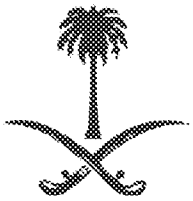


بسم الله الرحمن الرحيم

**المملكة العربية السعودية**

**مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية**

إن المشرف العام على مكتب البراءات السعودي، وبموجب أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/٢٧ وتاريخ ١٤٢٥/٠٥/٢٩هـ، واستناداً لأحكام اللائحة التنفيذية له الصادرة بالقرار الإداري رقم ٣٦٠٧٣٢٩-٢-١٦١ وتاريخ ١٤٣٦/١٢/٣٠ هـ، يقرر منح:

سويدش اورفان بيوفيتروم ايه بى ( بى يو بى ال)

Swedish Orphan Biovitrum AB (publ)

**براءة اختراع رقم ٦٢٤٧**

بتاريخ ١٤٤٠/٠٤/١٦هـ الموافق ٢٠١٨/١٢/٢٣ م

**عن الاختراع المسمى/** بولي ببتيدات ثابتة ترتبط بمكمل بشري C5

Stable polypeptides binding to human complement c5

ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق التي يمنحها النظام في المملكة العربية السعودية.

**المشرف العام على مكتب البراءات السعودي**

**م. صقر بن ناصر الفطيماني**

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية KACST

[19] المملكة العربية السعودية SA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] رقم البراءة: ٦٢٤٧
[45] تاريخ المنح: ١٤٤٠/٠٤/١٦ هـ
الموافـــق: ٢٠١٨/١٢/٢٣ م

[12] براءة اختراع

[72] اسم المخترع: جواكيم نيلسون، اريك نوردلينج

[73] مالك البراءة: سويدش اورفان بيوفيتروم ايه بى ( بى يو بى ال)

عنوانه: اس اى – ١١٢ ٧٦ ستوكهولم، السويد

جنسيته: سويدية

[74] الوكيل: شركة الهدف لخدمات العلامات المحدودة

[21] رقم الطلب: ٥١٦٣٧٠٦٢٢

[22] تاريخ دخول المرحلة الوطنية: ١٤٣٧/٠٥/١٦ هـ
الموافق: ٢٠١٦/٠٢/٢٥ م

تاريخ الإيداع للطلب الدولي: ٢٠١٤/٠٨/٢٨ م

[86] رقم الطلب الدولي: PCT/EP2014/068282

[87] رقم النشر الدولي: WO/2015/028558

تاريخ النشر الدولي: ٢٠١٥/٠٣/٠٥ م

[30] بيانات الأسبقية:

| | | |
|---|---|---|
| SE | ١٣٥٠٩٨٦-٤ | ٢٠١٣/٠٨/٢٨م |

[51] التصنيف الدولي (IPC[8]) :
C07K 014/047, A61K 038/000

[56] المراجع:

| | | |
|---|---|---|
| US | ٢٠٠٥٠٩٠٤٤٨ | ٢٠٠٥/٠٤/٢٨ م |
| WO | ٢٠٠٥٠٧٥٥٠٧ | ٢٠٠٥/٠٨/١٨ م |
| WO | ٢٠٠٩٠٧٧١٧٥ | ٢٠٠٩/٠٦/٢٥ م |
| WO | ٢٠١٢٠٠٤٣٨٤ | ٢٠١٢/٠٤/١٢ م |

اسم الفاحص: ندى بنت هذال القحطاني

[54] اسم الاختراع: بولي ببتيدات ثابتة ترتبط بمكمل بشري C5

Stable polypeptides binding to human complement c5

[57] الملخص: يتعلق الاختراع الحالي ببولي ببتيد polypeptide قادر على ربط مكون مكمل بشري ٥ human complement component (C5)، حيث يشتمل البولي ببتيد المذكور على متوالية الحمض الأميني amino acid sequence [BM]-[L2]-[BM] QSX42X43LLX46EAKKLX52X53X54Q حيث عبارة عن حافز ربط binding motif [BM] C5؛ [L2] عبارة عن حلقة وصل بيني interconnecting loop؛ $X_{42}$ يتم اختيارها من A و S؛ $X_{43}$ يتم اختيارها من N و E؛ $X_{46}$ يتم اختيارها من A، S و C؛ $X_{52}$ يتم اختيارها من E، N و S؛ $X_{53}$ يتم اختيارها من D، E و S، بشرط أن $X_{53}$ لا تكون D عندما تكون $X_{52}$ عبارة عن N؛ و $X_{54}$ يتم اختيارها من A و S.

عدد عناصر الحماية (١٥)، عدد الأشكال (٦)

# بولي ببتيدات ثابتة ترتبط بمكمل بشري C5

# Stable polypeptides binding to human complement c5

## الوصف الكامل

### خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع الحالي ببولي ببتيدات polypeptides ترتبط بمكون المكمل البشري ٥ human complement component (C5) وباستخدام تلك البولي ببتيدات في العلاج.

يعد البروتين المكمل C5 complement protein أحد المكونات الأساسية للنظام المكمل complement system؛ وجزء رئيسي من جهاز المناعة الفطري innate immune system. والنظام المكمول عبارة عن نظام مراقبة surveillance system مناعي معقد intricate immune له العديد من المهام في عمليات عديدة محكومة. ويعمل كنظام دفاعي defense system أول للعائل ضد الإصابة بالعدوى من الكائنات الأخرى، وفي تمييز أنسجة العائل السليمة healthy host tissues من البقايا الخلوية cellular debris والخلايا المتلاشية apoptotic والنخرية necrotic. علاوة على ذلك، يدخل في إخلاء المعقدات المناعية immune complexes، وتنظيم الاستجابة المناعية التكيفية adaptive immune response، وتعزيز تجدد الأنسجة tissue regeneration، والتوعي angiogenesis، وانتقال الخلايا الجذعية stem cells وتطور الجهاز العصبي المركزي central nervous system (Woodruff *et al*. Mol Immunol 2011, 48 (14):1631-1642); (Ricklin *et al*. Nat Immunol 2010, 11(9):785-795). وقد يؤدي أي محفز trigger، مثل تنشيط خاطئ أو غير مقيد، أو تنظيم غير كاف، يخل بالتوازن الدقيق لتنشيط وتنظيم المكمل إلى حالات مرضية مثل الهجوم الذاتي لخلايا العائل مما يؤدي إلى تلف كبير في الأنسجة.

