Val Tyr Asn Leu Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 8

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Gly Asn Ala

20 25 30

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

Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ala Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
85 90 95

Ser Gly Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 9
<211> 116
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 9

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Ala
20 25 30

Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Thr Ile Asp Thr Gly Asp Asn Ser Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asn Asp
85 90 95

Gly Ser Val Tyr Asn Leu Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 123
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 10

Gln 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 Ser His Ser Ser
20 25 30

Tyr Tyr Val Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Ala Ile Tyr Thr Gly Ser Gly Ala Thr Tyr Lys Ala Ser Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Asp Gly Gly Tyr Asp Tyr Pro Thr His Ala Met His Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 11

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Gly Ser Asp
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Phe Val Gly Ser Ser
85 90 95

Tyr Gly Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 12
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 12

Ala Ile Glu Met Thr Gln Thr Pro Phe Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Tyr Ser Tyr Ser Asn
85 90 95

Val Asp Asp Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 13

Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Ser Ser
20 25 30

Asp Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Thr Tyr Tyr Ser
85 90 95

Ser Gly Trp Tyr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 14
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 14

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Asn Trp
20 25 30

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

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
65 70 75 80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Val Val Glu
100 105 110

<210> 15
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 15

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Asn Trp
20 25 30

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

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
65 70 75 80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Val Val Val Glu
100 105 110

<210> 16
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 16

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Thr Asn
85 90 95

Val His Asn Ser Phe Gly Gly Gly Thr Thr Val Val Val Glu
100 105 110

<210> 17
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 17

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Ala
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Leu Arg Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Ile Asn Ser
85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Val Val Glu
100 105 110

<210> 18
<211> 111
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 18

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Pro Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Ala Tyr Gly Ser Ser
85 90 95

Asp Val Gly Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Val Val Val Glu
100 105 110

<210> 19
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 19

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Ala
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Leu Arg Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Ile Asn Ser
85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Val Val Glu
100 105 110

<210> 20
<211> 110

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 20

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Gly 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 Gly Ala Ser Lys Thr His 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 Tyr Cys Gln Ser Thr Lys Val Gly Ser Ser
85 90 95

Tyr Gly Asn His Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 21
<211> 117
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 21

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Glu Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Trp Asn Ser Gly Tyr
20 25 30

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

Ala Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Ala Asn Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Gly Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg His Asp Asp Tyr Phe Phe Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 22
<211> 115
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 22

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Thr
20 25 30

Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Cys Ile Gly
35 40 45

Tyr Ile His Ser Phe Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Glu Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Val
85 90 95

Gly Gly Ser Ser Gly Trp Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 116
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 23

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Cys Ile Gly Thr Ile Ser Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Pro Ile Ser Lys Ala Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu
65 70 75 80

Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Pro Tyr Ser Tyr Gly Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 125
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 24

Gln Glu Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Glu Gly
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

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

Ile Ala Cys Ile Tyr Gly Gly Ser Val Gly Gly Thr Asp Tyr Ala Ser
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val
65 70 75 80

Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95

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

Lys Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 25
<211> 114
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 25

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Ser Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Pro Thr Leu Thr Asn Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Gly Val Gln Cys Ala Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Trp
85 90 95

Tyr Gly Asn Ser Tyr Val Ala Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val
100 105 110

Val Lys

<210> 26
<211> 112
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 26

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Tyr Asp Ser Thr Ser
85 90 95

Ser Ser Phe Gly Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 27
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 27

Asp Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Tyr Gly Phe Ser
85 90 95

Tyr Gly Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 28
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 28

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Thr Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Thr
85 90 95

Ser Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 29
<211> 448
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 29

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

```
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

Trp Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Glu Tyr Thr Glu Asn Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Pro Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
        115                 120                 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
    130                 135                 140

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

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
                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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
        195                 200                 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
    210                 215                 220

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
            260                 265                 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        275                 280                 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    290                 295                 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305                 310                 315                 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
                325                 330                 335

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

340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 30
<211> 214
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 30

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 Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp 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 Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu
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
210

<210> 31
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 31

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Glu Tyr Thr Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Pro Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 32

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 Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp 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 Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 33
<211> 325
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 33

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Arg Gly Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu
325

<210> 34
<211> 325
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 34

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Arg Gly Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Tyr His Val Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu
325

<210> 35
<211> 325
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 35

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Arg Gly Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 36

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Cys
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 37
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 37

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 38
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 38

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 39
<211> 1676
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Met Gly Leu Leu Gly Ile Leu Cys Phe Leu Ile Phe Leu Gly Lys Thr
1 5 10 15

Trp Gly Gln Glu Gln Thr Tyr Val Ile Ser Ala Pro Lys Ile Phe Arg
20 25 30

Val Gly Ala Ser Glu Asn Ile Val Ile Gln Val Tyr Gly Tyr Thr Glu
35 40 45

Ala Phe Asp Ala Thr Ile Ser Ile Lys Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Phe
50 55 60

Ser Tyr Ser Ser Gly His Val His Leu Ser Ser Glu Asn Lys Phe Gln
65 70 75 80

Asn Ser Ala Ile Leu Thr Ile Gln Pro Lys Gln Leu Pro Gly Gly Gln
85 90 95

Asn Pro Val Ser Tyr Val Tyr Leu Glu Val Val Ser Lys His Phe Ser
100 105 110

Lys Ser Lys Arg Met Pro Ile Thr Tyr Asp Asn Gly Phe Leu Phe Ile
115 120 125

His Thr Asp Lys Pro Val Tyr Thr Pro Asp Gln Ser Val Lys Val Arg
130 135 140

Val Tyr Ser Leu Asn Asp Asp Leu Lys Pro Ala Lys Arg Glu Thr Val
145 150 155 160

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

```
Ile Asp His Ile Gly Ile Ile Ser Phe Pro Asp Phe Lys Ile Pro Ser
            180                 185                 190

Asn Pro Arg Tyr Gly Met Trp Thr Ile Lys Ala Lys Tyr Lys Glu Asp
        195                 200                 205

Phe Ser Thr Thr Gly Thr Ala Tyr Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu
    210                 215                 220

Pro His Phe Ser Val Ser Ile Glu Pro Glu Tyr Asn Phe Ile Gly Tyr
225                 230                 235                 240

Lys Asn Phe Lys Asn Phe Glu Ile Thr Ile Lys Ala Arg Tyr Phe Tyr
                245                 250                 255

Asn Lys Val Val Thr Glu Ala Asp Val Tyr Ile Thr Phe Gly Ile Arg
            260                 265                 270

Glu Asp Leu Lys Asp Asp Gln Lys Glu Met Met Gln Thr Ala Met Gln
        275                 280                 285

Asn Thr Met Leu Ile Asn Gly Ile Ala Gln Val Thr Phe Asp Ser Glu
    290                 295                 300

Thr Ala Val Lys Glu Leu Ser Tyr Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Asn Asn
305                 310                 315                 320

Lys Tyr Leu Tyr Ile Ala Val Thr Val Ile Glu Ser Thr Gly Gly Phe
                325                 330                 335

Ser Glu Glu Ala Glu Ile Pro Gly Ile Lys Tyr Val Leu Ser Pro Tyr
            340                 345                 350

Lys Leu Asn Leu Val Ala Thr Pro Leu Phe Leu Lys Pro Gly Ile Pro
        355                 360                 365

Tyr Pro Ile Lys Val Gln Val Lys Asp Ser Leu Asp Gln Leu Val Gly
    370                 375                 380

Gly Val Pro Val Thr Leu Asn Ala Gln Thr Ile Asp Val Asn Gln Glu
385                 390                 395                 400

Thr Ser Asp Leu Asp Pro Ser Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly
                405                 410                 415

Val Ala Ser Phe Val Leu Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu
            420                 425                 430

Phe Asn Val Lys Thr Asp Ala Pro Asp Leu Pro Glu Glu Asn Gln Ala
        435                 440                 445

Arg Glu Gly Tyr Arg Ala Ile Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr
    450                 455                 460

Leu Tyr Ile Asp Trp Thr Asp Asn His Lys Ala Leu Leu Val Gly Glu
465                 470                 475                 480

His Leu Asn Ile Ile Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile
                485                 490                 495
```

Thr His Tyr Asn Tyr Leu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Ile Ile His Phe
500 505 510

Gly Thr Arg Glu Lys Phe Ser Asp Ala Ser Tyr Gln Ser Ile Asn Ile
515 520 525

Pro Val Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ser Arg Leu Leu Val Tyr Tyr
530 535 540

Ile Val Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ser Asp Ser Val Trp
545 550 555 560

Leu Asn Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser
565 570 575

Pro Asp Ala Asp Ala Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asn Met
580 585 590

Ala Thr Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Ala Ala Val Asp Ser Ala
595 600 605

Val Tyr Gly Val Gln Arg Gly Ala Lys Lys Pro Leu Glu Arg Val Phe
610 615 620

Gln Phe Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu
625 630 635 640

Asn Asn Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn
645 650 655

Ala Asn Ala Asp Asp Ser Gln Glu Asn Asp Glu Pro Cys Lys Glu Ile
660 665 670

Leu Arg Pro Arg Arg Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala
675 680 685

Lys Tyr Lys His Ser Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys
690 695 700

Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu
705 710 715 720

Gly Pro Arg Cys Ile Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser
725 730 735

Gln Leu Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg Leu
740 745 750

His Met Lys Thr Leu Leu Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser Tyr
755 760 765

Phe Pro Glu Ser Trp Leu Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg Lys
770 775 780

Gln Leu Gln Phe Ala Leu Pro Asp Ser Leu Thr Thr Trp Glu Ile Gln
785 790 795 800

Gly Val Gly Ile Ser Asn Thr Gly Ile Cys Val Ala Asp Thr Val Lys
805 810 815

Ala Lys Val Phe Lys Asp Val Phe Leu Glu Met Asn Ile Pro Tyr Ser

```
                820                 825                 830

Val Val Arg Gly Glu Gln Ile Gln Leu Lys Gly Thr Val Tyr Asn Tyr
        835                 840                 845

Arg Thr Ser Gly Met Gln Phe Cys Val Lys Met Ser Ala Val Glu Gly
    850                 855                 860

Ile Cys Thr Ser Glu Ser Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys Ser
865                 870                 875                 880

Ser Lys Cys Val Arg Gln Lys Val Glu Gly Ser Ser Ser His Leu Val
                885                 890                 895

Thr Phe Thr Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu His Asn Ile Asn Phe
            900                 905                 910

Ser Leu Glu Thr Trp Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Thr Leu Arg
        915                 920                 925

Val Val Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Val Thr Leu
    930                 935                 940

Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro
945                 950                 955                 960

Tyr Arg Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile
                965                 970                 975

Leu Ser Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu
            980                 985                 990

Ser Gln Glu Gly Ile Asn Ile Leu  Thr His Leu Pro Lys  Gly Ser Ala
        995                 1000                1005

Glu Ala  Glu Leu Met Ser Val  Val Pro Val Phe Tyr  Val Phe His
    1010                1015                1020

Tyr Leu  Glu Thr Gly Asn His  Trp Asn Ile Phe His  Ser Asp Pro
    1025                1030                1035

Leu Ile  Glu Lys Gln Lys Leu  Lys Lys Lys Leu Lys  Glu Gly Met
    1040                1045                1050

Leu Ser  Ile Met Ser Tyr Arg  Asn Ala Asp Tyr Ser  Tyr Ser Val
    1055                1060                1065

Trp Lys  Gly Gly Ser Ala Ser  Thr Trp Leu Thr Ala  Phe Ala Leu
    1070                1075                1080

Arg Val  Leu Gly Gln Val Asn  Lys Tyr Val Glu Gln  Asn Gln Asn
    1085                1090                1095

Ser Ile  Cys Asn Ser Leu Leu  Trp Leu Val Glu Asn  Tyr Gln Leu
    1100                1105                1110

Asp Asn  Gly Ser Phe Lys Glu  Asn Ser Gln Tyr Gln  Pro Ile Lys
    1115                1120                1125

Leu Gln  Gly Thr Leu Pro Val  Glu Ala Arg Glu Asn  Ser Leu Tyr
    1130                1135                1140
```

Leu Thr Ala Phe Thr Val Ile Gly Ile Arg Lys Ala Phe Asp Ile
1145 1150 1155

Cys Pro Leu Val Lys Ile Asp Thr Ala Leu Ile Lys Ala Asp Asn
1160 1165 1170

Phe Leu Leu Glu Asn Thr Leu Pro Ala Gln Ser Thr Phe Thr Leu
1175 1180 1185

Ala Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Leu Gly Asp Lys Thr His Pro
1190 1195 1200

Gln Phe Arg Ser Ile Val Ser Ala Leu Lys Arg Glu Ala Leu Val
1205 1210 1215

Lys Gly Asn Pro Pro Ile Tyr Arg Phe Trp Lys Asp Asn Leu Gln
1220 1225 1230

His Lys Asp Ser Ser Val Pro Asn Thr Gly Thr Ala Arg Met Val
1235 1240 1245

Glu Thr Thr Ala Tyr Ala Leu Leu Thr Ser Leu Asn Leu Lys Asp
1250 1255 1260

Ile Asn Tyr Val Asn Pro Val Ile Lys Trp Leu Ser Glu Glu Gln
1265 1270 1275

Arg Tyr Gly Gly Gly Phe Tyr Ser Thr Gln Asp Thr Ile Asn Ala
1280 1285 1290

Ile Glu Gly Leu Thr Glu Tyr Ser Leu Leu Val Lys Gln Leu Arg
1295 1300 1305

Leu Ser Met Asp Ile Asp Val Ser Tyr Lys His Lys Gly Ala Leu
1310 1315 1320

His Asn Tyr Lys Met Thr Asp Lys Asn Phe Leu Gly Arg Pro Val
1325 1330 1335

Glu Val Leu Leu Asn Asp Asp Leu Ile Val Ser Thr Gly Phe Gly
1340 1345 1350

Ser Gly Leu Ala Thr Val His Val Thr Thr Val Val His Lys Thr
1355 1360 1365

Ser Thr Ser Glu Glu Val Cys Ser Phe Tyr Leu Lys Ile Asp Thr
1370 1375 1380

Gln Asp Ile Glu Ala Ser His Tyr Arg Gly Tyr Gly Asn Ser Asp
1385 1390 1395

Tyr Lys Arg Ile Val Ala Cys Ala Ser Tyr Lys Pro Ser Arg Glu
1400 1405 1410

Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ser His Ala Val Met Asp Ile Ser Leu
1415 1420 1425

Pro Thr Gly Ile Ser Ala Asn Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu Val
1430 1435 1440

Glu Gly Val Asp Gln Leu Phe Thr Asp Tyr Gln Ile Lys Asp Gly
1445 1450 1455

His Val Ile Leu Gln Leu Asn Ser Ile Pro Ser Ser Asp Phe Leu
1460 1465 1470

Cys Val Arg Phe Arg Ile Phe Glu Leu Phe Glu Val Gly Phe Leu
1475 1480 1485

Ser Pro Ala Thr Phe Thr Val Tyr Glu Tyr His Arg Pro Asp Lys
1490 1495 1500

Gln Cys Thr Met Phe Tyr Ser Thr Ser Asn Ile Lys Ile Gln Lys
1505 1510 1515

Val Cys Glu Gly Ala Ala Cys Lys Cys Val Glu Ala Asp Cys Gly
1520 1525 1530

Gln Met Gln Glu Glu Leu Asp Leu Thr Ile Ser Ala Glu Thr Arg
1535 1540 1545

Lys Gln Thr Ala Cys Lys Pro Glu Ile Ala Tyr Ala Tyr Lys Val
1550 1555 1560

Ser Ile Thr Ser Ile Thr Val Glu Asn Val Phe Val Lys Tyr Lys
1565 1570 1575

Ala Thr Leu Leu Asp Ile Tyr Lys Thr Gly Glu Ala Val Ala Glu
1580 1585 1590

Lys Asp Ser Glu Ile Thr Phe Ile Lys Lys Val Thr Cys Thr Asn
1595 1600 1605

Ala Glu Leu Val Lys Gly Arg Gln Tyr Leu Ile Met Gly Lys Glu
1610 1615 1620

Ala Leu Gln Ile Lys Tyr Asn Phe Ser Phe Arg Tyr Ile Tyr Pro
1625 1630 1635

Leu Asp Ser Leu Thr Trp Ile Glu Tyr Trp Pro Arg Asp Thr Thr
1640 1645 1650

Cys Ser Ser Cys Gln Ala Phe Leu Ala Asn Leu Asp Glu Phe Ala
1655 1660 1665

Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys
1670 1675

<210> 40
<211> 673
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Gly Leu Leu Gly Ile Leu Cys Phe Leu Ile Phe Leu Gly Lys Thr
1 5 10 15

Trp Gly Gln Glu Gln Thr Tyr Val Ile Ser Ala Pro Lys Ile Phe Arg
20 25 30

Val Gly Ala Ser Glu Asn Ile Val Ile Gln Val Tyr Gly Tyr Thr Glu
35 40 45

Ala Phe Asp Ala Thr Ile Ser Ile Lys Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Phe
50 55 60

Ser Tyr Ser Ser Gly His Val His Leu Ser Ser Glu Asn Lys Phe Gln
65 70 75 80

Asn Ser Ala Ile Leu Thr Ile Gln Pro Lys Gln Leu Pro Gly Gly Gln
85 90 95

Asn Pro Val Ser Tyr Val Tyr Leu Glu Val Val Ser Lys His Phe Ser
100 105 110

Lys Ser Lys Arg Met Pro Ile Thr Tyr Asp Asn Gly Phe Leu Phe Ile
115 120 125

His Thr Asp Lys Pro Val Tyr Thr Pro Asp Gln Ser Val Lys Val Arg
130 135 140

Val Tyr Ser Leu Asn Asp Asp Leu Lys Pro Ala Lys Arg Glu Thr Val
145 150 155 160

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

Ile Asp His Ile Gly Ile Ile Ser Phe Pro Asp Phe Lys Ile Pro Ser
180 185 190

Asn Pro Arg Tyr Gly Met Trp Thr Ile Lys Ala Lys Tyr Lys Glu Asp
195 200 205

Phe Ser Thr Thr Gly Thr Ala Tyr Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu
210 215 220

Pro His Phe Ser Val Ser Ile Glu Pro Glu Tyr Asn Phe Ile Gly Tyr
225 230 235 240

Lys Asn Phe Lys Asn Phe Glu Ile Thr Ile Lys Ala Arg Tyr Phe Tyr
245 250 255

Asn Lys Val Val Thr Glu Ala Asp Val Tyr Ile Thr Phe Gly Ile Arg
260 265 270

Glu Asp Leu Lys Asp Asp Gln Lys Glu Met Met Gln Thr Ala Met Gln
275 280 285

Asn Thr Met Leu Ile Asn Gly Ile Ala Gln Val Thr Phe Asp Ser Glu
290 295 300

Thr Ala Val Lys Glu Leu Ser Tyr Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Asn Asn
305 310 315 320

Lys Tyr Leu Tyr Ile Ala Val Thr Val Ile Glu Ser Thr Gly Gly Phe
325 330 335

Ser Glu Glu Ala Glu Ile Pro Gly Ile Lys Tyr Val Leu Ser Pro Tyr
340 345 350

Lys Leu Asn Leu Val Ala Thr Pro Leu Phe Leu Lys Pro Gly Ile Pro

```
          355                 360                 365

Tyr Pro Ile Lys Val Gln Val Lys Asp Ser Leu Asp Gln Leu Val Gly
    370                 375                 380

Gly Val Pro Val Thr Leu Asn Ala Gln Thr Ile Asp Val Asn Gln Glu
385                 390                 395                 400

Thr Ser Asp Leu Asp Pro Ser Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly
                405                 410                 415

Val Ala Ser Phe Val Leu Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu
            420                 425                 430

Phe Asn Val Lys Thr Asp Ala Pro Asp Leu Pro Glu Glu Asn Gln Ala
          435                 440                 445

Arg Glu Gly Tyr Arg Ala Ile Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr
    450                 455                 460

Leu Tyr Ile Asp Trp Thr Asp Asn His Lys Ala Leu Leu Val Gly Glu
465                 470                 475                 480

His Leu Asn Ile Ile Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile
                485                 490                 495

Thr His Tyr Asn Tyr Leu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Ile Ile His Phe
            500                 505                 510

Gly Thr Arg Glu Lys Phe Ser Asp Ala Ser Tyr Gln Ser Ile Asn Ile
          515                 520                 525

Pro Val Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ser Arg Leu Leu Val Tyr Tyr
    530                 535                 540

Ile Val Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ser Asp Ser Val Trp
545                 550                 555                 560

Leu Asn Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser
                565                 570                 575

Pro Asp Ala Asp Ala Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asn Met
            580                 585                 590

Ala Thr Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Ala Ala Val Asp Ser Ala
          595                 600                 605

Val Tyr Gly Val Gln Arg Gly Ala Lys Lys Pro Leu Glu Arg Val Phe
    610                 615                 620

Gln Phe Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu
625                 630                 635                 640

Asn Asn Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn
                645                 650                 655

Ala Asn Ala Asp Asp Ser Gln Glu Asn Asp Glu Pro Cys Lys Glu Ile
            660                 665                 670