يتكون النظام المكمل من حوالي ٣٠ بروتين. وهناك ثلاث مسارات لبدء المكمل؛ المسار التقليدي حيث يستخدم C1q في التعرف على المعقدات المناعية على سطح الخلايا؛ ومسار الليكتين lectin pathway الذى يبدأ عندما يتعرف الليكتين الرابط للمانوز mannose-binding lectin (MBL) على سكريات معينة؛ والمسار البديل الذي يبدأ تلقائياً بالتحلل المائي لعامل المكمل complement factor ٣ (C3)، وهي عملية بجزيئات molecules معينة على سطح خلية الكائن الثديي

mammalian cell غير موجودة على مسببات المرض الغازية. كما يعمل المسار البديل كحلقة تضخيم amplification loop للنظام المكمل. وتلتقي جميع المسارات الثلاثة في مستوى C3. ويؤدي انشطار C3 إلى C3a و C3b إلى تكوين كونفيرتاز convertase الذي يشطر بدوره العامل المكون ٥ (C5) إلى C5a و C5b . ويعد C5a جاذباً قوياً لمختلف الخلايا المناعية immune cells بينما يتحول C5b إلى أوليجومر oligomerizes مع C6-9 لتكوين مسام pore يعرف بمعقد هجوم الغشاء membrane attack complex (MAC) وأحياناً بمعقد المكمل الطرفي terminal complement complex (TCC). ويؤدي تنشيط النظام المكمل إلى عدد من الآليات بهدف معادلة مسبب المرض؛ تكوين معقد هجوم الغشاء على سطح خلية مثل البكتريا الغازية invading bacteria يؤدي غلى التحلل lysis، وترسب منتجات انشطار C3 و C4 C3b و C4b يساعد على الطهاية مما يؤدي إلى بلعمة مسبب المرض عن طريق الملتهمات الكبرى macrophages والسموم المنتقية anaphylatoxins مثل C3a و C5a تجذب الخلايا الأحادية monocytes والعدلات neutrophils إلى موقع التنشيط، وزيادة المرقمات السطحية surface markers زيادة متحكم فيها مما يؤدي إلى زيادة الاستعداد المناعي وإطلاق السيتوكينات cytokines.

يعد C5 بروتين سكري glycoprotein ١٩٠ كيلو دالتون مكون من سلاسل بولي ببتيد مرتبطة بثاني كبريتيد disulfide-linked polypeptide chains، من النوعين ألفا alpha وبيتا beta، بكتلة جزيئية molecular mass من ١١٥ و٧٥ كيلو دالتون، على الترتيب (Tack *et al*. Biochem 1979, 18:1490-1497). Haviland *et al*. (J Immun 1991, 146: 362-368) تكون متوالية سي دنا cDNA الكاملة للمكمل البشري المساعد لـC5، والذي من المتوقع أن يشفر جزيء مساعد لحمض ١، ٦٧٦ أمينو 1,676-amino acid pro-molecule المحتوي على ببتيد قائد لـ١٨- حمض أميني 18-amino acid leader peptide ورابط ٤- حمض أميني 4-amino acid linker يفصل السلاسل بيتا وألفا (المتوالية برقم هوية: ٢٥١). ونظراً لأن C5 مشترك لجميع مسارات تنشيط المكمل، فإن إعاقة C5 سوف توقف تقدم التتابع بغض النظر عن المحفزات وبالتالي تمنع الخواص الضارة لتنشيط المكمل الطرفي مع ترك الوظائف الوقائية المناعية والتنظيمية المناعية لتتابع المكون القريب سليمة.

إن الدور الرئيسي لنظام المكمل في الدفاع ضد مسببات المرض بصفة عامة يجعله هدفاً مثيراً للتدخل الصيدلاني. وهذا ما أكده دخول العديد من الطفرات أو التنظيف التالف للمكمل في مختلف الأمراض والحالات. ويشمل ذلك زيادة التعرض لأمراض المناعة الذاتية auto-immune diseases مثل الذئبة الحمامية الجهازية systemic lupus erythematosis (SLE) حيث يحفز ترسب المعقدات المناعية المسار التقليدي (Manderson *et al*. Annu Rev Immunol 2004, 22:431-456). بالإضافة إلى ذلك، غالبا ما تؤدي طفرات البروتينات المكملة mutations of the complement proteins C1-C5 إلى الذئبة الحمامية الجهازية أو الذئبة الحمامية الجهازية أو أعراض مشابهة. ومن أمراض المناعة الذاتية الأخرى المتداخلة بقوة مع النظام المكمل التهاب المفاصل الروماتويدي rheumatoid arthritis (RA) حيث قد تنشط المعقدات المناعية المكون في مفصل joint التهاب المفاصل الروماتويدي، متلازمة Sjögren's syndrome، الالتهاب الجلدي والعضلي dermatomyositis وغيرها من الأمراض التي يوجهها جسم مضاد ذاتي autoantibody مثل متلازمة Guillain-Barré syndrome (GBS)، ومتلازمة فيشر (Kaida *et al*. J. Neuroimmun 2010, 223:5-12)، ومختلف أنواع التهاب الأوعية vasculitis، التصلب الجهازي systemic sclerosis، غشاء قاعدي مضاد للكبيبة anti-glomerular basement membrane (anti-GBM) ومتلازمة مضاد الدهن الفسفوري anti-phospholipid syndrome (APS). (Chen *et al*. J Autoimmun 2010, 34:J276-J286) . علاوة على ذلك، فقد ثبتت فاعلية تثبيط المكمل complement inhibition في النماذج الحيوانية تلك الحالات المختلفة مثل التهاب دواعم السن periodontitis (Abe *et al*. J Immunol 2012, 189:5442-5448)، وشفاء الجروح wound healing (Cazender *et al*. Clin Dev Immunol 2012, on-line publication)، ونمو الأورام tumor growth (Markiewski *et al*. Nat Immunol 2008, 9:1225-1235)، وأمراض العين مثل التهاب العنبية uveitis والتدهور العضلي المتعلق بالسن age-related macular degeneration (AMD) (Copland *et al*. Clin Exp Immunol 2009, 159:303-314).

ولقد عرفت الأجسام المضادة Antibodies المستهدفة للمكون البشري C5، على سبيل المثال، من البراءة الدولية ٢٩٦٩٧/٩٥؛ و البراءة الدولية ٣٠٩٨٥/٠٢؛ و البراءة الدولية ٠٠٧٥٥٣/٢٠٠٤.

ويعد إكوليزوماب Eculizumab (Soliris™) جسما مضاداً أحادي النسيلة متوافقاً مع البشر humanized monoclonal antibody موجه ضد البروتين C5 ويمنع انشطار C5 إلى C5a و C5b. ولقد ثبتت فاعلية إكوليزوماب في علاج بِيلَة هيموغلوبينيَّة لَيلِيَّة انْتِيابِيَّة paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)، وهو مرض دم نادر وأحياناً يهدد الحياة يتميز بأنيميا انحلالية داخل الأوعية intravascular hemolytic anemia، وميل للتخثر thrombophilia وفشل النخاع العظمي bone marrow failure، وقد تم اعتماده لدواعي الاستعمال هذه. كما أنه قد تم اعتماد إكوليزوماب مؤخراً من جانب منظمة الأغذية والعقاقير لعلاج متلازمة انحلال دم غير نمطي atypical hemolytic syndrome (aHUS)، وهو مرض نادر ولكنه يهدد الحياة ناجم عن فقد التحكم في مسار المكون complement pathway البديل مما يؤدي إلى فرط تنشيط يظهر في صورة اعتلال أوعية دقيقة تخثري thrombotic microangiopathy (TMA) مما يؤدي إلى خطورة دائمة لتلف أعضاء حيوية vital organs مثل الكلى kidney، والقلب، والمخ. في متلازمة انحلال دم غير نمطي، يساعد زرع العضو التالف damaged organ بصورة مؤقتة فقط المريض عندما يستمر الكبد liver في إنتاج الصورة المطفرة من بروتين التحكم controlling protein (غالباً عامل المكمل H أو أي بروتين آخر للمسار البديل). ومن الأمراض ذات الصلبة ذات فسيولوجيا ممرضة حادة مؤقتة transient acute pathophysiology اتش يو أس HUS الناجم عن العدوى بإشريشيا كولار موجبة التوكسين شيجا Shiga toxin positive *E. coli* (STEC-HUS) وهناك بيانات إكلينيكية واعدة promising clinical data تدل على كفاءة أيضاً لهذه الحالة (Lapeyraque *et al*, N Engl J Med 2011, 364:2561-2563). وأخيراً، فقد ثبتت كفائة الجسم المضاد العائق blocking antibody لـC5 إكوليزوماب في الوقاية من الرفض الذي يتوسطه الجسم المضاد antibody mediated rejection (AMR) لدى متلقي كلى غير متوافقة بدرجة كبيرة (Stegall, M. D. *et al*. Am J Transplant 2011, 11:2405-2413)، وفي علاج أمراض عصبية مناعية ذاتية autoimmune neuropathies مثل التهاب النخاع والعصب neuromyelitis optica والوهن العضلي myasthenia gravis (Pittock *et al*. Lancet Neurol 2013, 12:554-562; Howard *et al*. Muscle Nerve 2013, 48:76-84).

وبغض النظر عن الأجسام المضادة تامة الطول full length antibodies، فقد تناولت الدراسات السابقة الشظايا المتغيرة وحدة السلسة single-chain variable fragments (scFV)، والأجسام الصغيرة، وأبتامرات aptamers التي تستهدف C5. ويمكن ربط هذه المثبطات لـC5 بمواقع مختلفة (قمم لاصقة epitopes) على جزيء C5 وقد تكون ذات حالات تأثير مختلفة. على سبيل المثال، بينما يتفاعل إيكوليزوماب مع C5 على مسافة معينة من موقع انشطار كونفيرتاز convertase cleavage site، فإن الجسم الصغير Mubodina® يتفاعل مع موقع انشطار C5. ولقد كان من المفترض أن البروتين المثبط Complement inhibitory protein Inhibitor (OmCI, Nunn, M. A. *et al*. J Immunol 2005, 174:2084-2091) من القراد الناعم soft tick يرتبط بالطرف البعيد من النطاق الفائق *Ornithodoros moubata* القريب من موقع انشطار كونفيرتاز (Fredslund *et al*. Nat Immunol 2008, 9 (7):753-760). وعلى العكس من البروتينات proteins الثلاثة السابق ذكرها والتي تثبط انشطار C5، فإن الجسم المضاد وحيد النسيلة monoclonal antibody TNX-558 يرتبط بالقمة اللاصقة epitope لـC5 الموجودة على كل من C5 السليم و C5 المطلق دون تثبيط انشطار C5. (Fung *et al*. Clin Exp Immunol 2003, 133 (2):160-169)

يتم الكشف عن ببولي ببتيدات ربط C5 binding polypeptides، التي تشتمل على حافز ربط C5(BM ) binding motif، في طلب نشر براءة الاختراع الدولية رقم ٢٠١٣/٠٥٠١٣٩، المنشورة على أنها البراءة الدولية ٢٠١٣/١٢٦٠٠٦. وبصفة خاصة، يكشف البراءة الدولية ٢٠١٣/١٢٦٠٠٦ عن حافز ربط C5، مكون من متوالية الحمض الأميني amino acid sequence

$$EX_2X_3X_4A\ X_6X_7EID\ X_{11}LPNL\ X_{16}X_{17}X_{18}QW\ X_{21}AFIX_{25}\ X_{26}LX_{28}D,$$

حيث، كل منها مستقل عن الآخر،

$X_2$ يتم اختيارها من H، Q، S، T و V ؛

$X_3$ يتم اختيارها من I، L، M و V ؛

$X_4$ يتم اختيارها من A، D، E، H، K، L، N، Q، R، S، T و Y ؛

$X_6$ يتم اختيارها من N و W ؛

$X_7$ يتم اختيارها من A، D، E، H، N، Q، R ، S و T ؛

$X_{11}$ يتم اختيارها من A، E، G، H، K، L، Q، R، S ، T و Y ؛

$X_{16}$ يتم اختيارها من N و T ؛

$X_{17}$ يتم اختيارها من I ، L و V ؛

$X_{18}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، K، N، Q، R ، S و T ؛

$X_{21}$ يتم اختيارها من I ، L و V ؛

$X_{25}$ يتم اختيارها من D، E، G، H، N ، S و T ؛

$X_{26}$ يتم اختيارها من K و S ؛ و

$X_{28}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، N، Q، S ، T و Y .

تظهر أمثلة حوافز معينة رابطة لـC5، كما سبق الكشف عنه في الطلب الدولي ١٢٦٠٠٦/٢٠١٣، على أنها المتوالية برقم هوية: ١ – ٢٤٨ في طلب براءة الاختراع الحالي.

من المعروف من البراءة الدولية ١٢٦٠٠٦/٢٠١٣ أن ببتيدات peptides أو بولي ببتيدات polypeptides إضافية قد تحسن من ثبات البولي ببتيدات الرابطة لـC5. وأحد أمثلة تلك البولي ببتيدات هو نطاق ربط الألبومين albumin binding domain (ABD) الذي يظهر على أنه المتوالية برقم هوية: ٢٥٠ في الطلب الحالي. ويتم الكشف عن أمثلة أخرى لنطاقات ربط ألبومين albumin binding domains مناسبة في الطلب الدولي ٠١٦٠٤٣/٢٠٠٩ و الطلب الدولي ٠٠٤٣٨٤/٢٠١٢. يرتبط بولي ببتيد ممتد extended polypeptide نطاق ربط الألبومين بألبومين مصل serum albumin داخل جسم الكائن الحي، ويستفيد من عمر نصفه الأطول، الذي يزيد عن صافي عمر نصف البولي ببتيد ذاته (راجع على سبيل المثال الطلب الدولي ٠١٧٤٣/٩١).