Leu
```

<210> 41
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Glu Gln Thr Tyr Val Ile Ser Ala Pro Lys Ile Phe Arg Val Gly Ala
1 5 10 15

Ser Glu Asn Ile Val Ile Gln Val Tyr Gly Tyr Thr Glu Ala Phe Asp
20 25 30

Ala Thr Ile Ser Ile Lys Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Phe Ser Tyr Ser
35 40 45

Ser Gly His Val His Leu Ser Ser Glu Asn Lys Phe Gln Asn Ser Ala
50 55 60

Ile Leu Thr Ile Gln Pro Lys Gln Leu Pro Gly Gly Gln Asn Pro Val
65 70 75 80

Ser Tyr Val Tyr Leu Glu Val Val Ser Lys His Phe Ser Lys Ser Lys
85 90 95

Arg Met Pro Ile Thr Tyr Asp Asn Gly
100 105

<210> 42
<211> 101
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Phe Leu Phe Ile His Thr Asp Lys Pro Val Tyr Thr Pro Asp Gln Ser
1 5 10 15

Val Lys Val Arg Val Tyr Ser Leu Asn Asp Asp Leu Lys Pro Ala Lys
20 25 30

Arg Glu Thr Val Leu Thr Phe Ile Asp Pro Glu Gly Ser Glu Val Asp
35 40 45

Met Val Glu Glu Ile Asp His Ile Gly Ile Ile Ser Phe Pro Asp Phe
50 55 60

Lys Ile Pro Ser Asn Pro Arg Tyr Gly Met Trp Thr Ile Lys Ala Lys
65 70 75 80

Tyr Lys Glu Asp Phe Ser Thr Thr Gly Thr Ala Tyr Phe Glu Val Lys
85 90 95

Glu Tyr Val Leu Pro
100

<210> 43
<211> 225
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Gly Leu Leu Gly Ile Leu Cys Phe Leu Ile Phe Leu Gly Lys Thr
1 5 10 15

Trp Gly Gln Glu Gln Thr Tyr Val Ile Ser Ala Pro Lys Ile Phe Arg
20 25 30

Val Gly Ala Ser Glu Asn Ile Val Ile Gln Val Tyr Gly Tyr Thr Glu
35 40 45

Ala Phe Asp Ala Thr Ile Ser Ile Lys Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Phe
50 55 60

Ser Tyr Ser Ser Gly His Val His Leu Ser Ser Glu Asn Lys Phe Gln
65 70 75 80

Asn Ser Ala Ile Leu Thr Ile Gln Pro Lys Gln Leu Pro Gly Gly Gln
85 90 95

Asn Pro Val Ser Tyr Val Tyr Leu Glu Val Val Ser Lys His Phe Ser
100 105 110

Lys Ser Lys Arg Met Pro Ile Thr Tyr Asp Asn Gly Phe Leu Phe Ile
115 120 125

His Thr Asp Lys Pro Val Tyr Thr Pro Asp Gln Ser Val Lys Val Arg
130 135 140

Val Tyr Ser Leu Asn Asp Asp Leu Lys Pro Ala Lys Arg Glu Thr Val
145 150 155 160

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

Ile Asp His Ile Gly Ile Ile Ser Phe Pro Asp Phe Lys Ile Pro Ser
180 185 190

Asn Pro Arg Tyr Gly Met Trp Thr Ile Lys Ala Lys Tyr Lys Glu Asp
195 200 205

Phe Ser Thr Thr Gly Thr Ala Tyr Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu
210 215 220

Pro
225

<210> 44
<211> 1676
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 44

Met Gly Leu Leu Gly Ile Leu Cys Phe Leu Ile Phe Leu Gly Lys Thr
1 5 10 15

Trp Gly Gln Glu Gln Thr Tyr Val Ile Ser Ala Pro Lys Ile Phe Arg
20 25 30

Val Gly Ala Ser Glu Asn Ile Val Ile Gln Val Tyr Gly Tyr Thr Glu
35 40 45

Ala Phe Asp Ala Thr Ile Ser Ile Lys Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Phe
50 55 60

Ser Tyr Ser Ser Gly His Val His Leu Ser Ser Glu Asn Lys Phe Gln
65 70 75 80

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

Asn Gln Val Ser Tyr Val Tyr Leu Glu Val Val Ser Lys His Phe Ser
100 105 110

Lys Ser Lys Lys Ile Pro Ile Thr Tyr Asp Asn Gly Phe Leu Phe Ile
115 120 125

His Thr Asp Lys Pro Val Tyr Thr Pro Asp Gln Ser Val Lys Val Arg
130 135 140

Val Tyr Ser Leu Asn Asp Asp Leu Lys Pro Ala Lys Arg Glu Thr Val
145 150 155 160

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

Ile Asp His Ile Gly Ile Ile Ser Phe Pro Asp Phe Lys Ile Pro Ser
180 185 190

Asn Pro Arg Tyr Gly Met Trp Thr Ile Gln Ala Lys Tyr Lys Glu Asp
195 200 205

Phe Ser Thr Thr Gly Thr Ala Phe Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu
210 215 220

Pro His Phe Ser Val Ser Val Glu Pro Glu Ser Asn Phe Ile Gly Tyr
225 230 235 240

Lys Asn Phe Lys Asn Phe Glu Ile Thr Ile Lys Ala Arg Tyr Phe Tyr
245 250 255

Asn Lys Val Val Thr Glu Ala Asp Val Tyr Ile Thr Phe Gly Ile Arg
260 265 270

Glu Asp Leu Lys Asp Asp Gln Lys Glu Met Met Gln Thr Ala Met Gln
275 280 285

Asn Thr Met Leu Ile Asn Gly Ile Ala Glu Val Thr Phe Asp Ser Glu
290 295 300

Thr Ala Val Lys Glu Leu Ser Tyr Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Asn Asn
305 310 315 320

Lys Tyr Leu Tyr Ile Ala Val Thr Val Ile Glu Ser Thr Gly Gly Phe
325 330 335

Ser Glu Glu Ala Glu Ile Pro Gly Ile Lys Tyr Val Leu Ser Pro Tyr
340 345 350

Lys Leu Asn Leu Val Ala Thr Pro Leu Phe Leu Lys Pro Gly Ile Pro

```
          355                 360                 365

Tyr Ser Ile Lys Val Gln Val Lys Asp Ala Leu Asp Gln Leu Val Gly
    370                 375                 380

Gly Val Pro Val Thr Leu Asn Ala Gln Thr Ile Asp Val Asn Gln Glu
385                 390                 395                 400

Thr Ser Asp Leu Glu Pro Arg Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly
                405                 410                 415

Val Ala Ser Phe Val Val Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu
            420                 425                 430

Phe Asn Val Lys Thr Asp Ala Pro Asp Leu Pro Asp Glu Asn Gln Ala
          435                 440                 445

Arg Glu Gly Tyr Arg Ala Ile Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr
    450                 455                 460

Leu Tyr Ile Asp Trp Thr Asp Asn His Lys Ala Leu Leu Val Gly Glu
465                 470                 475                 480

Tyr Leu Asn Ile Ile Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile
                485                 490                 495

Thr His Tyr Asn Tyr Leu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Ile Ile His Phe
            500                 505                 510

Gly Thr Arg Glu Lys Leu Ser Asp Ala Ser Tyr Gln Ser Ile Asn Ile
          515                 520                 525

Pro Val Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ser Arg Leu Leu Val Tyr Tyr
    530                 535                 540

Ile Val Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ser Asp Ser Val Trp
545                 550                 555                 560

Leu Asn Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser
                565                 570                 575

Pro Asp Ala Asp Thr Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asn Met
            580                 585                 590

Val Thr Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Thr Ala Val Asp Ser Ala
          595                 600                 605

Val Tyr Gly Val Gln Arg Arg Ala Lys Lys Pro Leu Glu Arg Val Phe
    610                 615                 620

Gln Phe Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu
625                 630                 635                 640

Asn Asn Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn
                645                 650                 655

Ala Asn Ala Asp Asp Ser Gln Glu Asn Asp Glu Pro Cys Lys Glu Ile
            660                 665                 670

Ile Arg Pro Arg Arg Met Leu Gln Glu Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala
          675                 680                 685
```

```
Lys Tyr Lys His Leu Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Val Arg
    690                 695                 700

Ile Asn His Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Val
705                 710                 715                 720

Gly Pro Arg Cys Val Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser
                725                 730                 735

Gln Leu Arg Ala Asn Asn Ser His Lys Asp Leu Gln Leu Gly Arg Leu
            740                 745                 750

His Met Lys Thr Leu Leu Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser Tyr
        755                 760                 765

Phe Pro Glu Ser Trp Leu Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg Lys
    770                 775                 780

Gln Leu Gln Phe Ala Leu Pro Asp Ser Val Thr Thr Trp Glu Ile Gln
785                 790                 795                 800

Gly Val Gly Ile Ser Asn Ser Gly Ile Cys Val Ala Asp Thr Ile Lys
                805                 810                 815

Ala Lys Val Phe Lys Asp Val Phe Leu Glu Met Asn Ile Pro Tyr Ser
            820                 825                 830

Val Val Arg Gly Glu Gln Val Gln Leu Lys Gly Thr Val Tyr Asn Tyr
        835                 840                 845

Arg Thr Ser Gly Met Gln Phe Cys Val Lys Met Ser Ala Val Glu Gly
    850                 855                 860

Ile Cys Thr Ser Glu Ser Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys Ser
865                 870                 875                 880

Ser Lys Cys Val Arg Gln Lys Val Glu Gly Ser Ser Asn His Leu Val
                885                 890                 895

Thr Phe Thr Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu Gln Asn Ile Asn Phe
            900                 905                 910

Ser Leu Glu Thr Ser Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Ser Leu Arg
        915                 920                 925

Val Val Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Leu
    930                 935                 940

Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro
945                 950                 955                 960

Tyr Arg Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile
                965                 970                 975

Leu Ser Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu
            980                 985                 990

Ser Arg Glu Gly Ile Asn Ile Leu  Thr His Leu Pro Lys  Gly Ser Ala
        995                 1000                1005
```

```
Glu Ala  Glu Leu Met Ser Val  Val Pro Val Phe Tyr  Val Phe His
    1010                 1015                 1020

Tyr Leu  Glu Thr Gly Asn His  Trp Asn Ile Phe His  Ser Asp Pro
    1025                 1030                 1035

Leu Ile  Glu Lys Arg Asn Leu  Glu Lys Lys Leu Lys  Glu Gly Met
    1040                 1045                 1050

Val Ser  Ile Met Ser Tyr Arg  Asn Ala Asp Tyr Ser  Tyr Ser Val
    1055                 1060                 1065

Trp Lys  Gly Gly Ser Ala Ser  Thr Trp Leu Thr Ala  Phe Ala Leu
    1070                 1075                 1080

Arg Val  Leu Gly Gln Val His  Lys Tyr Val Glu Gln  Asn Gln Asn
    1085                 1090                 1095

Ser Ile  Cys Asn Ser Leu Leu  Trp Leu Val Glu Asn  Tyr Gln Leu
    1100                 1105                 1110

Asp Asn  Gly Ser Phe Lys Glu  Asn Ser Gln Tyr Gln  Pro Ile Lys
    1115                 1120                 1125

Leu Gln  Gly Thr Leu Pro Val  Glu Ala Arg Glu Asn  Ser Leu Tyr
    1130                 1135                 1140

Leu Thr  Ala Phe Thr Val Ile  Gly Ile Arg Lys Ala  Phe Asp Ile
    1145                 1150                 1155

Cys Pro  Leu Val Lys Ile Asn  Thr Ala Leu Ile Lys  Ala Asp Thr
    1160                 1165                 1170

Phe Leu  Leu Glu Asn Thr Leu  Pro Ala Gln Ser Thr  Phe Thr Leu
    1175                 1180                 1185

Ala Ile  Ser Ala Tyr Ala Leu  Ser Leu Gly Asp Lys  Thr His Pro
    1190                 1195                 1200

Gln Phe  Arg Ser Ile Val Ser  Ala Leu Lys Arg Glu  Ala Leu Val
    1205                 1210                 1215

Lys Gly  Asn Pro Pro Ile Tyr  Arg Phe Trp Lys Asp  Ser Leu Gln
    1220                 1225                 1230

His Lys  Asp Ser Ser Val Pro  Asn Thr Gly Thr Ala  Arg Met Val
    1235                 1240                 1245

Glu Thr  Thr Ala Tyr Ala Leu  Leu Thr Ser Leu Asn  Leu Lys Asp
    1250                 1255                 1260

Ile Asn  Tyr Val Asn Pro Ile  Ile Lys Trp Leu Ser  Glu Glu Gln
    1265                 1270                 1275

Arg Tyr  Gly Gly Gly Phe Tyr  Ser Thr Gln Asp Thr  Ile Asn Ala
    1280                 1285                 1290

Ile Glu  Gly Leu Thr Glu Tyr  Ser Leu Leu Val Lys  Gln Leu Arg
    1295                 1300                 1305

Leu Asn  Met Asp Ile Asp Val  Ala Tyr Lys His Lys  Gly Pro Leu
```

```
        1310                1315                1320

    His Asn  Tyr Lys Met Thr Asp  Lys Asn Phe Leu Gly  Arg Pro Val
        1325                1330                1335

    Glu Val  Leu Leu Asn Asp Asp  Leu Val Val Ser Thr  Gly Phe Gly
        1340                1345                1350

    Ser Gly  Leu Ala Thr Val His  Val Thr Thr Val Val  His Lys Thr
        1355                1360                1365

    Ser Thr  Ser Glu Glu Val Cys  Ser Phe Tyr Leu Lys  Ile Asp Thr
        1370                1375                1380

    Gln Asp  Ile Glu Ala Ser His  Tyr Arg Gly Tyr Gly  Asn Ser Asp
        1385                1390                1395

    Tyr Lys  Arg Ile Val Ala Cys  Ala Ser Tyr Lys Pro  Ser Lys Glu
        1400                1405                1410

    Glu Ser  Ser Ser Gly Ser Ser  His Ala Val Met Asp  Ile Ser Leu
        1415                1420                1425

    Pro Thr  Gly Ile Asn Ala Asn  Glu Glu Asp Leu Lys  Ala Leu Val
        1430                1435                1440

    Glu Gly  Val Asp Gln Leu Phe  Thr Asp Tyr Gln Ile  Lys Asp Gly
        1445                1450                1455

    His Val  Ile Leu Gln Leu Asn  Ser Ile Pro Ser Ser  Asp Phe Leu
        1460                1465                1470

    Cys Val  Arg Phe Arg Ile Phe  Glu Leu Phe Glu Val  Gly Phe Leu
        1475                1480                1485

    Ser Pro  Ala Thr Phe Thr Val  Tyr Glu Tyr His Arg  Pro Asp Lys
        1490                1495                1500

    Gln Cys  Thr Met Phe Tyr Ser  Thr Ser Asn Ile Lys  Ile Gln Lys
        1505                1510                1515

    Val Cys  Glu Gly Ala Thr Cys  Lys Cys Ile Glu Ala  Asp Cys Gly
        1520                1525                1530

    Gln Met  Gln Lys Glu Leu Asp  Leu Thr Ile Ser Ala  Glu Thr Arg
        1535                1540                1545

    Lys Gln  Thr Ala Cys Asn Pro  Glu Ile Ala Tyr Ala  Tyr Lys Val
        1550                1555                1560

    Ile Ile  Thr Ser Ile Thr Thr  Glu Asn Val Phe Val  Lys Tyr Lys
        1565                1570                1575

    Ala Thr  Leu Leu Asp Ile Tyr  Lys Thr Gly Glu Ala  Val Ala Glu
        1580                1585                1590

    Lys Asp  Ser Glu Ile Thr Phe  Ile Lys Lys Val Thr  Cys Thr Asn
        1595                1600                1605

    Ala Glu  Leu Val Lys Gly Arg  Gln Tyr Leu Ile Met  Gly Lys Glu
        1610                1615                1620
```

Ala Leu Gln Ile Lys Tyr Asn Phe Thr Phe Arg Tyr Ile Tyr Pro
1625 1630 1635

Leu Asp Ser Leu Thr Trp Ile Glu Tyr Trp Pro Arg Asp Thr Thr
1640 1645 1650

Cys Ser Ser Cys Gln Ala Phe Leu Ala Asn Leu Asp Glu Phe Ala
1655 1660 1665

Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys
1670 1675

<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 45

Ser Ser Tyr Tyr Met Cys
1 5

<210> 46
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 46

Asn Phe Tyr Tyr Ile Cys
1 5

<210> 47
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 47

Ser Ser Tyr Tyr Met Cys
1 5

<210> 48
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 48

Ser Ser Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 49

Ser Ser Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 50

Asp Asn Thr Met Thr
1 5

<210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 51

Thr Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 52

Gly Asn Ala Ile Asn
1 5

<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 53

Thr Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 54

Ser Ser Tyr Tyr Val Ala
1 5

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 55

Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 56

Cys Ile Tyr Thr Val Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 57
<211> 18
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 57

Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ile Ile Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 58
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 58

Met Ile Tyr Gly Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 59
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 59

Met Ile Tyr Gly Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 60
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 60

Ile Ile Ser Phe Gly Gly Asp Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 61
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 61

Thr Ile Asp Thr Gly Asp Asn Ser Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 62

<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 62

Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 63
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 63

Thr Ile Asp Thr Gly Asp Asn Ser Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 64

Ala Ile Tyr Thr Gly Ser Gly Ala Thr Tyr Lys Ala Ser Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 65

Asp Gly Gly Tyr Val Thr Pro Thr His Ala Met Tyr Leu
1 5 10

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 66

Asp Leu His Ala Gly Ile Thr Asn Leu
1 5

<210> 67
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 67

Tyr Pro Thr Tyr Gly Asp Gly Gly His Ala Phe Asn Leu
1 5 10

<210> 68
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 68

Gln Ile Tyr Ser Gly Asp Asn Asn Asp Asn Phe
1 5 10

<210> 69
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 69

Gln Ile Tyr Ser Gly Asp Asn Asn Asp Asn Phe
1 5 10

<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 70

Val Gly Ala Gly Asn Ile Phe Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 71

Asn Asp Gly Ser Val Tyr Asn Leu Phe Asn Leu
1 5 10

<210> 72
<211> 4
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 72

Gly Ser Gly Leu
1

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 73

Asn Asp Gly Ser Val Tyr Asn Leu Phe Asn Leu
1 5 10

<210> 74
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 74

Asp Gly Gly Tyr Asp Tyr Pro Thr His Ala Met His Tyr
1 5 10

<210> 75
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 75

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Gly Ser Asp Leu Ala
1 5 10

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 76

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 77
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 77

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Ser Ser Asp Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 78
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 78

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 79
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 79

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 80
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 80

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 81

Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Ala Leu Ser
1 5 10

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 82

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Leu Leu Ala
1 5 10

<210> 83
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 83

Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Ala Leu Ser
1 5 10

<210> 84
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 84

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Gly Ser Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 85

<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 85

Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 86

Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 87

Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 88
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 88

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 89

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 90

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 91

Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 92

His Thr Ser Asp Leu Ala Ser
1 5

<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 93

Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 94

Gly Ala Ser Lys Thr His Ser
1 5

<210> 95
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 95

Gln Cys Thr Phe Val Gly Ser Ser Tyr Gly Asn Ala
1 5 10

<210> 96
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 96

Leu Gln Gly Tyr Ser Tyr Ser Asn Val Asp Asp Ala
1 5 10

<210> 97
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 97

Gln Gly Thr Tyr Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Phe Ala
1 5 10

<210> 98
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 98

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Ser Asn Val Asp Asn Thr
1 5 10

<210> 99
<211> 12

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 99

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Ser Asn Val Asp Asn Thr
1 5 10

<210> 100
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 100

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Thr Asn Val His Asn Ser
1 5 10

<210> 101
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 101

Gln Gln Tyr Tyr Asp Ile Asn Ser Val Asp Asn Thr
1 5 10

<210> 102
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 102

Gln Cys Thr Ala Tyr Gly Ser Ser Asp Val Gly Gly Thr
1 5 10

<210> 103
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 103

Gln Gln Tyr Tyr Asp Ile Asn Ser Val Asp Asn Thr

1 5 10

<210> 104
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 104

Gln Ser Thr Lys Val Gly Ser Ser Tyr Gly Asn His
1 5 10

<210> 105
<211> 1680
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 105

Met Gly Leu Trp Gly Ile Leu Cys Leu Leu Ile Phe Leu Asp Lys Thr
1 5 10 15

Trp Gly Gln Glu Gln Thr Tyr Val Ile Ser Ala Pro Lys Ile Leu Arg
20 25 30

Val Gly Ser Ser Glu Asn Val Val Ile Gln Val His Gly Tyr Thr Glu
35 40 45

Ala Phe Asp Ala Thr Leu Ser Leu Lys Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Val
50 55 60

Thr Phe Ser Ser Gly Tyr Val Asn Leu Ser Pro Glu Asn Lys Phe Gln
65 70 75 80

Asn Ala Ala Leu Leu Thr Leu Gln Pro Asn Gln Val Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Ser Pro Val Ser His Val Tyr Leu Glu Val Val Ser Lys His Phe Ser
100 105 110

Lys Ser Lys Lys Ile Pro Ile Thr Tyr Asn Asn Gly Ile Leu Phe Ile
115 120 125

His Thr Asp Lys Pro Val Tyr Thr Pro Asp Gln Ser Val Lys Ile Arg
130 135 140

Val Tyr Ser Leu Gly Asp Asp Leu Lys Pro Ala Lys Arg Glu Thr Val
145 150 155 160

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

Asn Asp Tyr Thr Gly Ile Ile Ser Phe Pro Asp Phe Lys Ile Pro Ser
180 185 190

Asn Pro Lys Tyr Gly Val Trp Thr Ile Lys Ala Asn Tyr Lys Lys Asp
195 200 205

```
Phe Thr Thr Thr Gly Thr Ala Tyr Phe Glu Ile Lys Glu Tyr Val Leu
    210                 215                 220

Pro Arg Phe Ser Val Ser Ile Glu Leu Glu Arg Thr Phe Ile Gly Tyr
225                 230                 235                 240

Lys Asn Phe Lys Asn Phe Glu Ile Thr Val Lys Ala Arg Tyr Phe Tyr
                245                 250                 255

Asn Lys Val Val Pro Asp Ala Glu Val Tyr Ala Phe Phe Gly Leu Arg
            260                 265                 270

Glu Asp Ile Lys Asp Glu Glu Lys Gln Met Met His Lys Ala Thr Gln
        275                 280                 285

Ala Ala Lys Leu Val Asp Gly Val Ala Gln Ile Ser Phe Asp Ser Glu
    290                 295                 300

Thr Ala Val Lys Glu Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Glu Asp Leu Asn Asn
305                 310                 315                 320

Lys Tyr Leu Tyr Ile Ala Val Thr Val Thr Glu Ser Ser Gly Gly Phe
                325                 330                 335

Ser Glu Glu Ala Glu Ile Pro Gly Val Lys Tyr Val Leu Ser Pro Tyr
            340                 345                 350

Thr Leu Asn Leu Val Ala Thr Pro Leu Phe Val Lys Pro Gly Ile Pro
        355                 360                 365

Phe Ser Ile Lys Ala Gln Val Lys Asp Ser Leu Glu Gln Ala Val Gly
    370                 375                 380

Gly Val Pro Val Thr Leu Met Ala Gln Thr Val Asp Val Asn Gln Glu
385                 390                 395                 400

Thr Ser Asp Leu Glu Thr Lys Arg Ser Ile Thr His Asp Thr Asp Gly
                405                 410                 415

Val Ala Val Phe Val Leu Asn Leu Pro Ser Asn Val Thr Val Leu Lys
            420                 425                 430

Phe Glu Ile Arg Thr Asp Asp Pro Glu Leu Pro Glu Glu Asn Gln Ala
        435                 440                 445

Ser Lys Glu Tyr Glu Ala Val Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr
    450                 455                 460

Ile Tyr Ile Ala Trp Thr Glu Asn Tyr Lys Pro Met Leu Val Gly Glu
465                 470                 475                 480

Tyr Leu Asn Ile Met Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile
                485                 490                 495

Thr His Tyr Asn Tyr Leu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Ile Val Gln Tyr
            500                 505                 510

Gly Thr Arg Glu Lys Leu Phe Ser Ser Thr Tyr Gln Asn Ile Asn Ile
        515                 520                 525

Pro Val Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ala Arg Leu Leu Val Tyr Tyr
```

```
      530                 535                 540

Ile Val Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ala Asp Ala Val Trp
545                 550                 555                 560

Ile Asn Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser
                565                 570                 575

Pro Asp Glu Tyr Val Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asp Met
            580                 585                 590

Val Thr Glu Ala Asp Ser Trp Val Ala Leu Ser Ala Val Asp Arg Ala
        595                 600                 605

Val Tyr Lys Val Gln Gly Asn Ala Lys Arg Ala Met Gln Arg Val Phe
    610                 615                 620

Gln Ala Leu Asp Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly
625                 630                 635                 640

His Asp Asn Ala Asp Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr
                645                 650                 655

Asn Ala Asn Ala Asp Asp Ser His Tyr Arg Asp Asp Ser Cys Lys Glu
            660                 665                 670

Ile Leu Arg Ser Lys Arg Asn Leu His Leu Leu Arg Gln Lys Ile Glu
        675                 680                 685

Glu Gln Ala Ala Lys Tyr Lys His Ser Val Pro Lys Lys Cys Cys Tyr
    690                 695                 700

Asp Gly Ala Arg Val Asn Phe Tyr Glu Thr Cys Glu Glu Arg Val Ala
705                 710                 715                 720

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

Thr Ile Ala Asn Lys Ile Arg Lys Glu Ser Pro His Lys Pro Val Gln
            740                 745                 750

Leu Gly Arg Ile His Ile Lys Thr Leu Leu Pro Val Met Lys Ala Asp
        755                 760                 765

Ile Arg Ser Tyr Phe Pro Glu Ser Trp Leu Trp Glu Ile His Arg Val
    770                 775                 780

Pro Lys Arg Lys Gln Leu Gln Val Thr Leu Pro Asp Ser Leu Thr Thr
785                 790                 795                 800

Trp Glu Ile Gln Gly Ile Gly Ile Ser Asp Asn Gly Ile Cys Val Ala
                805                 810                 815

Asp Thr Leu Lys Ala Lys Val Phe Lys Glu Val Phe Leu Glu Met Asn
            820                 825                 830

Ile Pro Tyr Ser Val Val Arg Gly Glu Gln Ile Gln Leu Lys Gly Thr
        835                 840                 845

Val Tyr Asn Tyr Met Thr Ser Gly Thr Lys Phe Cys Val Lys Met Ser
    850                 855                 860
```

```
Ala Val Glu Gly Ile Cys Thr Ser Gly Ser Ser Ala Ala Ser Leu His
865                 870                 875                 880

Thr Ser Arg Pro Ser Arg Cys Val Phe Gln Arg Ile Glu Gly Ser Ser
                885                 890                 895

Ser His Leu Val Thr Phe Thr Leu Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu His
            900                 905                 910

Ser Ile Asn Phe Ser Leu Glu Thr Ser Phe Gly Lys Asp Ile Leu Val
        915                 920                 925

Lys Thr Leu Arg Val Val Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ala
    930                 935                 940

Gly Val Ile Leu Asp Pro Lys Gly Ile Arg Gly Ile Val Asn Arg Arg
945                 950                 955                 960

Lys Glu Phe Pro Tyr Arg Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Lys
                965                 970                 975

Val Glu Arg Ile Leu Ser Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Phe Leu
            980                 985                 990

Ser Thr Val Leu Ser Lys Glu Gly  Ile Asn Ile Leu Thr  His Leu Pro
        995                 1000                1005

Lys Gly  Ser Ala Glu Ala Glu  Leu Met Ser Ile Ala  Pro Val Phe
    1010                1015                1020

Tyr Val  Phe His Tyr Leu Glu  Ala Gly Asn His Trp  Asn Ile Phe
    1025                1030                1035

Tyr Pro  Asp Thr Leu Ser Lys  Arg Gln Ser Leu Glu  Lys Lys Ile
    1040                1045                1050

Lys Gln  Gly Val Val Ser Val  Met Ser Tyr Arg Asn  Ala Asp Tyr
    1055                1060                1065

Ser Tyr  Ser Met Trp Lys Gly  Ala Ser Ala Ser Thr  Trp Leu Thr
    1070                1075                1080

Ala Phe  Ala Leu Arg Val Leu  Gly Gln Val Ala Lys  Tyr Val Lys
    1085                1090                1095

Gln Asp  Glu Asn Ser Ile Cys  Asn Ser Leu Leu Trp  Leu Val Glu
    1100                1105                1110

Lys Cys  Gln Leu Glu Asn Gly  Ser Phe Lys Glu Asn  Ser Gln Tyr
    1115                1120                1125

Leu Pro  Ile Lys Leu Gln Gly  Thr Leu Pro Ala Glu  Ala Gln Glu
    1130                1135                1140

Lys Thr  Leu Tyr Leu Thr Ala  Phe Ser Val Ile Gly  Ile Arg Lys
    1145                1150                1155

Ala Val  Asp Ile Cys Pro Thr  Met Lys Ile His Thr  Ala Leu Asp
    1160                1165                1170
```

```
Lys Ala  Asp Ser Phe Leu Leu  Glu Asn Thr Leu Pro  Ser Lys Ser
    1175                 1180                 1185

Thr Phe  Thr Leu Ala Ile Val  Ala Tyr Ala Leu Ser  Leu Gly Asp
    1190                 1195                 1200

Arg Thr  His Pro Arg Phe Arg  Leu Ile Val Ser Ala  Leu Arg Lys
    1205                 1210                 1215

Glu Ala  Phe Val Lys Gly Asp  Pro Pro Ile Tyr Arg  Tyr Trp Arg
    1220                 1225                 1230

Asp Thr  Leu Lys Arg Pro Asp  Ser Ser Val Pro Ser  Ser Gly Thr
    1235                 1240                 1245

Ala Gly  Met Val Glu Thr Thr  Ala Tyr Ala Leu Leu  Ala Ser Leu
    1250                 1255                 1260

Lys Leu  Lys Asp Met Asn Tyr  Ala Asn Pro Ile Ile  Lys Trp Leu
    1265                 1270                 1275

Ser Glu  Glu Gln Arg Tyr Gly  Gly Gly Phe Tyr Ser  Thr Gln Asp
    1280                 1285                 1290

Thr Ile  Asn Ala Ile Glu Gly  Leu Thr Glu Tyr Ser  Leu Leu Leu
    1295                 1300                 1305

Lys Gln  Ile His Leu Asp Met  Asp Ile Asn Val Ala  Tyr Lys His
    1310                 1315                 1320

Glu Gly  Asp Phe His Lys Tyr  Lys Val Thr Glu Lys  His Phe Leu
    1325                 1330                 1335

Gly Arg  Pro Val Glu Val Ser  Leu Asn Asp Asp Leu  Val Val Ser
    1340                 1345                 1350

Thr Gly  Tyr Ser Ser Gly Leu  Ala Thr Val Tyr Val  Lys Thr Val
    1355                 1360                 1365

Val His  Lys Ile Ser Val Ser  Glu Glu Phe Cys Ser  Phe Tyr Leu
    1370                 1375                 1380

Lys Ile  Asp Thr Gln Asp Ile  Glu Ala Ser Ser His  Phe Arg Leu
    1385                 1390                 1395

Ser Asp  Ser Gly Phe Lys Arg  Ile Ile Ala Cys Ala  Ser Tyr Lys
    1400                 1405                 1410

Pro Ser  Lys Glu Glu Ser Thr  Ser Gly Ser Ser His  Ala Val Met
    1415                 1420                 1425

Asp Ile  Ser Leu Pro Thr Gly  Ile Gly Ala Asn Glu  Glu Asp Leu
    1430                 1435                 1440

Arg Ala  Leu Val Glu Gly Val  Asp Gln Leu Leu Thr  Asp Tyr Gln
    1445                 1450                 1455

Ile Lys  Asp Gly His Val Ile  Leu Gln Leu Asn Ser  Ile Pro Ser
    1460                 1465                 1470

Arg Asp  Phe Leu Cys Val Arg  Phe Arg Ile Phe Glu  Leu Phe Gln
```

1475 1480 1485

Val Gly Phe Leu Asn Pro Ala Thr Phe Thr Val Tyr Glu Tyr His
1490 1495 1500

Arg Pro Asp Lys Gln Cys Thr Met Ile Tyr Ser Ile Ser Asp Thr
1505 1510 1515

Arg Leu Gln Lys Val Cys Glu Gly Ala Ala Cys Thr Cys Val Glu
1520 1525 1530

Ala Asp Cys Ala Gln Leu Gln Ala Glu Val Asp Leu Ala Ile Ser
1535 1540 1545

Ala Asp Ser Arg Lys Glu Lys Ala Cys Lys Pro Glu Thr Ala Tyr
1550 1555 1560

Ala Tyr Lys Val Arg Ile Thr Ser Ala Thr Glu Glu Asn Val Phe
1565 1570 1575

Val Lys Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Val Thr Tyr Lys Thr Gly Glu
1580 1585 1590

Ala Ala Asp Glu Asn Ser Glu Val Thr Phe Ile Lys Lys Met Ser
1595 1600 1605

Cys Thr Asn Ala Asn Leu Val Lys Gly Lys Gln Tyr Leu Ile Met
1610 1615 1620

Gly Lys Glu Val Leu Gln Ile Lys His Asn Phe Ser Phe Lys Tyr
1625 1630 1635

Ile Tyr Pro Leu Asp Ser Ser Thr Trp Ile Glu Tyr Trp Pro Thr
1640 1645 1650

Asp Thr Thr Cys Pro Ser Cys Gln Ala Phe Val Glu Asn Leu Asn
1655 1660 1665

Asn Phe Ala Glu Asp Leu Phe Leu Asn Ser Cys Glu
1670 1675 1680

<210> 106
<211> 123
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 106

Gln 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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val His Ser Ser
20 25 30

Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Ala Ile Phe Thr Gly Ser Gly Ala Glu Tyr Lys Ala Glu Trp

50 55 60

Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Asp Ala Gly Tyr Asp Tyr Pro Thr His Ala Met His Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 107
<211> 123
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 107

Gln 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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val His Ser Ser
20 25 30

Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Ala Ile Phe Thr Gly Ser Gly Ala Glu Tyr Lys Ala Glu Trp
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Asp Ala Gly Tyr Asp Tyr Pro Thr His Ala Met His Tyr
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 108
<211> 123
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 108

Gln 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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val His Ser Ser
20 25 30

Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Ala Ile Phe Thr Gly Ser Gly Ala Glu Tyr Lys Ala Glu Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Asp Ala Gly Tyr Asp Tyr Pro Thr His Ala Met His Tyr
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 109
<211> 123
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 109

Gln 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 Val His Ser Ser
20 25 30

Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Ala Ile Phe Thr Gly Ser Gly Ala Glu Tyr Lys Ala Glu Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Asp Ala Gly Tyr Asp Tyr Pro Thr His Ala Met His Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 110
<211> 123
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 110

Gln 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 Val His Ser Ser
20 25 30

Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Ser Gly Ile Phe Thr Gly Ser Gly Ala Thr Tyr Lys Ala Glu Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Asp Ala Gly Tyr Asp Tyr Pro Thr His Ala Met His Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 111
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 111

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 Ser Ser
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 Glu Thr Glu 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 Asn Thr Lys Val Gly Ser Ser
85 90 95

Tyr Gly Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 112
<211> 110

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 112

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 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 Gly Ala Ser Glu Thr Glu 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 Asn Thr Lys Val Gly Ser Ser
85 90 95

Tyr Gly Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 113
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 113

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 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 Gly Ala Ser Thr Thr 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 Asn Thr Lys Val Gly Ser Ser
85 90 95

Tyr Gly Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 114

<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 114

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Arg Arg Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr
305 310 315 320

Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 115
<211> 325
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 115

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Arg Arg Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 116
<211> 325
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 116

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Arg Arg Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 117
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 117

Ser Ser Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 118
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 118

Ala Ile Phe Thr Gly Ser Gly Ala Glu Tyr Lys Ala Glu Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 119
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 119

Ala Ile Phe Thr Gly Ser Gly Ala Glu Tyr Lys Ala Glu Trp Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 120
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 120

Gly Ile Phe Thr Gly Ser Gly Ala Thr Tyr Lys Ala Glu Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 121
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 121

Asp Ala Gly Tyr Asp Tyr Pro Thr His Ala Met His Tyr
1 5 10

<210> 122
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 122

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 123

Gly Ala Ser Glu Thr Glu Ser
1 5

<210> 124
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 124

Gly Ala Ser Thr Thr Gln Ser
1 5

<210> 125
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 125

Gln Asn Thr Lys Val Gly Ser Ser Tyr Gly Asn Thr
1 5 10

<210> 126
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<220>
<221> інша ознака
<222> (5)..(5)
<223> Xaa є Met або Val

<220>
<221> інша ознака
<222> (6)..(6)
<223> Xaa є Cys або Ala

<400> 126

Ser Ser Tyr Tyr Xaa Xaa
1 5

<210> 127
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<220>
<221> інша ознака
<222> (1)..(1)
<223> Xaa є Cys, Ala або Gly

<220>
<221> інша ознака
<222> (3)..(3)
<223> Xaa є Tyr або Phe

<220>
<221> інша ознака
<222> (9)..(9)
<223> Xaa є Thr, Asp або Glu

<220>
<221> інша ознака
<222> (11)..(11)
<223> Xaa є Tyr, Lys або Gln

<220>
<221> інша ознака
<222> (13)..(13)
<223> Xaa є Ser, Asp або Glu

<220>
<221> інша ознака
<222> (15)..(15)
<223> Xaa є Ala або Val

<400> 127

Xaa Ile Xaa Thr Gly Ser Gly Ala Xaa Tyr Xaa Ala Xaa Trp Xaa Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 128
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<220>
<221> інша ознака
<222> (2)..(2)
<223> Xaa є Gly або Ala

<220>

<221> інша ознака
<222> (5)..(5)
<223> Xaa є Val, Gln або Asp

<220>
<221> інша ознака
<222> (6)..(6)
<223> Xaa є Thr або Tyr

<220>
<221> інша ознака
<222> (12)..(12)
<223> Xaa є Tyr або His

<220>
<221> інша ознака
<222> (13)..(13)
<223> Xaa є Leu або Tyr

<400> 128

Asp Xaa Gly Tyr Xaa Xaa Pro Thr His Ala Met Xaa Xaa
1 5 10

<210> 129
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<220>
<221> інша ознака
<222> (1)..(1)
<223> Xaa є Gln або Arg

<220>
<221> інша ознака
<222> (5)..(5)
<223> Xaa є Asn, Gln або Gly

<220>
<221> інша ознака
<222> (7)..(7)
<223> Xaa є Gly або Ser

<220>
<221> інша ознака
<222> (9)..(9)
<223> Xaa є Asp, Lys або Ser

<400> 129

Xaa Ala Ser Gln Xaa Ile Xaa Ser Xaa Leu Ala
1 5 10

<210> 130
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<220>
<221> інша ознака
<222> (4)..(4)
<223> Xaa є Lys, Glu або Thr

<220>
<221> інша ознака
<222> (5)..(5)
<223> Xaa є Leu або Thr

<220>
<221> інша ознака
<222> (6)..(6)
<223> Xaa є Ala, His, Glu або Gln

<400> 130

Gly Ala Ser Xaa Xaa Xaa Ser
1 5

<210> 131
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<220>
<221> інша ознака
<222> (2)..(2)
<223> Xaa є Ser, Cys, Asn або Thr

<220>
<221> інша ознака
<222> (4)..(4)
<223> Xaa є Phe або Lys

<220>
<221> інша ознака
<222> (12)..(12)
<223> Xaa є Ala, Thr або His

<400> 131

Gln Xaa Thr Xaa Val Gly Ser Ser Tyr Gly Asn Xaa
1 5 10

<210> 132
<211> 30
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 132

Gln 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 Ser His
20 25 30

<210> 133
<211> 30
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 133

Gln 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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val His
20 25 30

<210> 134
<211> 30
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 134

Gln 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 Val His
20 25 30

<210> 135
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 135

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 136
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 136

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 137
<211> 32
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 137

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ser
20 25 30

<210> 138
<211> 32
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 138

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ser
20 25 30

<210> 139
<211> 32
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 139

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser
20 25 30

<210> 140
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 140

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 141
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 141

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 142
<211> 23
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 142

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 143
<211> 23
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 143

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
20

<210> 144
<211> 15
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 144

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 145
<211> 15
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 145

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 146
<211> 32
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 146

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 147
<211> 32
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 147

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 148
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 148

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 149
<211> 448

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 149

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly His Thr Glu Tyr Thr Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Pro Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

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

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
210 215 220

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
420 425 430

Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 150
<211> 214
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 150

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 Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp 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 Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu
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
    210
```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб отримання антитіла проти C5, при якому імунізують тварину, яка не є людиною, проти поліпептиду, відбирають антитіло проти C5, виділяють нуклеїнову кислоту, що кодує відібране антитіло проти C5, культивують клітину-хазяїна, яка містить вказану нуклеїнову кислоту, та виділяють антитіло проти C5 з вказаної клітини-хазяїна, який **відрізняється** тим, що поліпептид включає ділянку, що відповідає амінокислотам у положеннях 33-124 бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5, при цьому на етапі відбору антитіла проти C5 відбирають антитіло проти C5, здатне зв'язуватися з епітопом, що містить амінокислоти 47-57, 70-76 та 107-110 у бета-ланцюзі, з афінністю, вищою при pH 7,4, ніж при pH 5,8, причому антитіло здатне або конкурувати за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH і VL, вибрану з вказаних нижче пар (a)-(j):
(a) VH SEQ ID NO: 1 і VL SEQ ID NO: 11;
(b) VH SEQ ID NO: 5 і VL SEQ ID NO: 15;
(c) VH SEQ ID NO: 4 і VL SEQ ID NO: 14;
(d) VH SEQ ID NO: 6 і VL SEQ ID NO: 16;
(e) VH SEQ ID NO: 2 і VL SEQ ID NO: 12;
(f) VH SEQ ID NO: 3 і VL SEQ ID NO: 13;
(g) VH SEQ ID NO: 9 і VL SEQ ID NO: 19;
(h) VH SEQ ID NO: 7 і VL SEQ ID NO: 17;
(i) VH SEQ ID NO: 8 і VL SEQ ID NO: 18 або
(j) VH SEQ ID NO: 10 і VL SEQ ID NO: 20;
або зв'язуватися з тим самим епітопом, що і антитіло, яке включає пару VH і VL, вибрану з вказаних нижче пар (a)-(j):
(a) VH SEQ ID NO: 1 і VL SEQ ID NO: 11;
(b) VH SEQ ID NO: 5 і VL SEQ ID NO: 15;
(c) VH SEQ ID NO: 4 і VL SEQ ID NO: 14;
(d) VH SEQ ID NO: 6 і VL SEQ ID NO: 16;
(e) VH SEQ ID NO: 2 і VL SEQ ID NO: 12;
(f) VH SEQ ID NO: 3 і VL SEQ ID NO: 13;
(g) VH SEQ ID NO: 9 і VL SEQ ID NO: 19;
(h) VH SEQ ID NO: 7 і VL SEQ ID NO: 17;
(i) VH SEQ ID NO: 8 і VL SEQ ID NO: 18 або
(j) VH SEQ ID NO: 10 і VL SEQ ID NO: 20.