ولا يزال التوفير المستمر لعوامل ذات نشاط عائق لC5 متشابه مسألة تثير الاهتمام في المجال. وبصفة خاصة، هناك حاجة مستمرة لجزيئات تمنع تتابع المكمل الطرفي وكذلك تكوين الجزيء المساعد على الالتهاب C5a pro-inflammatory molecule. ومن الأهمية بمكان توفير استخدامات لتلك الجزيئات في علاج المرض.

## الوصف العام للاختراع

لقد كان من المثير إثبات أن البولي ببتيدات والمركبات الرابطة لـC5، حيث تم تعديل متواليات الحمض الأميني في مواضع معينة، كانت ذات ثبات محسن مقارنة ببولي ببتيدات ومركبات ربط C5 المعروفة.

بالتالي، يوفر الاختراع الحالي بولي ببتيد قادر على ربط مكون مكمل بشري ٥، حيث يتم اختيار البولي ببتيد المذكور من:

(أ) بولي ببتيد يشتمل على متوالية الحمض الأميني

$[BM]-[L2]-QSX_{42}X_{43}LLX_{46}EAKKLX_{52}X_{53}X_{54}Q$

حيث، كل منها مستقل عن الآخر،

[ حافز ربط ]عبارة عن حافز ربط C5؛

[L2] يتم اختيارها من دى دى بى أس DDPS و آر كيو بى إى RQPE ؛

$X_{42}$ يتم اختيارها من A و S ؛

$X_{43}$ يتم اختيارها من N و E ؛

$X_{46}$ يتم اختيارها من A ، S و C ؛

$X_{52}$ يتم اختيارها من E ، N و S ؛

$X_{53}$ يتم اختيارها من D ، E و S ، بشرط أن $X_{53}$ لا تكون D عندما $X_{52}$ عبارة عن N؛ و

$X_{54}$ يتم اختيارها من A و S ؛ و

(ب) بولي ببتيد به على الأقل ٨٩٪ تشابه لمتوالية الحمض الأميني مع البولي ببتيد الخاص بـ (أ)، بشرط أن $X_{53}$ لا تكون D عندما تكون $X_{52}$ عبارة عن N.

ومن المدهش أن اكتشف المخترعون أن تعديل أو استبدال الوحدة (الوحدات) البنائية للحمض الأميني في موضع (مواضع) معينة في متوالية الحمض الأميني لبولي ببتيدات ربط C5 كما تم وصفه في الطلب الدولي ١٢٦٠٠٦/٢٠١٣ يحسن من ثبات بولي ببتيدات ربط C5 بينما يتم بشكل أساسي الاحتفاظ بالنشاط الحيوي، مثل ألفة الارتباط لمكون المكمل البشري ٥ (C5) وتثبيط وظيفة مسار المكمل. لذلك، يكون النشاط الحيوي لبولي ببتيدات ربط C5 المعدلة مشابهاً للنشاط الحيوي لبولي ببتيدات ربط C5 المعروفة. وتوضح اختبارات ثبات بولي ببتيدات ربط C5 الخاصة بالاختراع الحالي أن الاستبدال إما في $X_{52}$ من N إلى E أو S، أو $X_{53}$، من D إلى E أو S، يحسن من الثبات. بل وقد وجد أن استبدال معين للحمض الأميني في [L2] قد يعزز الثبات بشكل مستقل.

يشير المصطلحات "ربط C5" و"ألفة الربط لـC5" كما يتم استخدامهما في الوثيقة الحالية إلى خاصة بولي ببتيد polypeptide يمكن اختبارها على سبيل المثال عن طريق استخدام تقنية الرنين البلازموني السطحي surface plasmon resonance، مثلاً في جهاز Biacore (GE Healthcare). ويمكن، على سبيل المثال، اختبار ألفة ربط C5 في تجربة حيث يتم نقل C5 على شريحة مستشعر sensor chip لجهاز Biacore، ويتم إمرار العينة المحتوية على البولي ببتيد المراد اختبارها فوق الشريحة. على نحو بديل، يتم نقل البولي ببتيد المراد اختباره على شريحة مستشعر الجهاز، ويتم إمرار عينة تحتوي على C5، أو جزء منها، فوق الشريحة. ثم قد يفسر الشخص صاحب المهارة في المجال النتائج التي يتم التوصل إليه من تلك التجارب لإنشاء مقياس نوعي على الأقل لارتباط البولي ببتيد بـC5. إذا كان المطلوب قياس كمي، على سبيل المثال لتحديد ثابت انفصال $K_D$ dissociation constant الاتزان الظاهري للتفاعل، يمكن أيضاً استخدام طرق الرنين البلازموني السطحي. ويمكن تحديد قيم الارتباط على سبيل المثال في جهاز Biacore (GE Healthcare) 2000. ويتم نقل C5 على شريحة مستشعر القياس sensor chip of measurement، ويتم تحضير عينات البولي ببتيد المراد معرفة ألفتها بتخفيف متسلسل serial dilution وحقنها فوق الشريحة. ثم يمكن حساب قيم $K_D$ من النتائج باستخدام على سبيل المثال

نموذج ارتباط Langmuir ١: ١ لبرنامج تقييم بي آى ايه BIA الذي يوفره مصنع الأجهزة. وقد يشتمل C5 أو جزء منه مستخدم في تحديد $K_D$ على سبيل المثال على متوالية الحمض الأميني التي تمثلها المتوالية برقم هوية: ٢٥١. وتحتوي الوثيقة الحالية على أمثلة عن كيفية اختبار ألفة ربط C5، راجع المثال ٣ و٥.

في إحدى الصور المفضلة للاختراع، البولي ببتيد المذكور يتم اختياره من:

(أ) بولي ببتيد يشتمل على متوالية الحمض الأميني

$$AEAKYAK-[BM]-[L2]-QSX_{42}X_{43}LLX_{46}EAKKLX_{52}X_{53}X_{54}QAP$$

حيث، كل منها مستقل عن الآخر،

[حافز ربط ]،[L2] ،$X_{42}$ ،$X_{43}$ ،$X_{46}$ ،$X_{52}$ ، $X_{53}$ و $X_{54}$ هي كما تم تعريفها أعلاه؛ و

(ب) بولي ببتيد به على الأقل ٩٠٪ تشابه لمتوالية الحمض الأميني مع البولي ببتيد الخاص بـ (أ)، بشرط أن $X_{53}$لا تكون D عندما $X_{52}$ عبارة عن N.