2. Спосіб отримання антитіла проти C5, при якому імунізують тварину, яка не є людиною, проти поліпептиду, відбирають антитіло проти C5, виділяють нуклеїнову кислоту, що кодує відібране антитіло проти C5, культивують клітину-хазяїна, яка містить вказану нуклеїнову кислоту, та виділяють антитіло проти C5 з вказаної клітини-хазяїна, який **відрізняється** тим, що поліпептид містить амінокислоти 47-57, 70-76 та 107-110 бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5, при цьому на

етапі відбору антитіла проти C5 відбирають антитіло проти C5, здатне зв'язуватися з епітопом, що містить амінокислоти 47-57, 70-76 та 107-110 бета-ланцюга, з афінністю, вищою при pH 7,4, ніж при pH 5,8.

3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що поліпептид містить His70, His72 і His110, при цьому антитіло проти C5 здатне зв'язуватися з His70, His72 і His110 з афінністю, вищою при pH 7,4, ніж при pH 5,8.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що здійснюють підтвердження того, чи має антитіло проти C5 афінність, вищу при pH 7,4, ніж при pH 5,8.

5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що співвідношення pH 5,8/pH 7,4 KD для антитіла проти C5 становить 2 або більше.

6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що антитіло проти C5 є виділеним моноклональним антитілом.

7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що антитіло проти C5 здатне інгібувати активацію C5.

8. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що антитіло проти C5 здатне інгібувати активацію варіанта R885H C5.

9. Спосіб за будь-яким із пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що антитіло проти C5 являє собою людське, гуманізоване або химерне антитіло.

10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що антитіло проти C5 являє собою фрагмент антитіла, який здатний зв'язуватися з C5.

11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що антитіло проти C5 походить від повнорозмірного антитіла IgG1 або IgG4.

12. Спосіб за будь-яким з пп. 1-11, який **відрізняється** тим, що співвідношення pH 5,8/7,4 KD для антитіла проти C5 становить 5 або більше.

13. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, який **відрізняється** тим, що співвідношення pH 5,8/7,4 KD для антитіла проти C5 становить 20 або більше.

14. Антиген для імунізації тварини, що не є людиною, для отримання антитіла проти C5, вказаного в п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що антиген являє собою поліпептид, який включає ділянку, що відповідає амінокислотам у положеннях 33-124 бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5.

15. Антиген за п. 14, який **відрізняється** тим, що поліпептид містить амінокислоти 47-57, 70-76 та 107-110 бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5.

16. Антиген за п. 14 або 15, який **відрізняється** тим, що поліпептид містить амінокислоти Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 та His110.

17. Антиген за п. 16, в якому поліпептид містить His70, His72 і His110.

18. Застосування поліпептиду, який включає ділянку, що відповідає амінокислотам у положеннях 33-124 бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5, як антигену для імунізації тварини для отримання антитіла проти C5, вказаного в п. 1 або 2.

19. Застосування за п. 18, де поліпептид містить амінокислоти 47-57, 70-76 та 107-110 бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5.

20. Застосування за п. 18 або 19, де поліпептид містить амінокислоти Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 та His110.

21. Застосування за п. 20, в якому поліпептид містить His70, His72 і His110.

22. Виділене моноклональне антитіло проти C5, яке **відрізняється** тим, що антитіло здатне зв'язуватися з епітопом у межах фрагмента, що складається з амінокислот 33-124 бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5, з афінністю, вищою при pH 7,4, ніж при pH 5,8, причому епітоп містить амінокислоти 47-57, 70-76 та 107-110 у бета-ланцюзі, при цьому антитіло здатне або конкурувати за зв'язування з C5 з антитілом, яке включає пару VH і VL, вибрану з вказаних нижче пар (a)-(j):

(a) VH SEQ ID NO: 1 і VL SEQ ID NO: 11;
(b) VH SEQ ID NO: 5 і VL SEQ ID NO: 15;
(c) VH SEQ ID NO: 4 і VL SEQ ID NO: 14;
(d) VH SEQ ID NO: 6 і VL SEQ ID NO: 16;
(e) VH SEQ ID NO: 2 і VL SEQ ID NO: 12;
(f) VH SEQ ID NO: 3 і VL SEQ ID NO: 13;
(g) VH SEQ ID NO: 9 і VL SEQ ID NO: 19;
(h) VH SEQ ID NO: 7 і VL SEQ ID NO: 17;
(i) VH SEQ ID NO: 8 і VL SEQ ID NO: 18 або
(j) VH SEQ ID NO: 10 і VL SEQ ID NO: 20;

або зв'язуватися з тим самим епітопом, що і антитіло, яке включає пару VH і VL, вибрану з

вказаних нижче пар (a)-(j):
(a) VH SEQ ID NO: 1 і VL SEQ ID NO: 11;
(b) VH SEQ ID NO: 5 і VL SEQ ID NO: 15;
(c) VH SEQ ID NO: 4 і VL SEQ ID NO: 14;
(d) VH SEQ ID NO: 6 і VL SEQ ID NO: 16;
(e) VH SEQ ID NO: 2 і VL SEQ ID NO: 12;
(f) VH SEQ ID NO: 3 і VL SEQ ID NO: 13;
(g) VH SEQ ID NO: 9 і VL SEQ ID NO: 19;
(h) VH SEQ ID NO: 7 і VL SEQ ID NO: 17;
(i) VH SEQ ID NO: 8 і VL SEQ ID NO: 18 або
(j) VH SEQ ID NO: 10 і VL SEQ ID NO: 20.

23. Антитіло за п. 22, яке **відрізняється** тим, що антитіло здатне зв'язуватися з епітопом у межах фрагмента бета-ланцюга (SEQ ID NO: 40) C5, який містить амінокислоти Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 та His110.

24. Антитіло за п. 22 або 23, яке здатне інгібувати активацію C5.

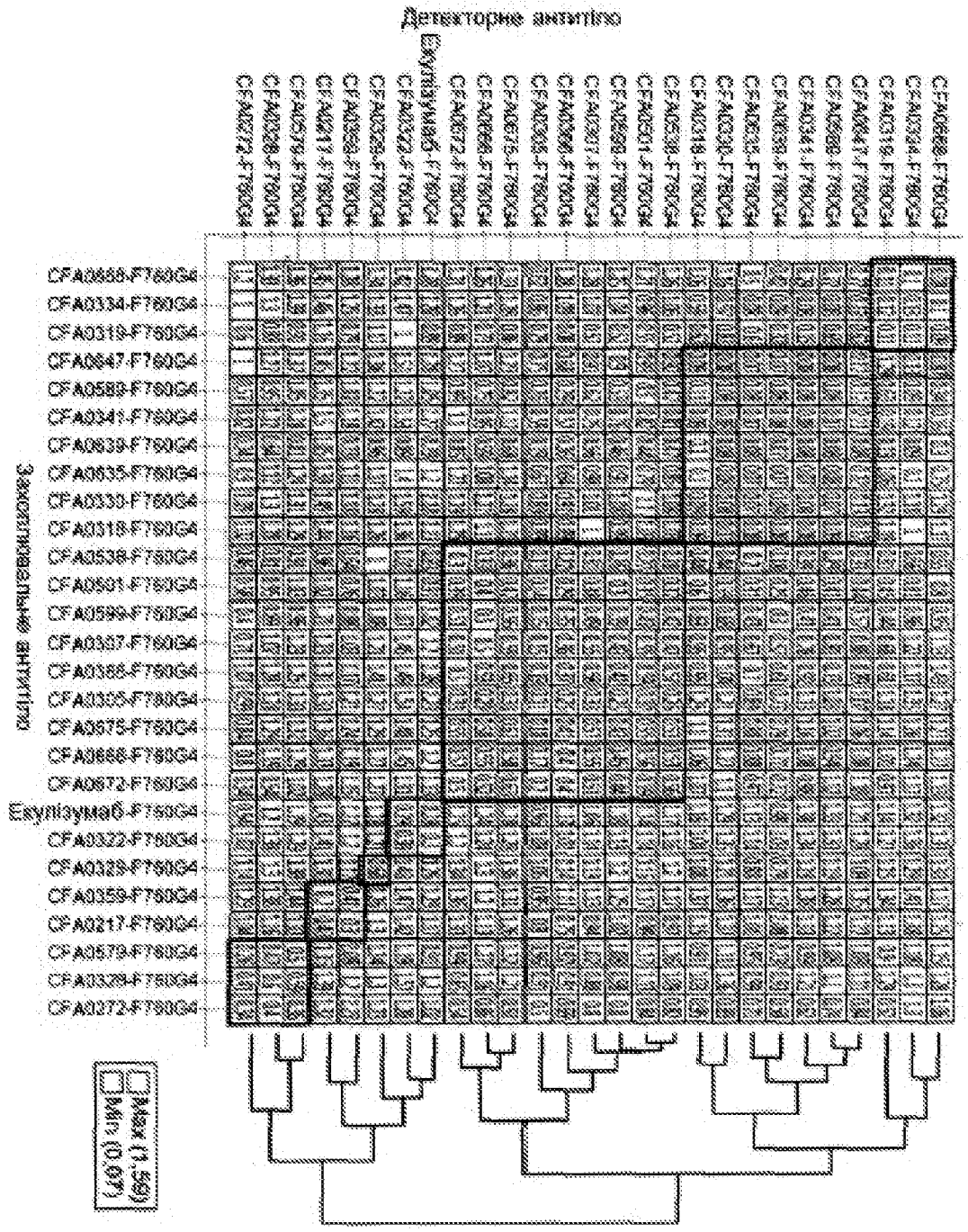
25. Антитіло за будь-яким з пп. 22-24, яке здатне інгібувати активацію варіанта R885H C5.

26. Антитіло за будь-яким з пп. 22-25, яке є антитілом людини, гуманізованим антитілом або химерним антитілом.

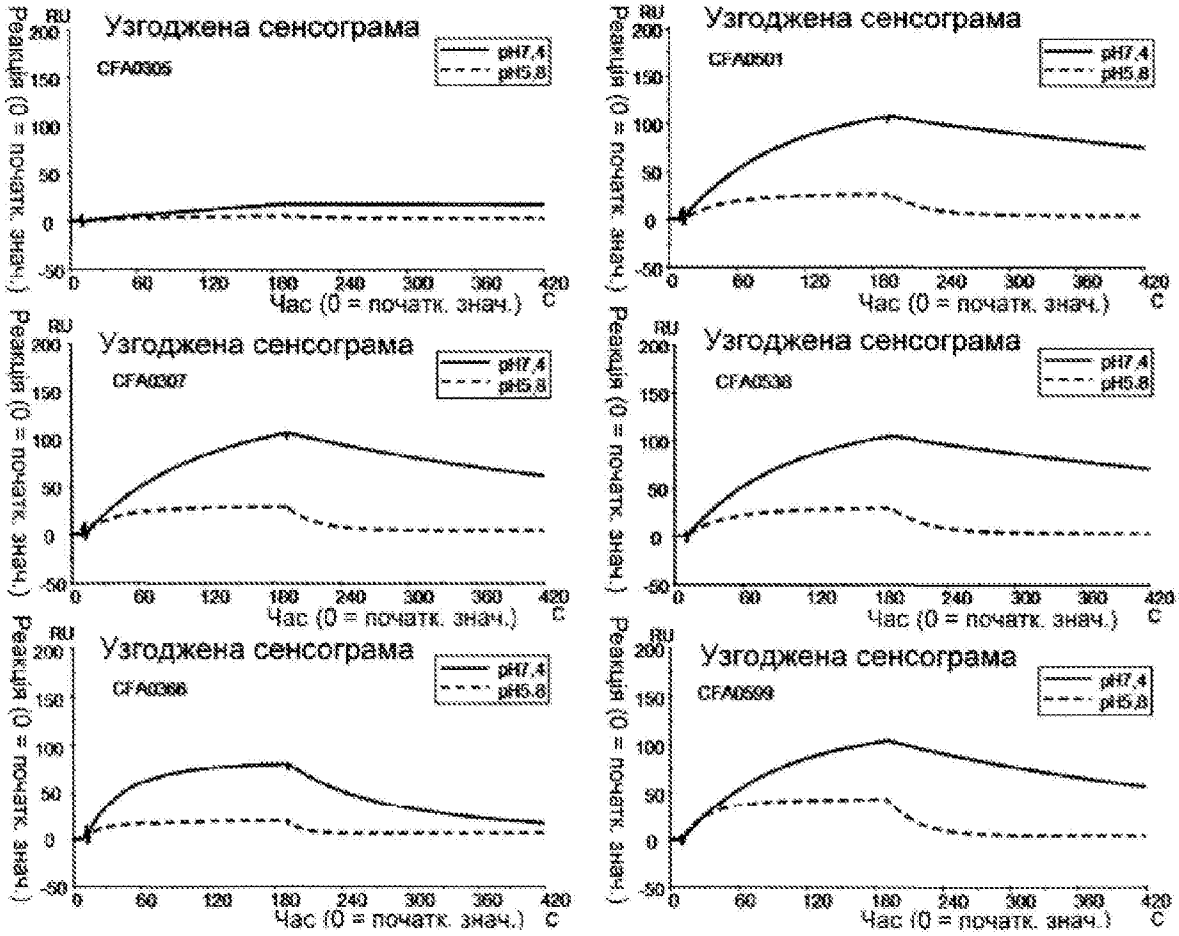
27. Антитіло за будь-яким з пп. 22-26, яке є фрагментом антитіла, який здатний зв'язуватися з C5.

28. Антитіло за будь-яким з пп. 22-27, яке є повнорозмірним антитілом IgG1 або IgG4.

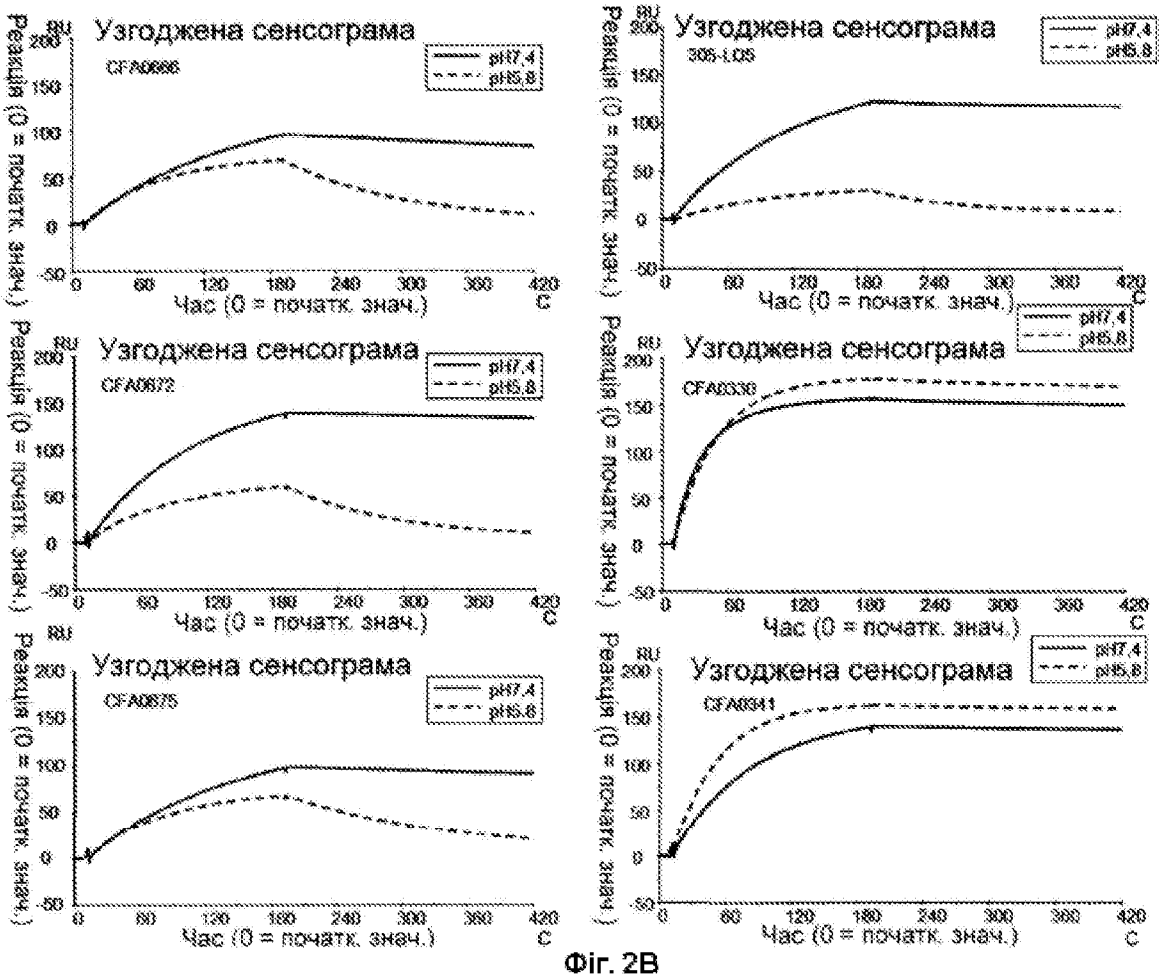
29. Фармацевтичний склад, який містить антитіло за будь-яким з пп. 22-28 та фармацевтично прийнятний носій.


Детекторне антитіло
Екулізумаб-F760G4
Захоплювальне антитіло
Екулізумаб-F760G4
Max (1.56)
Min (0.67)

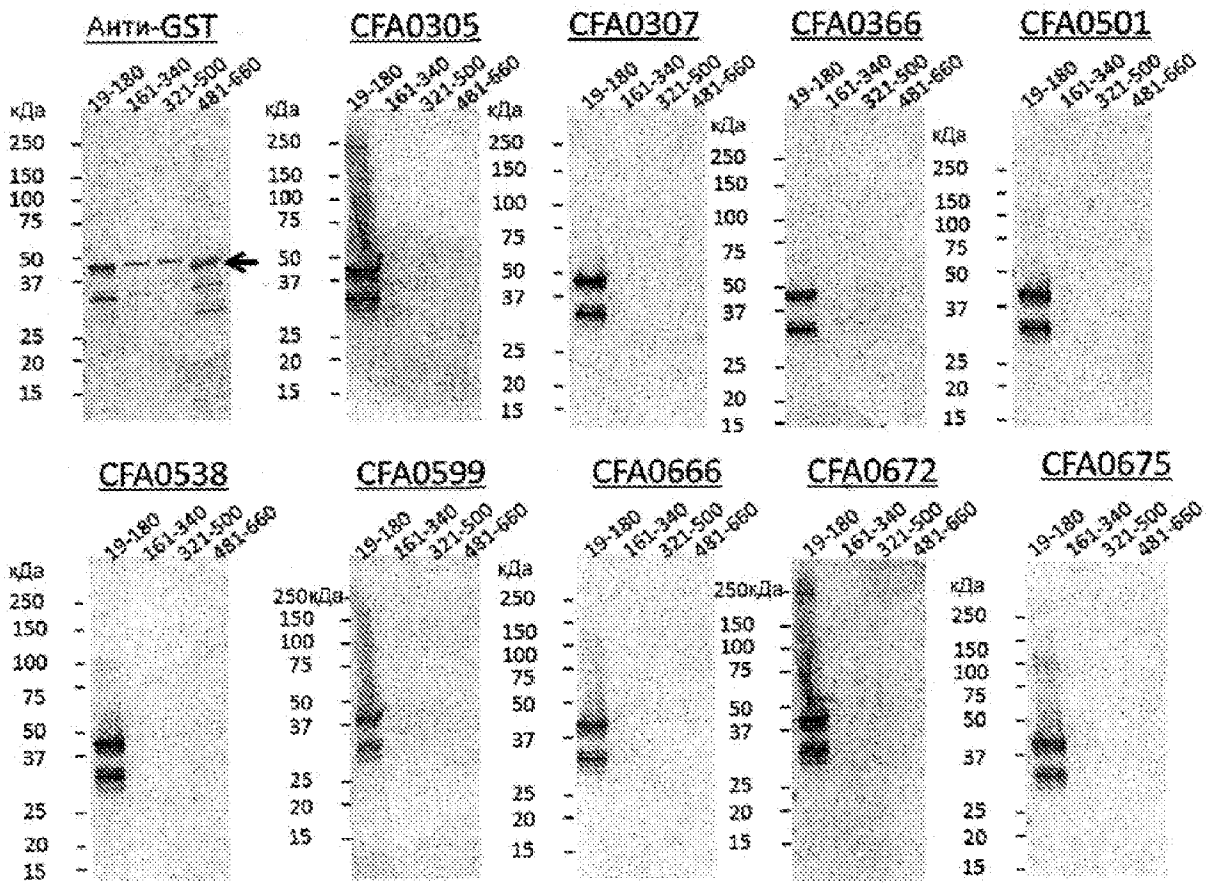
Фіг. 1


Узгоджена сенсограма
CFA0305
pH7,4
pH5,8
RU
Реакція (0 = початк. знач.)
Час (0 = початк. знач.)
с
Узгоджена сенсограма
CFA0501
Узгоджена сенсограма
CFA0307
Узгоджена сенсограма
CFA0538
Узгоджена сенсограма
CFA0306
Узгоджена сенсограма
CFA0509

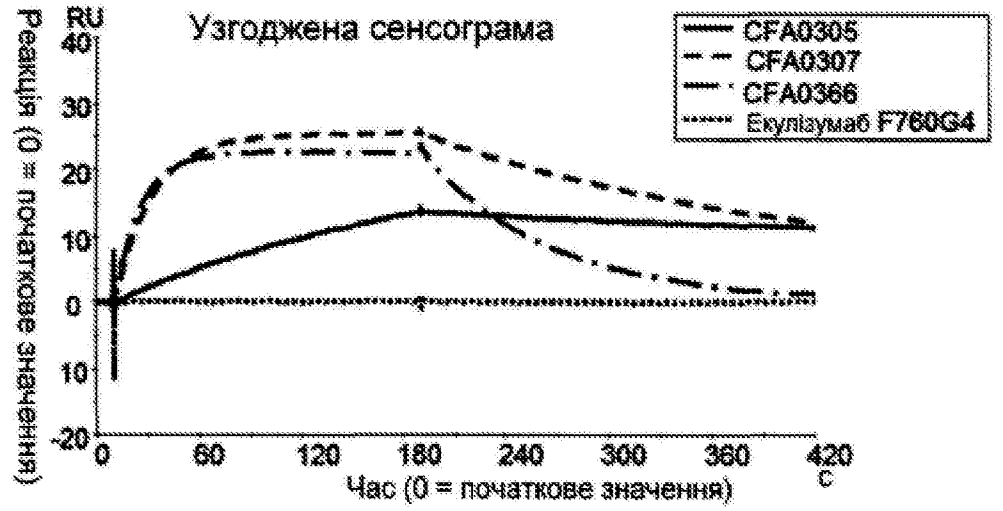
Фіг. 2A

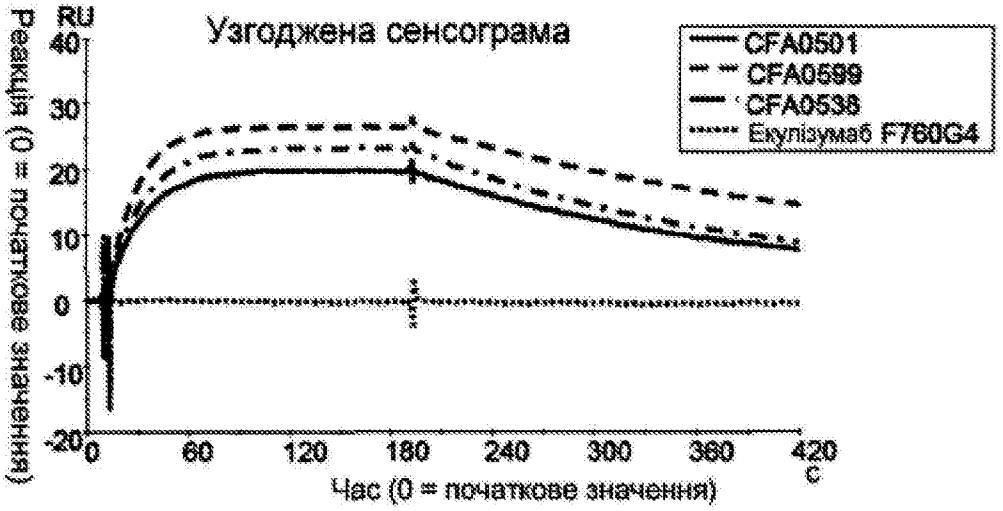

Узгоджена сенсограма
pH7.4
pH6.8
Реакція (0 = початк. знач.)
RU
Час (0 = початк. знач.)
с

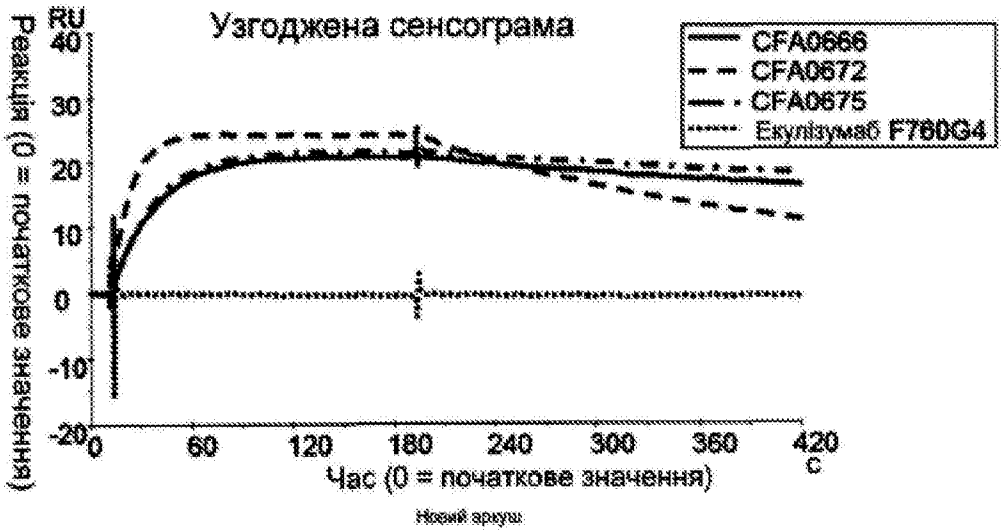
Фіг. 2B


Анти-GST
CFA0305
CFA0307
CFA0366
CFA0501
CFA0538
CFA0599
CFA0666
CFA0672
CFA0675
19-180
161-340
321-500
481-660
кДа
250
150
100
75
50
37
25
20
15

Фіг. 3

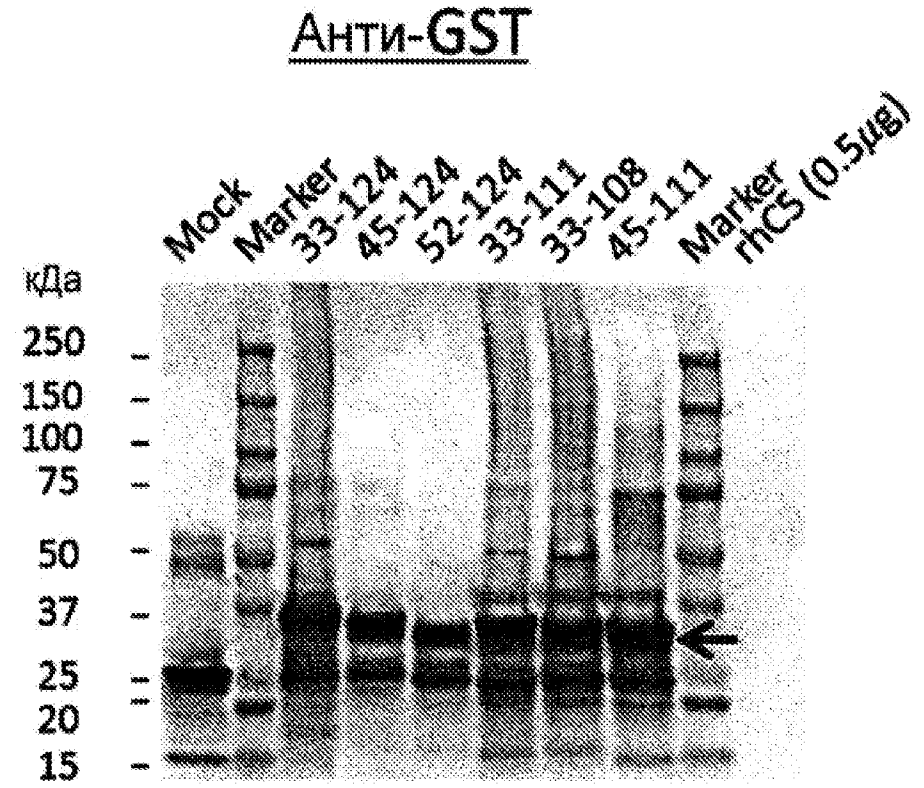




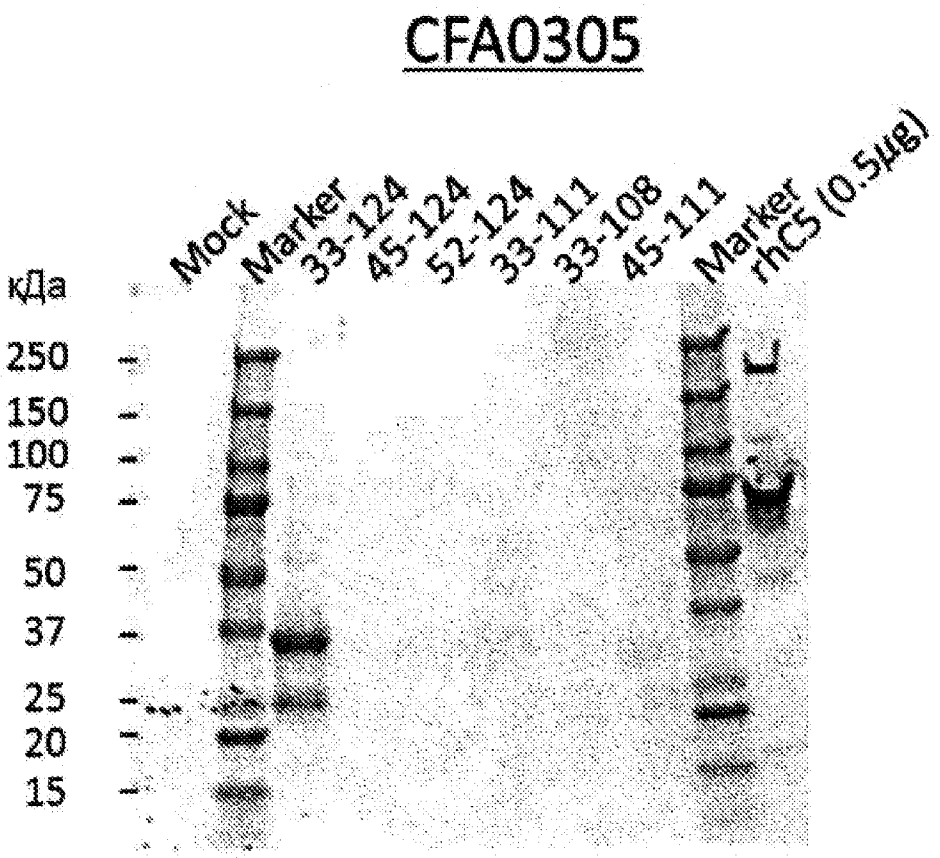


Новий аркуш

Фіг. 4


Анти-GST
Mock
Marker
33-124
45-124
52-124
33-111
33-108
45-111
Marker
rhCS (0.5μg)
кДа
250
150
100
75
50
37
25
20
15

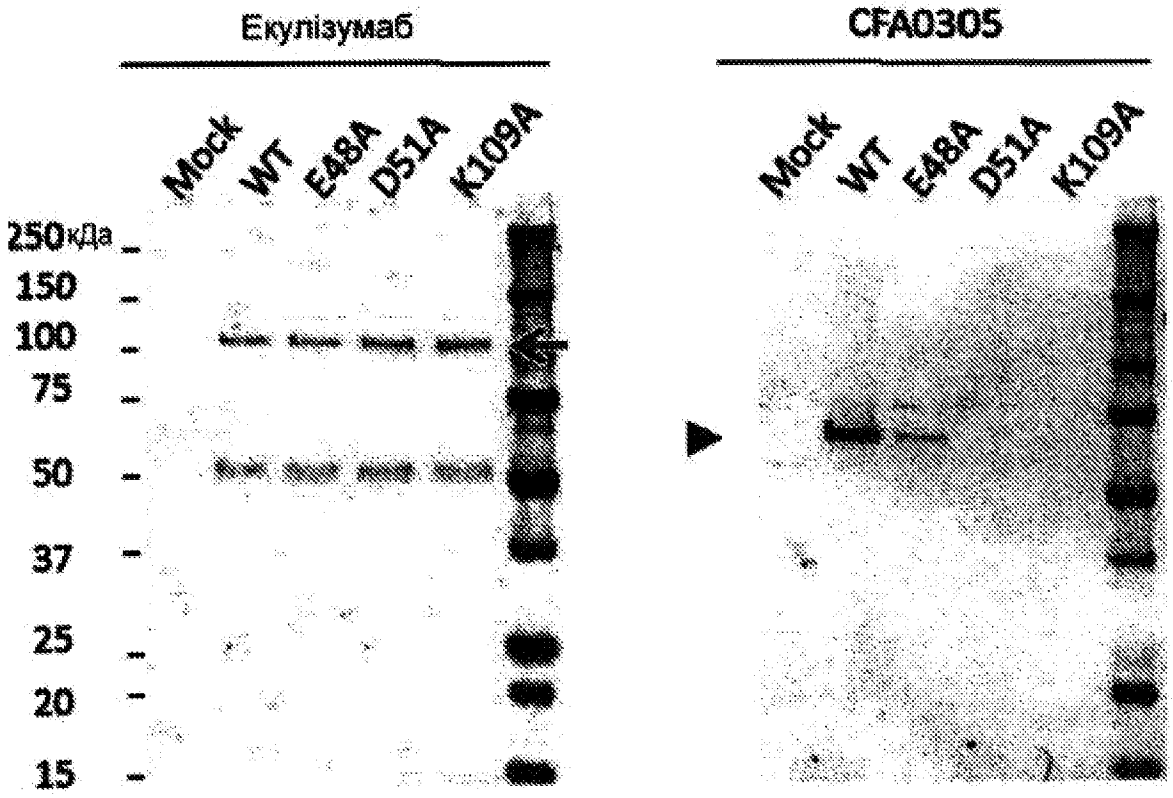
Фіг. 5A


CFA0305
Mock
Marker
33-124
45-124
52-124
33-111
33-108
45-111
Marker
rhCS (0.5μg)
кДа
250
150
100
75
50
37
25
20
15

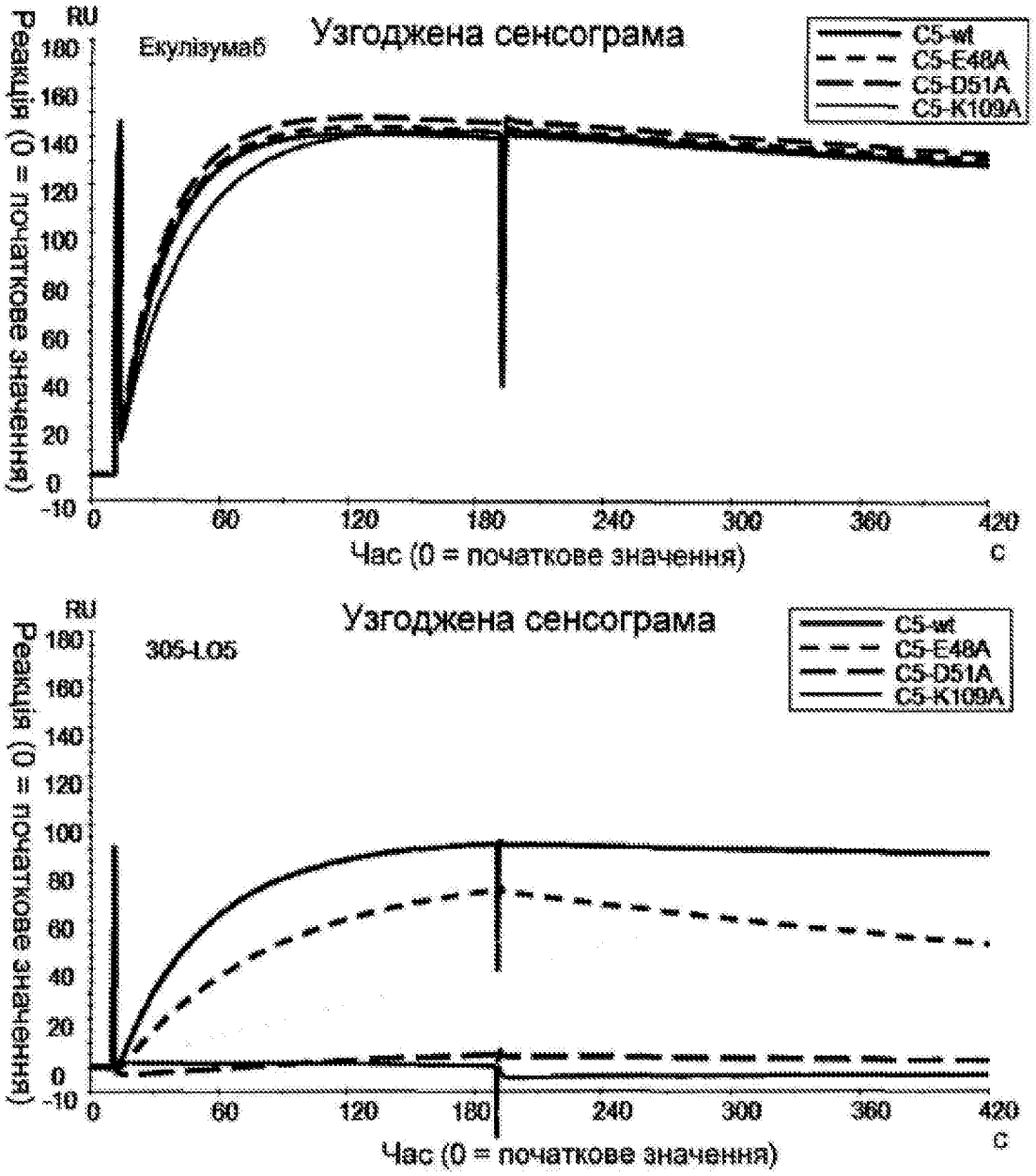
Фіг. 5B

1
Бета-ланцюг С5 людини
660
GST-19
180
GST-161
340
GST-321
500
GST-481
660
домен MG1-MG2
1
225
GST-33
124
GST-45
124
GST-52
124
GST-33
111
GST-33
108
GST-45
111

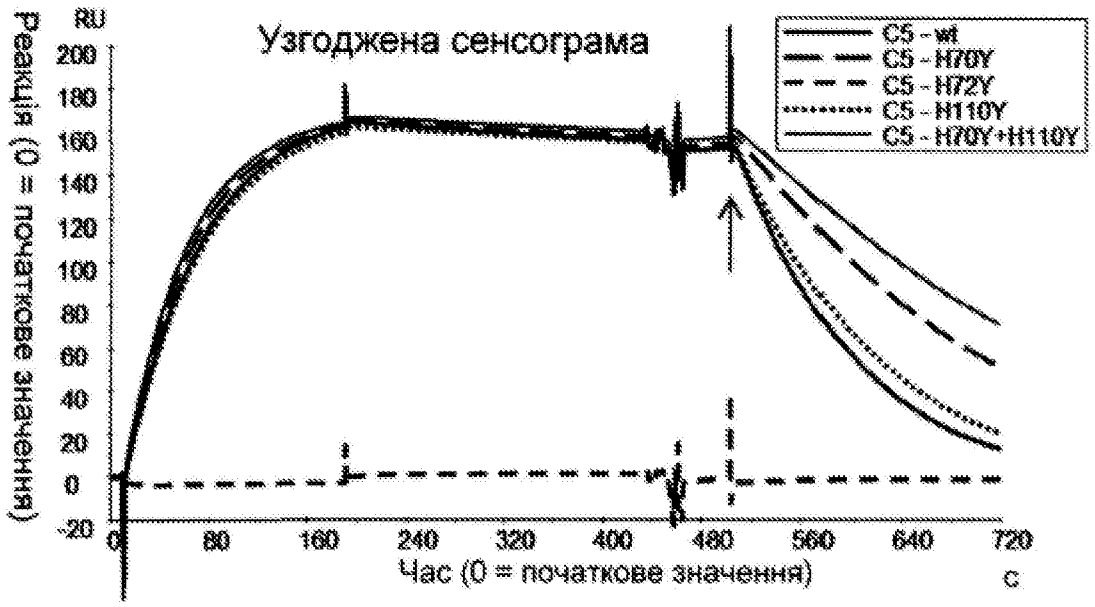
Фіг. 5С


Екулізумаб
CFA0305
Mock
WT
E48A
D51A
K109A
Mock
WT
E48A
D51A
K109A
250кДа
150
100
75
50
37
25
20
15