كما سبق الكشف عنه في الطلب الدولي ١٢٦٠٠٦/٢٠١٣، فإن بولي ببتيد ربط C5 الخاص بالاختراع قد يشكل جزءاً من نطاق بروتين protein domain حزمة ثلاثية الحلزون three-helix bundle. وقد يشكل حافز ربط C5 المذكور بشكل أساسي جزءاً من حلزوني الفا alpha helices، مع حلقة رابطة interconnecting loop، داخل الحزمة ثلاثية الحلزون المذكورة. تصل حلقة موصلة interconnecting loop ثانية، يُشار إليها على أنها [L2]، حافز ربط C5 بحلزون ألفا alpha helix الثالث، المشار إليه على أنه "السلسلة الرئيسية ".

وفي أحد النماذج، يكون محفز ربط C5 بشكل أساسي كما تم وصفه في الطلب الدولي ١٢٦٠٠٦/٢٠١٣. ومع ذلك، طبقاً للاختراع الحالي من المفضل أن يتكون محفز ربط C5 من ٢٨، وليس ٢٩، حمضا أمينياً amino acids، وقد حمل إضافة إلى ذلك استبدالات حمض أميني.

لذلك، في أحد النماذج يحمل حافز ربط المذكور استبدال حمض أميني آخر واحد على الأقل، في الموضع ١٧، مقارنة بحافز ربط كما تم الكشف عنه في الطلب الدولي ١٢٦٠٠٦/٢٠١٣. لذلك، يكون حافز ربط المذكورة عبارة عن بولي ببتيد يتم اختياره من:

(أ) بولي ببتيد يشتمل على متوالية الحمض الأميني

$EX_9X_{10}X_{11}A\ \ X_{13}X_{14}EIDX_{17}X_{18}LPNLX_{23}X_{24}X_{25}QWX_{28}AFIX_{32}X_{33}LX_{35}$؛

حيث، كل منها مستقل عن الآخر،

$X_9$ يتم اختيارها من H، Q، S، T و V ؛

$X_{10}$ يتم اختيارها من I، L، M و V ؛

$X_{11}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، K، L، N، Q، R، S، T و Y ؛

$X_{13}$ يتم اختيارها من N و W ؛

$X_{14}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، N، Q، R، S و T ؛

$X_{17}$ يتم اختيارها من D و E ؛

$X_{18}$ يتم اختيارها من A، E، G، H، K، L، Q، R، S، T و Y ؛

$X_{23}$ يتم اختيارها من N و T ؛

$X_{24}$ يتم اختيارها من I، L و V ؛

$X_{25}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، K، N، Q، R، S و T ؛

$X_{28}$ يتم اختيارها من I، L و V ؛

$X_{32}$ يتم اختيارها من A، D، E، G، H، N، S و T ؛

$X_{33}$ يتم اختيارها من K و S ؛

$X_{35}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، N، Q، S، T و Y ؛ و

(ب) بولي ببتيد به على الأقل ٨٥٪ تشابه لمتوالية الحمض الأميني مع البولي ببتيد الخاص بـ (أ).

في نموذج مفضل، يكون حافز ربط C5 بشكل أساسي هو كما تم وصفه في ٢٠١٣/١٢٦٠٠٦. بالتالي يكون حافز ربط المذكور عبارة عن بولي ببتيد يتم اختياره من:

(أ) بولي ببتيد يشتمل على متوالية الحمض الأميني

$EX_9X_{10}X_{11}A\ \ X_{13}X_{14}EIDX_{18}LPNLX_{23}X_{24}X_{25}QWX_{28}AFIX_{32}X_{33}LX_{35}$؛

حيث، كل منها مستقل عن الآخر،

$X_9$ يتم اختيارها من H، Q، S، T و V ؛

$X_{10}$ يتم اختيارها من I، L، M و V ؛

$X_{11}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، K، L، N، Q، R، S، T و Y ؛

$X_{13}$ يتم اختيارها من N و W ؛

$X_{14}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، N، Q، R، S و T ؛

$X_{18}$ يتم اختيارها من A، E، G، H، K، L، Q، R، S، T و Y ؛

$X_{23}$ يتم اختيارها من N و T ؛

$X_{24}$ يتم اختيارها من I، L و V ؛

$X_{25}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، K، N، Q، R، S و T ؛

$X_{28}$ يتم اختيارها من I، L و V ؛

$X_{32}$ يتم اختيارها من D، E، G، H، N، S و T ؛

$X_{33}$ يتم اختيارها من K و S ؛

$X_{35}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، N، Q، S ، T و Y ؛ و

(ب) بولي ببتيد به على الأقل ٨٥٪ تشابه لمتوالية الحمض الأميني مع البولي ببتيد الخاص بـ (أ).

في سمة أخرى مفضلة، يشتمل حافز ربط على أو يتكون من متوالية حمض أميني يتم اختيارها من المجموعة المكونة من المواضع ١-٢٨ في المتواليات بأرقام هوية: ١- ٢٤٨. والأفضل، أن يشتمل حافز ربط على أو يتكون من متوالية الحمض الأميني التي تظهر في صورة المواضع ١-٢٨ في المتوالية برقم هوية: ١.

في سمة أخرى، بولي ببتيد ربطC5 طبقاً للاختراع يتم اختياره من:

(أ) بولي ببتيد يشتمل على متوالية الحمض الأميني

$$AEAKYAKEX_9X_{10}X_{11}AX_{13}X_{14}EIX_{17}X_{18}LPNLX_{23}X_{24}X_{25}QWX_{28}AFIX_{32}$$

$$X_{33}LX_{35}\text{-[L2]-}QSX_{42}X_{43}LLX_{46}EAKKLX_{52}X_{53}X_{54}QAP;$$

حيث، كل منها مستقل عن الآخر،

$X_9$ يتم اختيارها من H، Q، S ، T و V ؛

$X_{10}$ يتم اختيارها من I، L ، M و V ؛

$X_{11}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، K، L، N، Q، R، S ، T و Y ؛

$X_{13}$ يتم اختيارها من N و W ؛

$X_{14}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، N، Q، R ، S و T ؛

$X_{17}$ يتم اختيارها من D و E ؛

$X_{18}$ يتم اختيارها من A، E، G، H، K، L، Q، R، S ، T و Y ؛

$X_{23}$ يتم اختيارها من N و T ؛

$X_{24}$ يتم اختيارها من I ، L و V ؛

$X_{25}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، K، N، Q، R ، S و T ؛