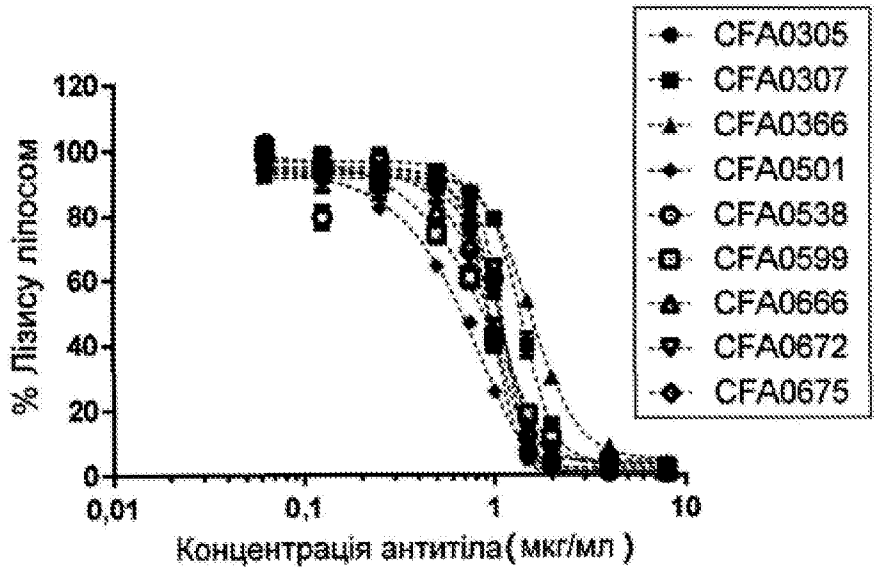
Фіг. 6


Екулізумаб
Узгоджена сенсограма
C5-wt
C5-E48A
C5-D51A
C5-K109A
RU
Реакція (0 = початкове значення)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-10
0
60
120
180
240
300
360
420
Час (0 = початкове значення)
с
305-LO5
Узгоджена сенсограма
C5-wt
C5-E48A
C5-D51A
C5-K109A
RU
Реакція (0 = початкове значення)
Час (0 = початкове значення)
с

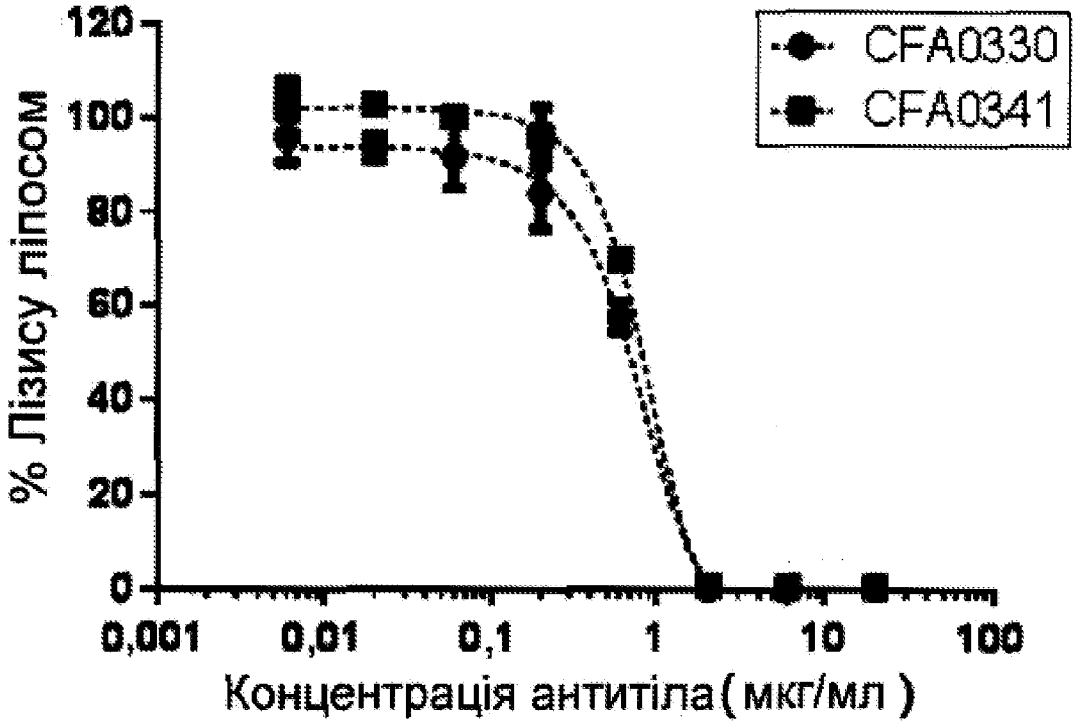
Фіг. 7


Узгоджена сенсограма
RU
Реакція (0 = початкове значення)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0
80
160
240
320
400
480
560
640
720
Час (0 = початкове значення)
с
C5 - wt
C5 - H70Y
C5 - H72Y
C5 - H110Y
C5 - H70Y+H110Y

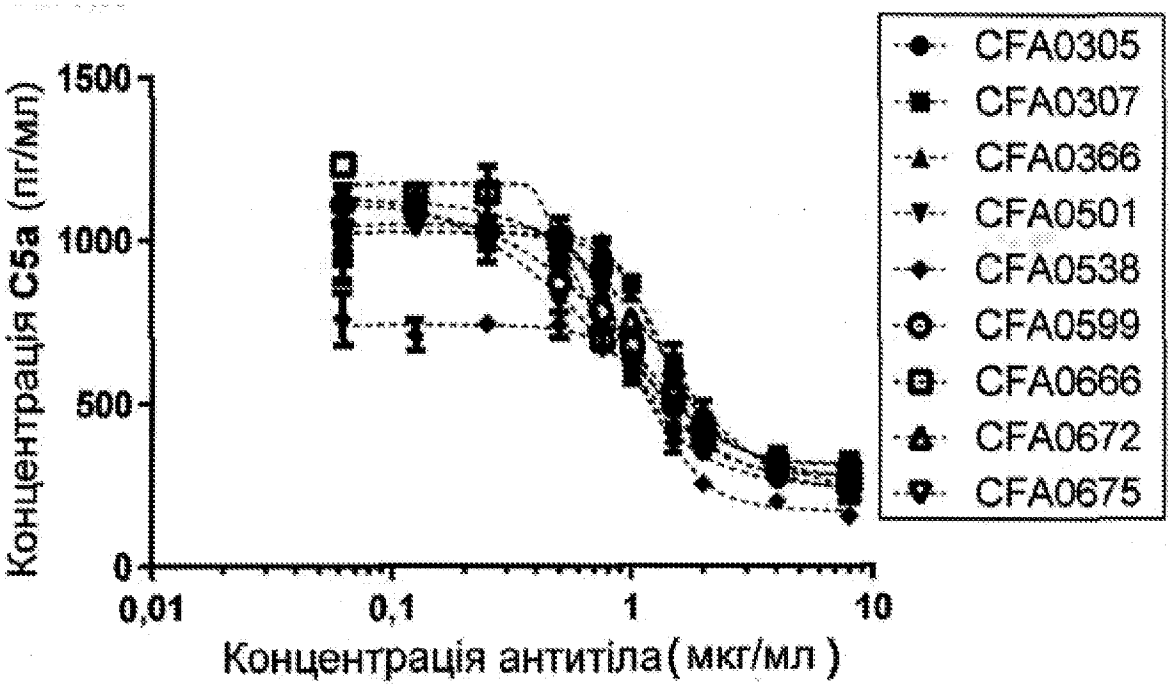
Фіг. 8


CFA0305
CFA0307
CFA0366
CFA0501
CFA0538
CFA0599
CFA0666
CFA0672
CFA0675
% Лізису ліпосом
120
100
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
Концентрація антитіла (мкг/мл)

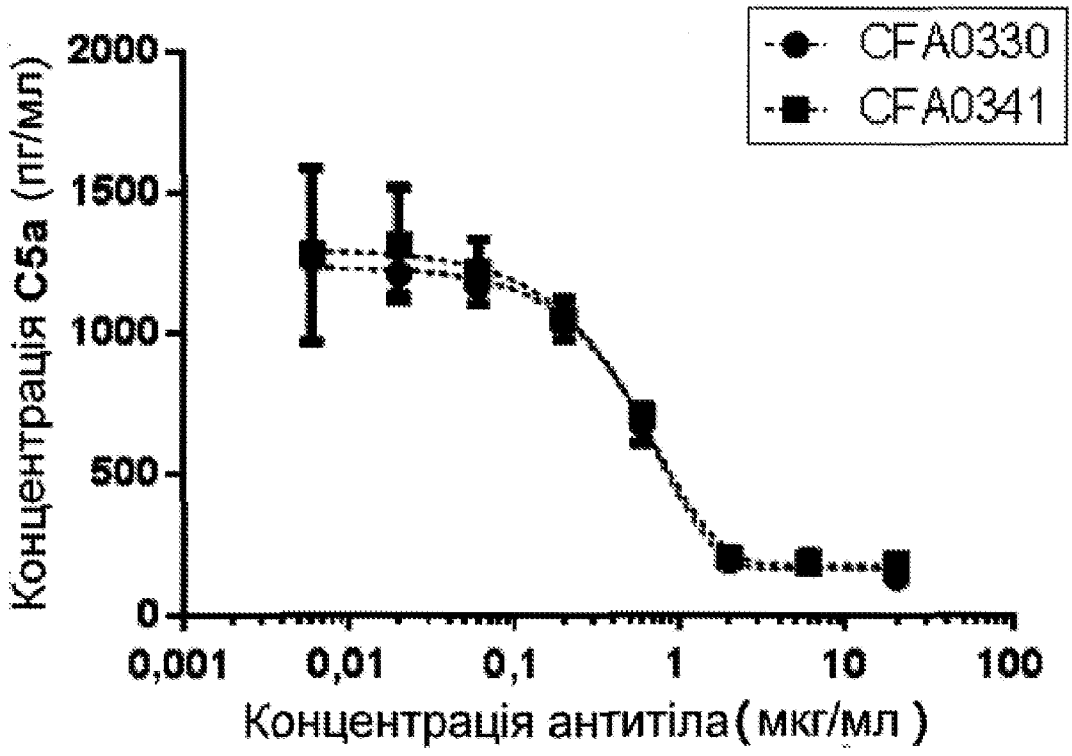
Фіг. 9А


CFA0330
CFA0341
% Лізису ліпосом
120
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Концентрація антитіла (мкг/мл)

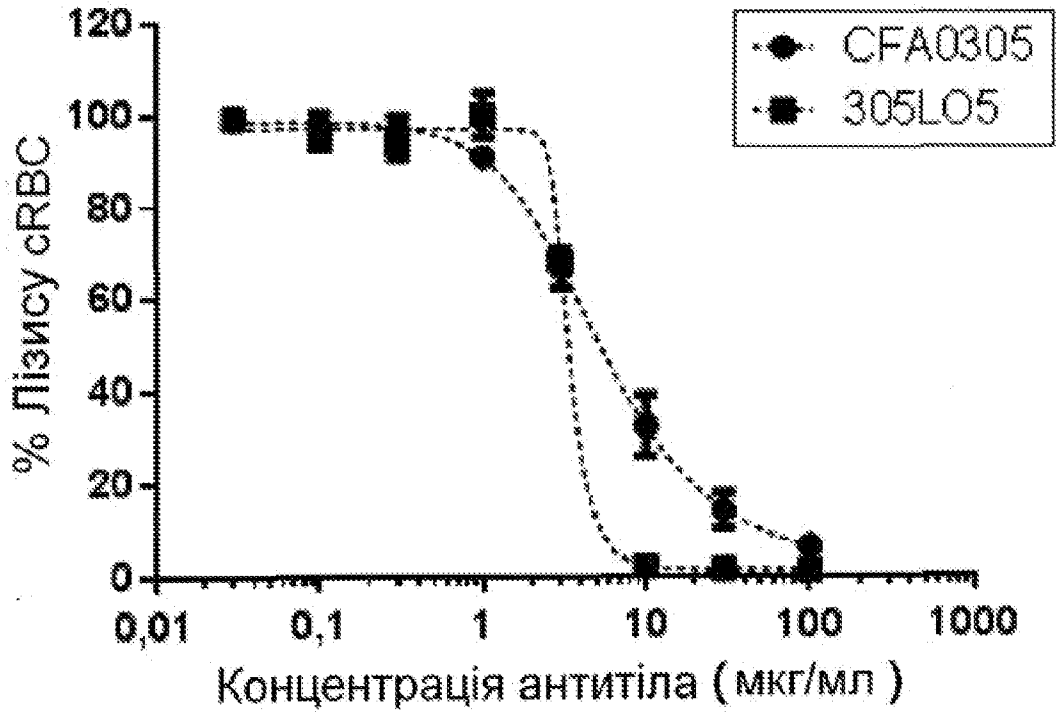
Фіг. 9В



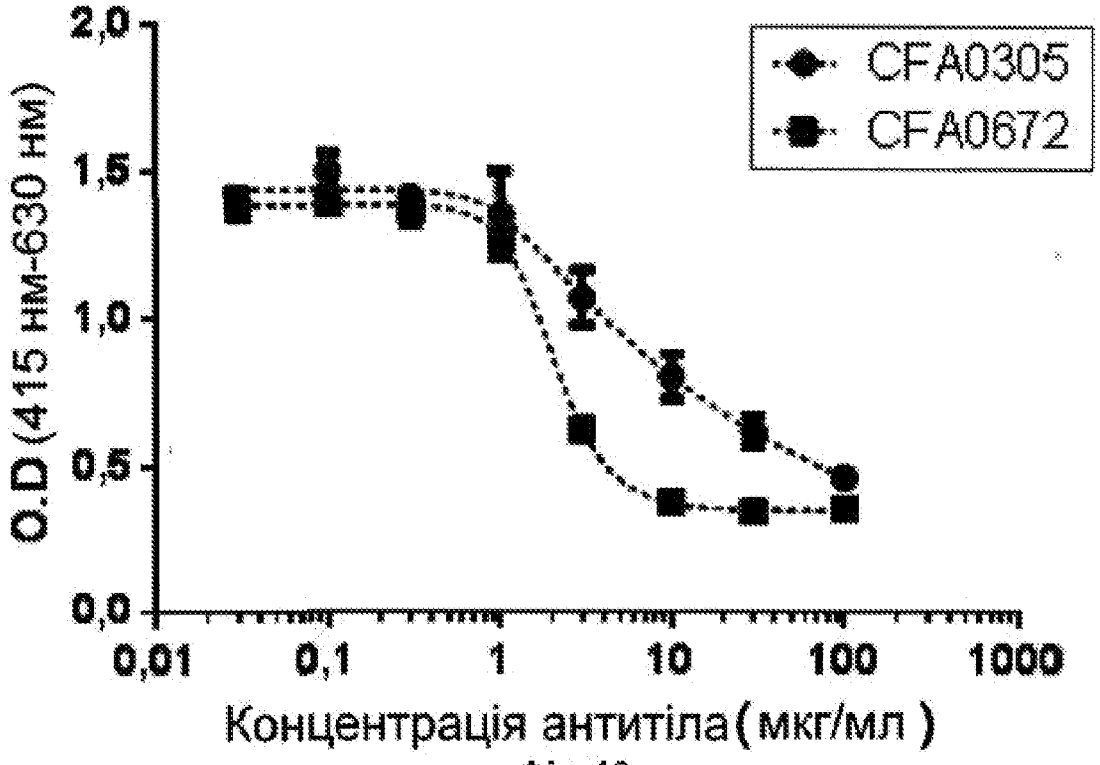
Фіг. 10А



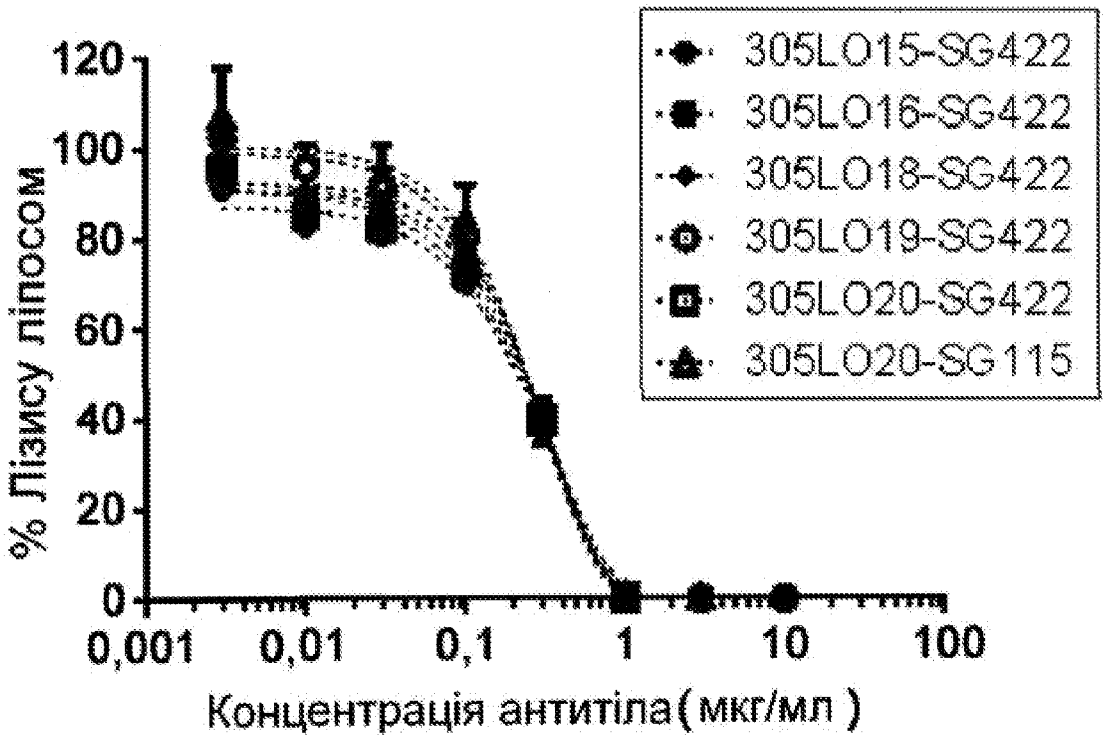
Фіг. 10В


CFA0305
305LO5
% Лізису cRBC
120
100
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Концентрація антитіла (мкг/мл)

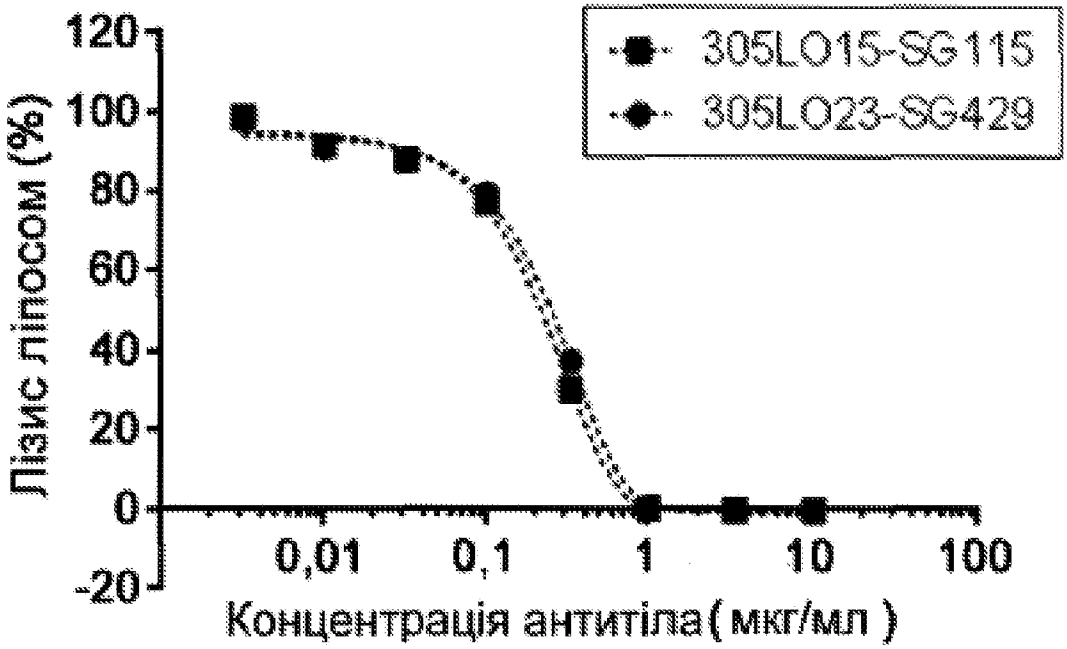
Фіг. 11


CFA0305
CFA0672
O.D (415 нм-630 нм)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Концентрація антитіла (мкг/мл)

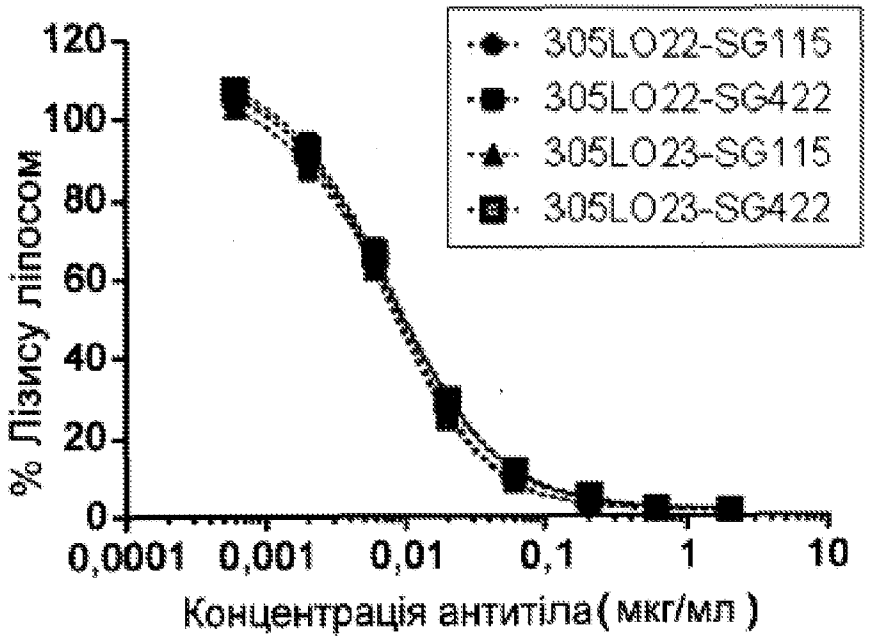
Фіг. 12


305LO15-SG422
305LO16-SG422
305LO18-SG422
305LO19-SG422
305LO20-SG422
305LO20-SG115
% Лізису ліпосом
120
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Концентрація антитіла (мкг/мл)

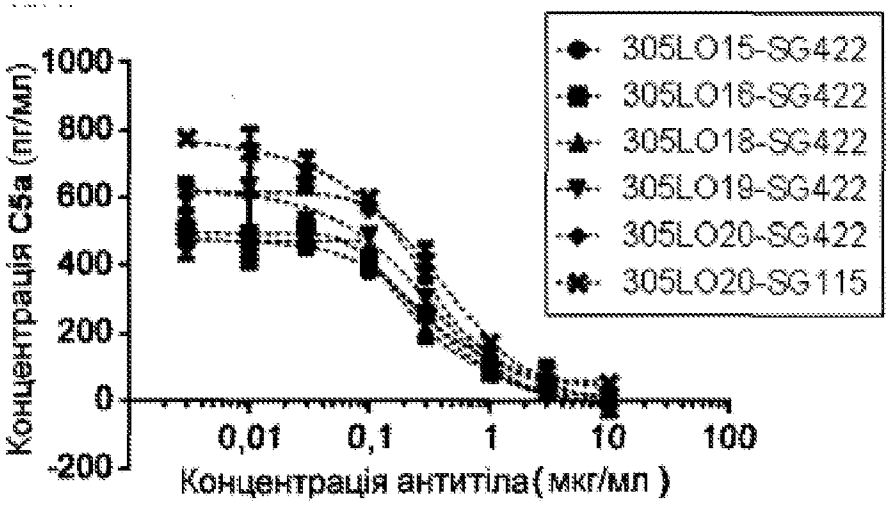
Фіг. 13


305LO15-SG115
305LO23-SG429
Лізис ліпосом (%)
120
100
80
60
40
20
0
-20
0,01
0,1
1
10
100
Концентрація антитіла (мкг/мл)

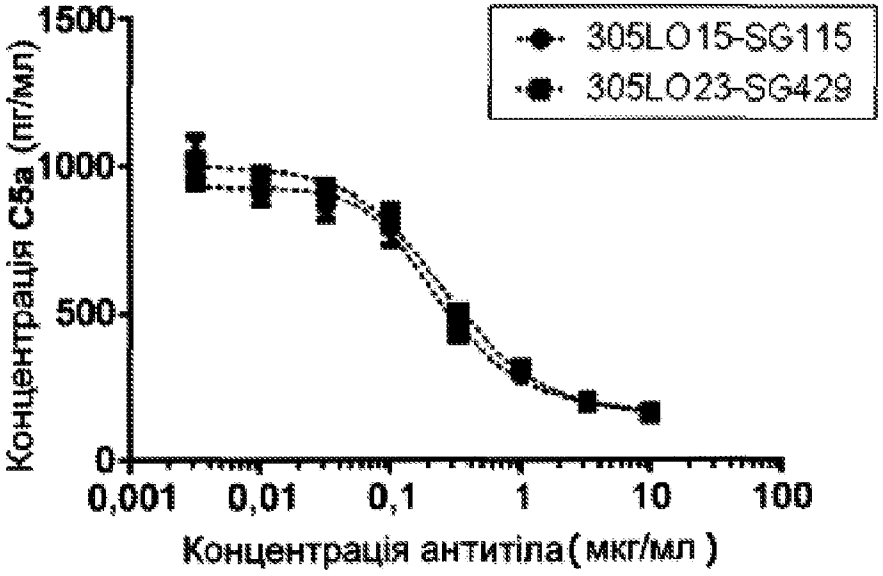
Фіг. 14


305LO22-SG115
305LO22-SG422
305LO23-SG115
305LO23-SG422
% Лізису ліпосом
120
100
80
60
40
20
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Концентрація антитіла (мкг/мл)

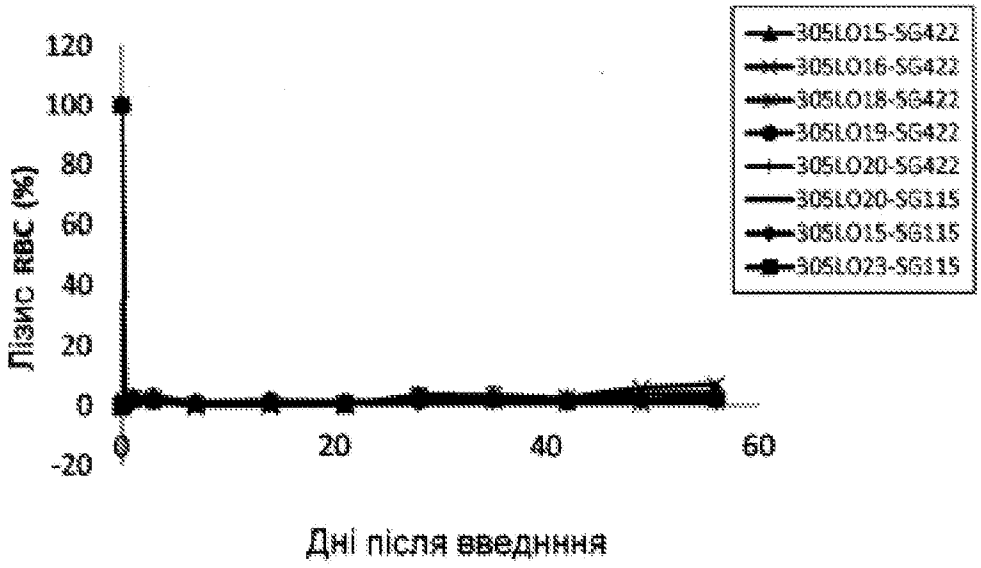
Фіг. 15


305LO15-SG422
305LO16-SG422
305LO18-SG422
305LO19-SG422
305LO20-SG422
305LO20-SG115
Концентрація C5a (пг/мл)
1000
800
600
400
200
0
-200
0,01
0,1
1
10
100
Концентрація антитіла (мкг/мл)

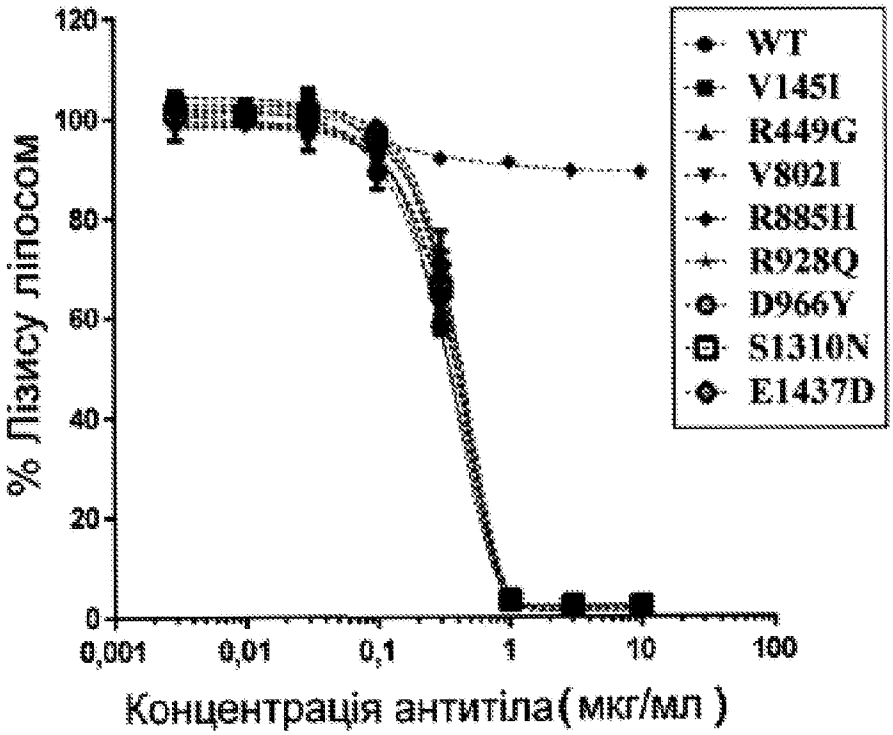
Фіг. 16


305LO15-SG115
305LO23-SG429
Концентрація C5a (пг/мл)
1500
1000
500
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Концентрація антитіла (мкг/мл)

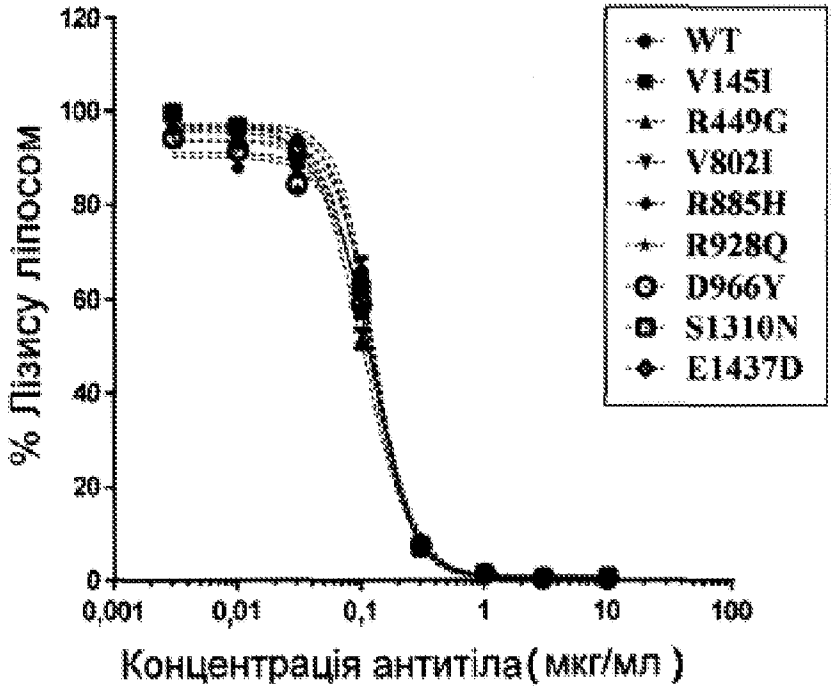
Фіг. 17


305LO15-SG422
305LO16-SG422
305LO18-SG422
305LO19-SG422
305LO20-SG422
305LO20-SG115
305LO15-SG115
305LO23-SG115
Лізис RBC (%)
120
100
80
60
40
20
0
-20
0
20
40
60
Дні після введення

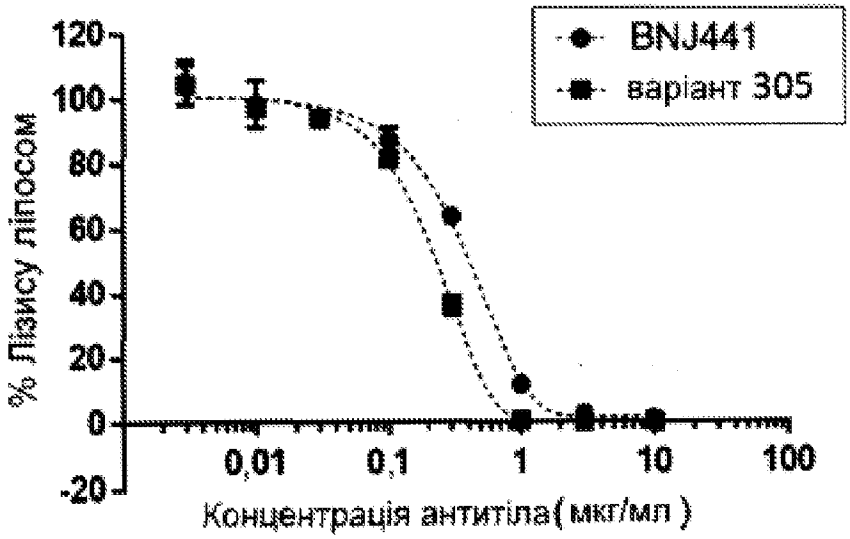
Фіг. 18


% Лізису ліпосом
120
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Концентрація антитіла (мкг/мл)
WT
V145I
R449G
V802I
R885H
R928Q
D966Y
S1310N
E1437D

Фіг. 19

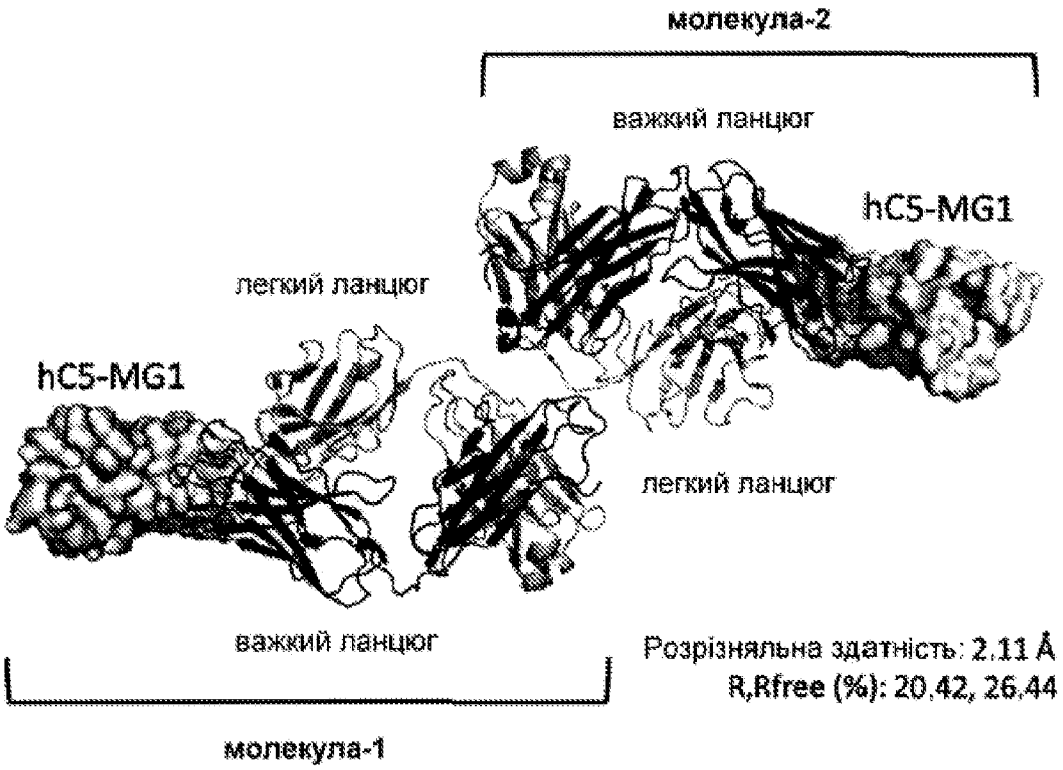

% Лізису ліпосом
120
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Концентрація антитіла (мкг/мл)
WT
V145I
R449G
V802I
R885H
R928Q
D966Y
S1310N
E1437D

Фіг. 20

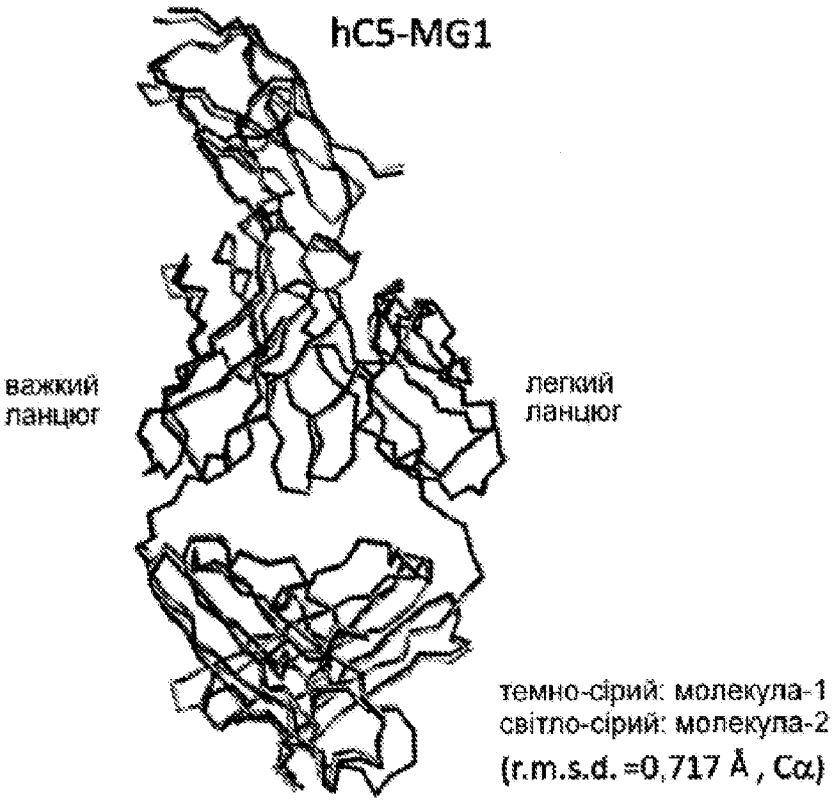

BNJ441
варіант 305
% Лізису ліпосом
120
100
80
60
40
20
0
-20
0,01
0,1
1
10
100
Концентрація антитіла (мкг/мл)

Фіг. 21

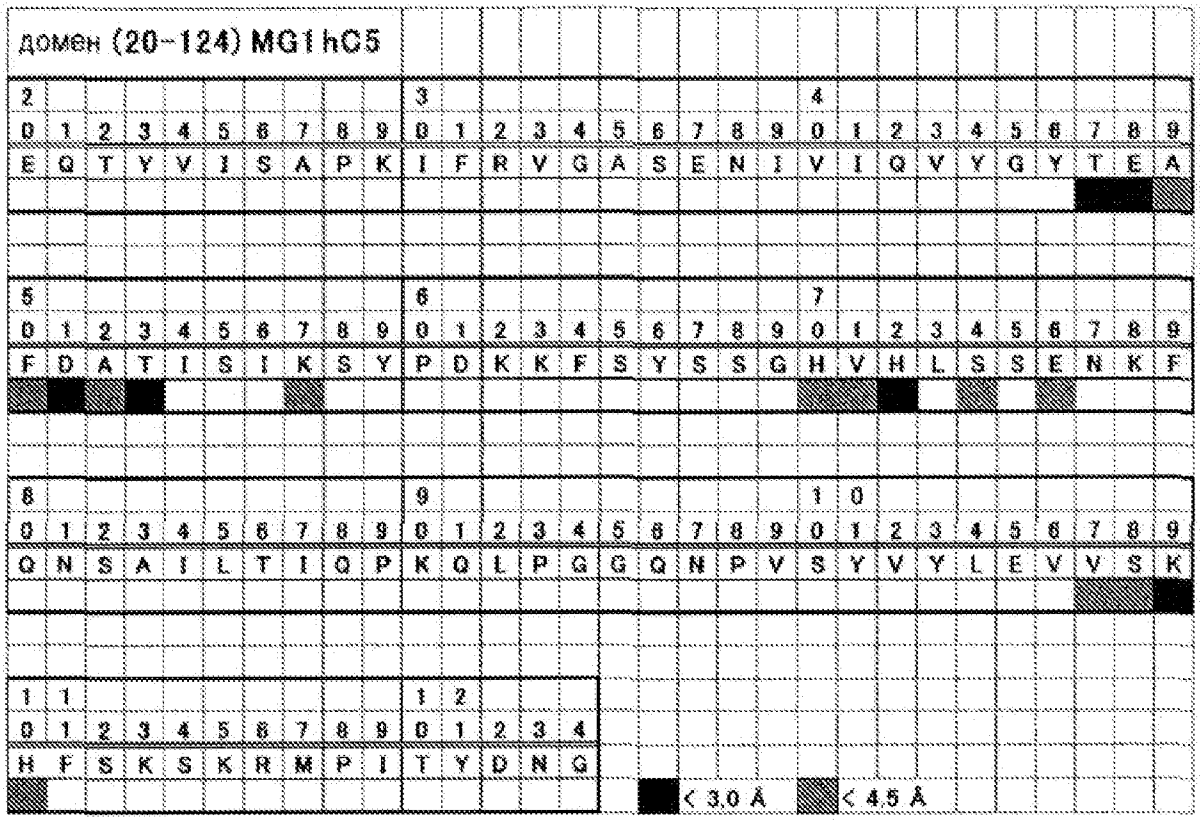
A)