$X_{28}$ يتم اختيارها من I ، L و V ؛

$X_{32}$ يتم اختيارها من A، D، E، G، H، N ، S و T ؛

$X_{33}$ يتم اختيارها من K و S ؛

$X_{35}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، N، Q، S ، T و Y ؛

[L2] يتم اختيارها من DDPS وRQPE ؛

$X_{42}$ يتم اختيارها من A و S ؛

$X_{43}$ يتم اختيارها من N و E ؛

$X_{46}$ يتم اختيارها من A ، S و C ؛

$X_{52}$ يتم اختيارها من E ، N و S ؛

$X_{53}$ يتم اختيارها من D ، E و S ، بشرط أن $X_{53}$ لا تكون D عندما تكون $X_{52}$ عبارة عن N؛ و

$X_{54}$ يتم اختيارها من A و S ؛ و

(ب) بولي ببتيد به على الأقل ٩٠٪ تشابه لمتوالية الحمض الأميني مع البولي ببتيد الخاص بـ (أ)، بشرط أن $X_{53}$ لا تكون D عندما $X_{52}$ عبارة عن N.

في نموذج مفضل، بولي ببتيد ربط C5 طبقاً للاختراع يتم اختياره من:

(أ) بولي ببتيد يشتمل على متوالية الحمض الأميني

AEAKYAKEX$_9$X$_{10}$X$_{11}$AX$_{13}$X$_{14}$EIDX$_{18}$LPNLX$_{23}$X$_{24}$X$_{25}$QWX$_{28}$AFIX$_{32}$X$_{33}$LX$_{35}$-[L2]-QSX$_{42}$X$_{43}$LLX$_{46}$EAKKLX$_{52}$X$_{53}$X$_{54}$QAP؛

حيث، كل منها مستقل عن الآخر،

X$_9$ يتم اختيارها من H، Q، S ، T و V ؛

X$_{10}$ يتم اختيارها من I، L ، M و V ؛

X$_{11}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، K، L، N، Q، R، S ، T و Y ؛

X$_{13}$ يتم اختيارها من N و W ؛

X$_{14}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، N، Q، R ، S و T ؛

X$_{18}$ يتم اختيارها من A، E، G، H، K، L، Q، R، S ، T و Y ؛

X$_{23}$ يتم اختيارها من N و T ؛

X$_{24}$ يتم اختيارها من I ، L و V ؛

X$_{25}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، K، N، Q، R ، S و T ؛

X$_{28}$ يتم اختيارها من I ، L و V ؛

X$_{32}$ يتم اختيارها من D، E، G، H، N ، S و T ؛

X$_{33}$ يتم اختيارها من K و S ؛

X$_{35}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، N، Q، S، T و Y؛

[L2] يتم اختيارها من DDPS وRQPE؛

X$_{42}$ يتم اختيارها من A و S؛

X$_{43}$ يتم اختيارها من N و E؛

$X_{46}$ يتم اختيارها من A، S و C؛

$X_{52}$ يتم اختيارها من E، N و S؛

$X_{53}$ يتم اختيارها منD، E و S، بشرط أن $X_{53}$ لا تكون D عندما $X_{52}$ عبارة عن N؛ و

$X_{54}$ يتم اختيارها من A و S؛ و

(ب) بولي ببتيد به على الأقل ٩٠٪ تشابه لمتوالية الحمض الأميني مع البولي ببتيد الخاص بـ (أ)، بشرط أن $X_{53}$ لا تكون D عندما $X_{52}$ عبارة عن N.

في صور مفضلة للاختراع، يتم تحقيق واحدة على الأقل من الحالات التالية، اختيارياً تسعة عشرة حالة عبارة عن:

$X_9$ عبارة عن V،

$X_{10}$ عبارة عن L،

$X_{11}$ عبارة عن E،

$X_{13}$ عبارة عن W،

$X_{14}$ عبارة عن D،

اختيارياً$X_{17}$ عبارة عن D،

$X_{18}$ عبارة عن R،

$X_{23}$ عبارة عن T،

$X_{24}$ عبارة عن I،

$X_{25}$ عبارة عن E،

$X_{28}$ عبارة عن L،

$X_{32}$ عبارة عن N،

$X_{33}$ عبارة عن K،

$X_{35}$ عبارة عن D،

[L2] عبارة عن DDPS،

$X_{42}$ عبارة عن S،

$X_{43}$ عبارة عن E،

$X_{46}$ عبارة عن S،

$X_{54}$ عبارة عن S.

والأفضل، تحقيق اثنين على الأقل، ثلاثة، أربعة، خمسة، ستة، سبعة، ثمانية، تسعة، عشرة، الحادية عشرة، اثني عشر، ثلاثة عشر، أربعة عشر، خمسة عشر، ستة عشر، سبعة عشر، ثمانية عشر أو تسعة عشر من الشروط أعلاه.

في أحد النماذج، $X_{52}$ و$X_{53}$ يتم اختيارهما بشكل مستقل من E و S . من المفضل، (أ) أن تكون $X_{52}$ عبارة عن S و$X_{53}$ عبارة عن E، أو (ب) أن تكون $X_{52}$ عبارة عن E و$X_{53}$ عبارة عن S.

في أحد النماذج، X52 عبارة عن S و X53 عبارة عن D.

في نموذج آخر، X52 عبارة عن N و X53 عبارة عن E.

في سمة أخرى، يشتمل البولي ببتيد طبقاً للاختراع على متوالية الحمض الأميني التي تظهر في صورة المتوالية برقم هوية: ٢٦٠، المتوالية برقم هوية: ٢٦٥، المتوالية برقم هوية: ٢٦٦، أو المتوالية برقم هوية: ٢٦٧.

في سمة أخرى، يتم توفير مركب قادر على ربط C5، حيث يشتمل المركب المذكور على:

أ- بولي ببتيد رابط لـ C5 واحد على الأقل كما سبق تعريفه؛

ب- نطاق ربط ألبومين واحد على الأقل للبروتين العقدي G streptococcal protein، أو أحد مشتقاته؛ و

ج- اختيارياً، شق رابط linking moiety واحد على الأقل لربط المذكور نطاق ربط ألبومين واحد على الأقل أو أحد مشتقاته بالطرف C أو N لبولي ببتيد ربط C5 المذكور واحد على الأقل.

من المفضل، أن يشتمل نطاق ربط ألبومين المذكور على متوالية الحمض الأميني التي تظهر في صورة المتوالية برقم هوية: ٢٥٠.

من المفضل، أن يكون الشق الرابط المذكور عبارة عن ببتيد يشتمل على متوالية الحمض الأميني $KVX_{60}GS$، حيث $X_{60}$ يتم اختيارها من D، E و A. عندما تكون $X_{60}$ عبارة عن D، يفضل أن يشتمل المركب على أو يتكون من متوالية الحمض الأميني التي تظهر في صورة المتوالية برقم هوية: ٢٥٣. عندما تكون $X_{60}$ عبارة عن E، فإن المركبات المفضلة تشتمل على أو تتكون من متوالية الحمض الأميني التي تظهر في صورة المتوالية برقم هوية: ٢٦١، المتوالية برقم هوية: ٢٦٣، المتوالية برقم هوية: ٢٦٤، المتوالية برقم هوية: ٢٦٩ أو المتوالية برقم هوية: ٢٧٠. عندما تكون $X_{60}$ عبارة عن E، فإن المركب المفضل يشتمل على أو يتكون من متوالية الحمض الأميني التي تظهر في صورة المتوالية برقم هوية: ٢٦٢. في متواليات الحمض الأميني سالفة الذكر لمركب ربط C5s، تمثل الوحدات البنائية للحمض الأميني ١-٥٧ متوالية الحمض الأميني لبولي ببتيد ربط C5، تمثل الوحدات البنائية ٥٨-٦٢ متوالية الحمض الأميني للرابط linker، و الوحدات البنائية ٦٣-١٠٨ تمثل متوالية الحمض الأميني لنطاق ربط الألبومين.

في أحد النماذج، الشق الرابط يكون غير موجود.

كما سبق الإشارة إليه، تتضمن بولي ببتيدات ربط C5 المفضلة طبقاً للاختراع بولي ببتيدات حيث يتم اختيار $X_{52}$ و$X_{53}$ بشكل مستقل من E و S . تحديداً، يمكن اشتقاق مركبات الاختراع من PSI0242 (المتوالية برقم هوية ٢٤٩) ولكنها ذات تعديلات في واحد على الأقل من المواضع ٥٢، ٥٣، و٦٠. على سبيل المثال، كما في الجدول I، وقائمة المتواليات، يحمل المركب المفضل المسمى PSI0378 (المتوالية برقم هوية: ٢٦١) استبدالات الحمض الأميني N52S، وD53E ، وD60E ؛ ويحمل المركب المفضل المسمى PSI0379 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٢) استبدالات

الحمض الأميني N52S، وD53E ، وD60A ؛ ويحمل المركب المفضل المسمى PSI0381(المتوالية برقم هوية: ٢٦٣) استبدالات الحمض الأميني N52S، وD53S ، وD60E ؛ ويحمل المركب المفضل المسمى PSI0383 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٤) استبدالات الحمض الأميني N52S، وD53E ، وD60E . علاوة على ذلك، تحمل المتوالية برقم هوية: ٢٦٤ أيضاً استبدالات في الحلقة [L2]، وهي D36R، وD37Q ، وS39E . فضلاً عن ذلك، يحمل المركب المفضل المسمى PSI0403 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٩) استبدالات الحمض الأميني D53E، و D60، ويحمل المركب المفضل المسمى PSI0404 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٠) استبدالات الحمض الأميني N52S، وD60E .

كما سبق الإشارة إليه، فإن المخترعين قد اكتشفوا على نحو مدهش أن استبدالات الحمض الأميني في مواضع معينة من متوالية الحمض الأميني لبولي ببتيدات ربط C5 كما تم وصفه في الطلب الدولي ١٢٦٠٠٦/٢٠١٣ قد تحسن من الثبات. وهذه الاستبدالات تحسن ثبات مركبات ربط C5 مع الاحتفاظ بالنشاط الحيوية، مثل قدرة ربط C5 وتثبيط انحلال الدم معملياً.

وتوضح اختبارات الثبات لمركبات ربط C5 الخاصة بالاختراع الحالي أنه على سبيل المثال كل من N52S ($X_{52}$) وD53E ($X_{53}$) (المتوالية برقم هوية : ٢٥٣) على حده، وكذلك إزالة D60 ($X_{60}$) (المتوالية برقم هوية: ٢٥٩ التي تفتقد إلى شق الربط) يحسن من الثبات. كما تحسن توليفة من الاستبدالات N52S، وD53E ، أو D60A من الثبات (المتوالية برقم هوية: ٢٦١ والمتوالية برقم هوية ٢٦٢). وكل من الاستبدالات المدمجة لـN52 وD60E (المتوالية برقم هوية: ٢٧٠) و D53E وD60E (المتوالية برقم هوية:٢٦٩) بالمثل ثبت أنها تحسن من الثبات. ويدل هذا على أن كل من استبدالات الحمض الأميني المذكورة يدخل في تحسين ثبات البولي ببتيد، ومن ثم فإن كل من هذه الاستبدالات سوف يوفر بولي ببتيدات ومركبات C5 أكثر ثباتاً مقارنة ببولي بتيدات ومركبات C5 التي سبق معرفتها.

ومع ذلك، سوف يكون بمقدور الشخص صاحب المهارة في المجال تحديد البولي ببتيدات و/ أو المركبات ذات التعديلات في واحد على الأقل من المواضع ٥٢، ٥٣، و٦٠، و/ أو في الحلقة [L2]، ولكنها تحمل أيضاً تعديلات أخرى مثل استبدالات، أو حذوفات صغيرة، أو إدخالات أو إقلابات، ومع ذلك تتمع إلى حد كبير بالأنشطة الحيوية التي تم الكشف عنها والثبات المحسن.

علاوة على ذلك، فقد تشتمل بولي ببتيدات و/ أو مركبات ربط C5 الخاصة بالاختراع كذلك على أحماض أمينية طرفية C و/ أو طرفية N تحسن إنتاج، أو تنقية، أو الثبات المعملي أو داخل جسم الكائن الحي، أو اقتران، أو حذف البولي ببتيد.