молекула-2
важкий ланцюг
hC5-MG1
легкий ланцюг
hC5-MG1
легкий ланцюг
важкий ланцюг
Розрізняльна здатність: 2.11 Å
R,Rfree (%): 20.42, 26.44
молекула-1

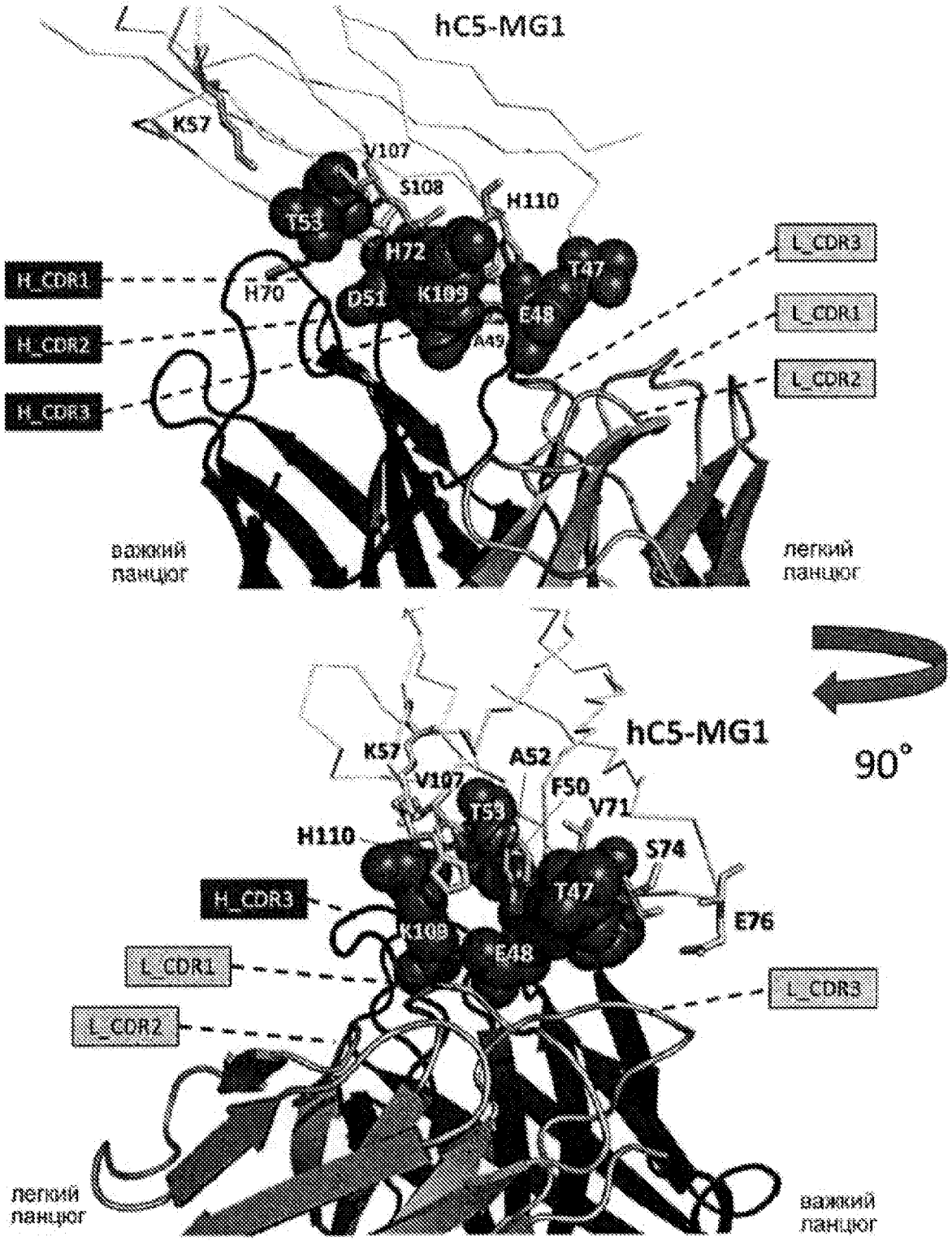
B)


hC5-MG1
важкий ланцюг
легкий ланцюг
темно-сірий: молекула-1
світло-сірий: молекула-2
(r.m.s.d. =0,717 Å , Cα)

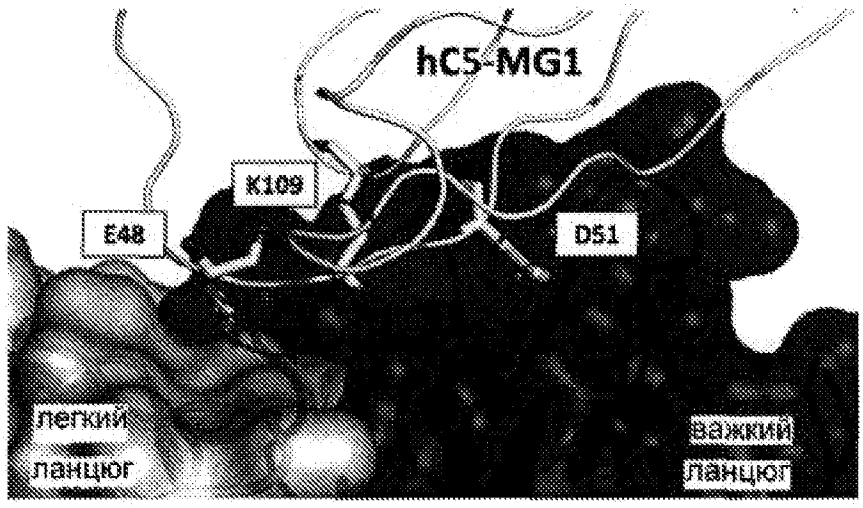
Фіг. 22



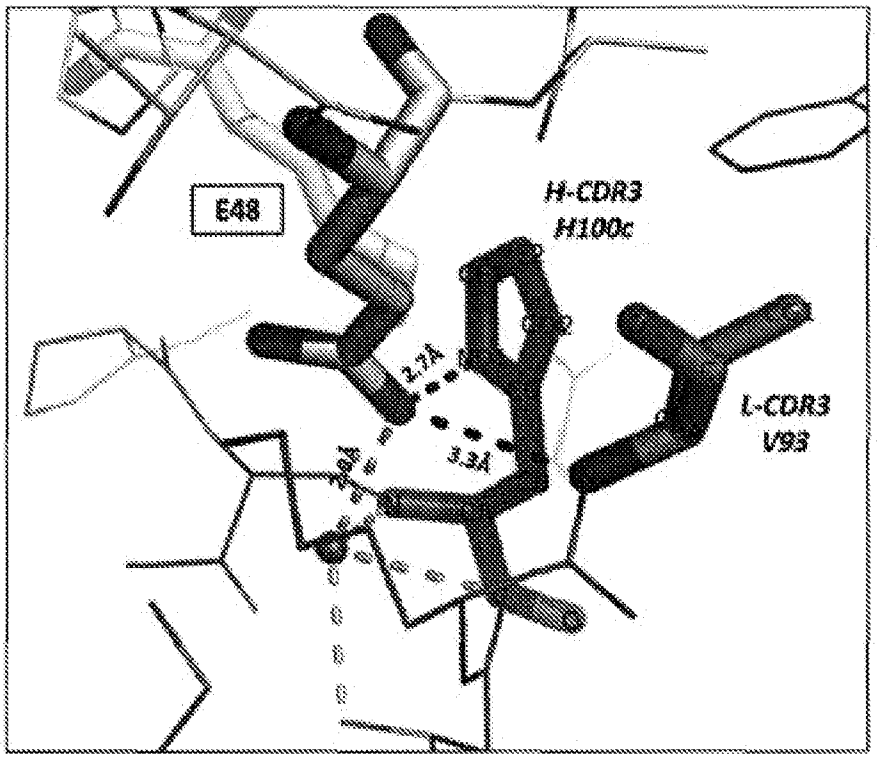
Фіг. 23 А


hC5-MG1
K57
V107
S108
H110
T53
H72
H_CDR1
H70
D51
K109
T47
L_CDR3
L_CDR1
H_CDR2
A49
E48
L_CDR2
H_CDR3
важкий ланцюг
легкий ланцюг
hC5-MG1
90°
K57
A52
V107
F50
V71
T53
H110
S74
H_CDR3
T47
E76
K109
E48
L_CDR1
L_CDR3
L_CDR2
легкий ланцюг
важкий ланцюг

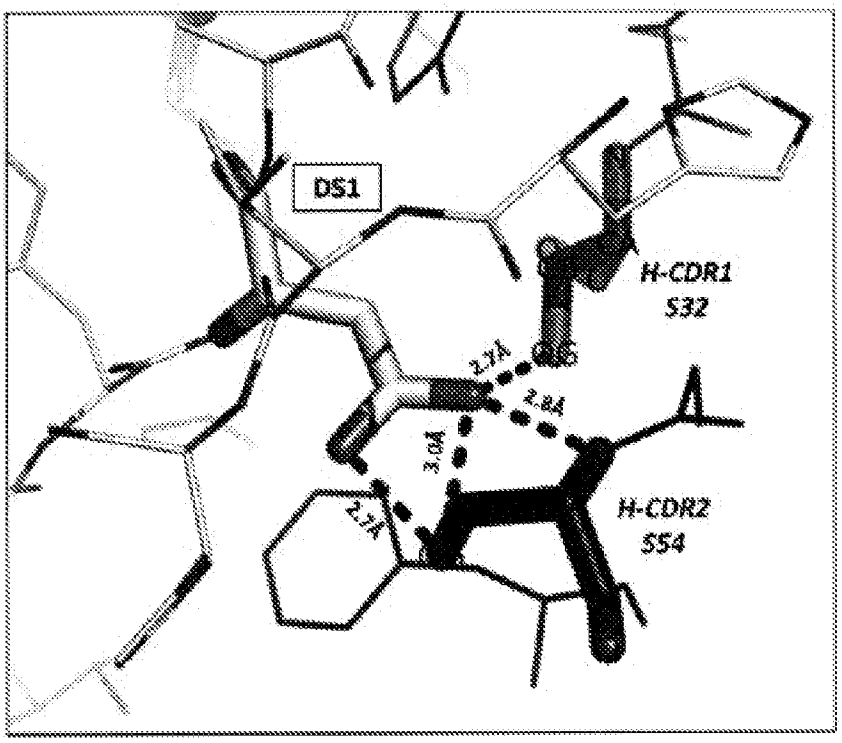
Фіг. 23B



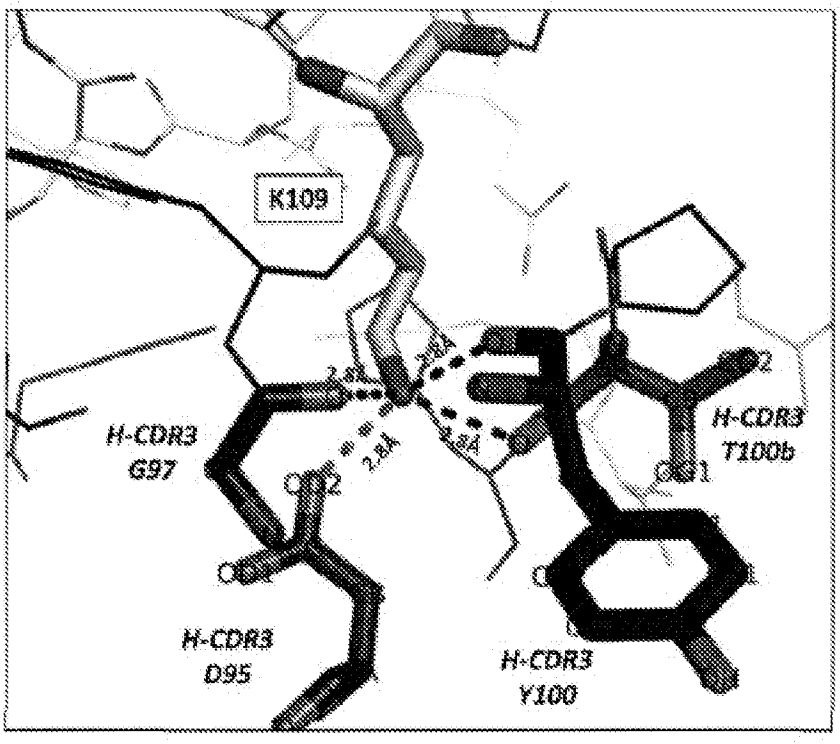
Фіг. 24A



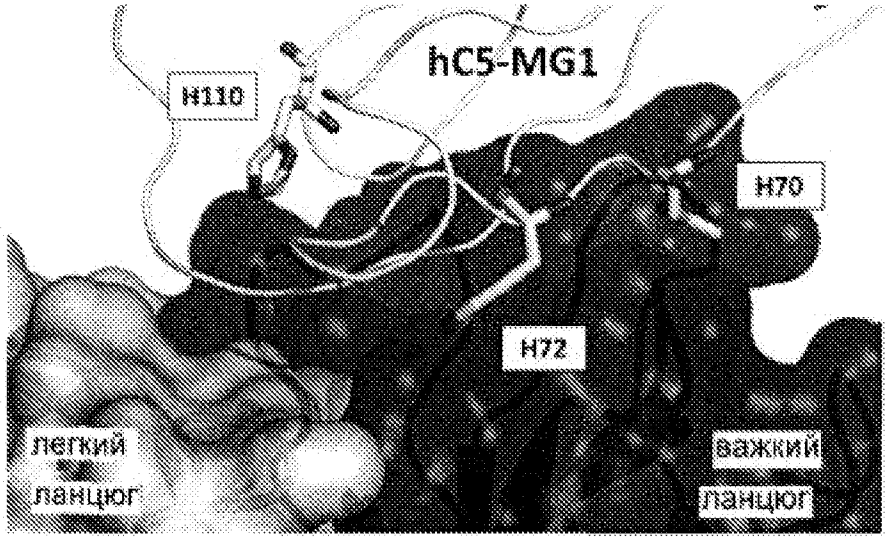
Фіг. 24B



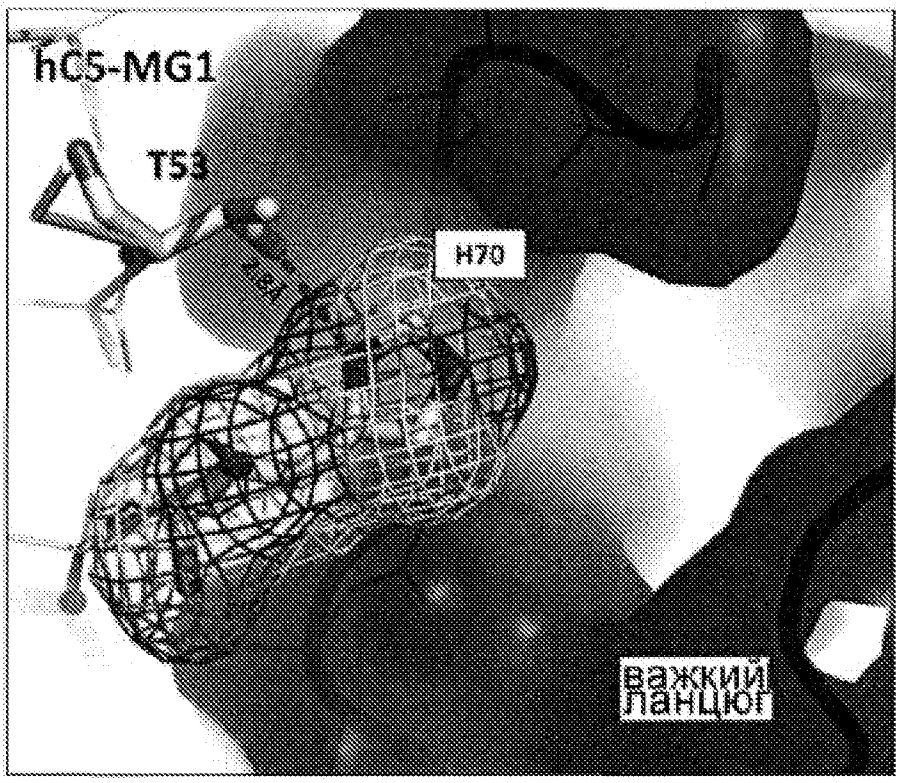
Фіг. 24C



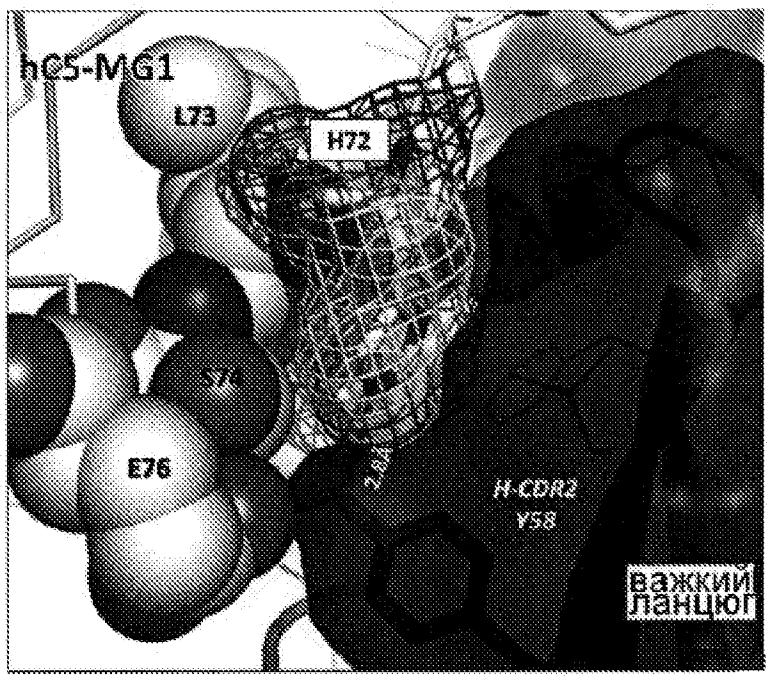
Фіг. 24D



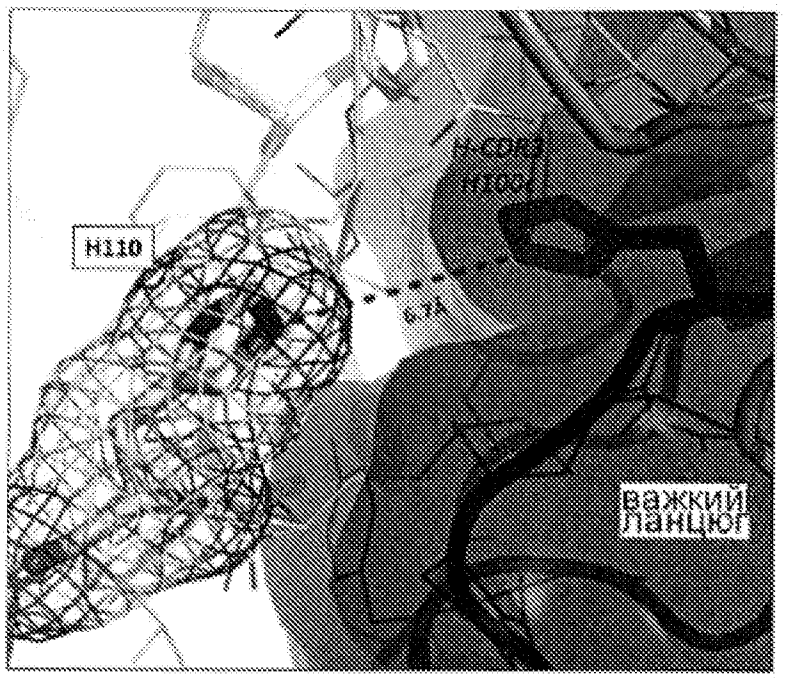
Фіг. 25A



Фіг. 25B



Фіг. 25C



Фіг. 25D

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

ДО "Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій", вул. Дмитра Годзенка, 1, м. Київ – 42, 01601