وفي سمة أخرى للاختراع، يتم توفير مركب قادر على ربط C5، حيث يشتمل المركب المذكور على:

أ. بولي ببتيد رابط لـ C5 واحد على الأقل، حيث يتم اختيار البولي ببتيد المذكور من:

أ-١. بولي ببتيد يشتمل على متوالية الحمض الأميني

$[BM]-[L2]-QSX_{42}X_{43}LLX_{46}EAKKLX_{52}X_{53}X_{54}Q$

حيث، كل منها مستقل عن الآخر،

[حافز ربط]عبارة عن حافز ربطC5 ؛

[L2] يتم اختيارها من DDPS وRQPE ؛

$X_{42}$ يتم اختيارها من A وS ؛

$X_{43}$ يتم اختيارها من N وE ؛

$X_{46}$ يتم اختيارها منA ، S وC ؛

$X_{52}$ يتم اختيارها منE ، N وS ؛

$X_{53}$ يتم اختيارها من D ، E وS ؛

$X_{54}$ يتم اختيارها من A وS ؛ و

أ-٢. بولي ببتيد به على الأقل ٨٩٪ تشابه لمتوالية الحمض الأميني مع البولي ببتيد الخاص بـ أ-١.؛

ب. نطاق ربط ألبومين واحد على الأقل للبروتين العقدي G streptococcal protein، أو أحد مشتقاته؛ و

ج. شق رابط واحد على الأقل لربط المذكور نطاق ربط ألبومين واحد على الأقل أو أحد مشتقاته بالطرف C أو N لبولي ببتيد ربط C5 المذكور واحد على الأقل؛ حيث الشق الرابط يشتمل على أو يتكون من KVEGS أوKVAGS؛ أو حيث الشق الرابط المذكور يكون غير موجود.

لقد ثبت أن إزلة D60 أو استبدال حمض أميني في الموضع ٦٠ للمتوالية برقم هوية: ٢٤٩ بمفرده يحسن من ثبات مركبات ربط C5 الخاصة بالاختراع مقارنة بمركبات ربط C5 المعروفة من قبل. ومن المفضل، أن يكون شق الربط هو KVEGS ($X_{60}$=E) بينما قد يكون C5 غير محدد، ومن أمثلة المركباتا لمفضلة الحاملة لذلك الشق الرابط PSI0410 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٨). وفي نموذ مفضل آخر، لا يوجد D60 وكل الشق الرابط ومن أمثلة ذلك المركب هو المركب المفضل المسمى PSI0369 (متوالية برقم هوية: ٢٥٩).

في نماذج السمة السابقة، [ حافز ربط ] و نطاق ربط الألبومين هي كما تم تعريفها أعلاه في السمات ذات الصلة. من المفضل، أن تكون [L2] عبارة عن DDPS.

في سمة أخرى، يتم توفير مركب قادر على ربط C5، حيث يشتمل المركب المذكور على:

أ. بولي ببتيد رابط لC5 واحد على الأقل، حيث يتم اختيار البولي ببتيد المذكور من:

أ-١. بولي ببتيد يشتمل على متوالية الحمض الأميني

[*BM*]-[L2]-QS$X_{42}X_{43}$LL$X_{46}$EAKKL$X_{52}X_{53}X_{54}$Q

حيث، كل منها مستقل عن الآخر،

]حافز ربط [عبارة عن حافز ربط C5 ؛

[L2] عبارة عن RQPE؛

$X_{42}$ يتم اختيارها من A و S ؛

$X_{43}$ يتم اختيارها من N و E ؛

$X_{46}$ يتم اختيارها من A ، S و C ؛

$X_{52}$ يتم اختيارها من E ، N و S ؛

$X_{53}$ يتم اختيارها من D ، E و S ؛

$X_{54}$ يتم اختيارها من A و S ؛ و

أ-٢. بولي ببتيد به على الأقل ٨٩٪ تشابه لمتوالية الحمض الأميني مع البولي ببتيد الخاص بـ أ-١.؛

ب. نطاق ربط ألبومين واحد على الأقل للبروتين العقدي G، أو أحد مشتقاته؛ و

ج. اختيارياً، شق رابط واحد على الأقل لربط نطاق ربط الألبومين الواحد على الأقل المذكور أو أحد مشتقاته بالطرف C أو N لبولي ببتيد ربط C5 المذكور واحد على الأقل.

ولقد ثبت أن استبدالات معينة للحمض الأميني في الحلقة [L2] لتحسين ثبات مركب ربط C5s (مثلاً المتوالية برقم هوية: ٢٥٢) للاختراع مقارنة بمركبات ربط C5 المعروفة من قبل. في نماذج السمة السابقة، يكون [ حافز ربط ] المذكور ونطاق ربط ألبومين كلاً على حده كما سبق تعريفهما في السمات ذات الصلة. من المفضل، أن يكون الشق الرابط المذكور عبارة عن ببتيد يشتمل على متوالية الحمض الأميني $KVX_{60}GS$، حيث $X_{60}$ يتم اختيارها من D ، E و A .

**<u>شرح مختصر للرسومات</u>**

الشكل ١ يبين هلام إس دي إس- بي ايه جي إي SDS-PAGE حيث تمثل النطاقات مركب ربط C5 PSI0242 binding compound (المتوالية برقم هوية: ٢٤٩) (صفر) قبل اختبار الثبات stability test؛ و (أسبوعين) بعد أسبوعين اختبار الثبات.

الشكل ١ يبين هلام SDS-PAGE حيث تمثل النطاقات مركب ربط C5 PSI0242 (المتوالية برقم هوية: ٢٤٩) (صفر) قبل اختبار الثبات؛ و (أسبوعين) بعد أسبوعين اختبار الثبات.

الشكل ٢عبارة عن مخطط استشرابي من استشراب سائل عالي الأداءLiquid Chromatography High Performance (HPLC) للطور العكسي لـ PSI0242(المتوالية برقم هوية: ٢٤٩) قبل اختبار الثبات (الخط المصمت) و بعد أسبوعين اختبار الثبات (الخط المنقط dotted line) .

الشكل ٣ يبين هلام SDS-PAGE حيث تحتوي الحارة الأولى على مرقم حجم size marker P2SeeBlue و تمثل النطاقات (صفر) العينات الأولية؛ و (أسبوعين) العينات بعد أسبوعين اختبار الثبات .الشكل ٣أ: المتوالية برقم هوية: ٢٤٩؛ الشكل ٣ب: المتوالية برقم هوية: ٢٦١؛ الشكل ٣ج: المتوالية برقم هوية: ٢٦٢؛ الشكل ٣د: المتوالية برقم هوية: ٢٦٤.

الشكل ٤عبارة عن مخطط استشرابي من استشراب سائل عالي الأداء للطور العكسي لمركب ربط C5 (المتوالية برقم هوية: ٢٥٣) قبل اختبار الثبات (الخط المصمت) و بعد أسبوعين اختبار الثبات (الخط المنقط).

الشكل ٥عبارة عن مخطط استشرابي من استشراب سائل عالي الأداء للطور العكسي لمركب ربط C5 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٤) قبل اختبار الثبات (الخط المصمت) و بعد أسبوعين اختبار الثبات (الخط المنقط).

الأشكال ٦أ- د توضح صور هلام SDS-PAGE المشتملة على أنواع البولي ببتيد الأصلية والمعدلة (صفر) قبل و (أسبوعين) بعد أسبوعين من اختبار الثبات . وكان مرقم الوزن الجزيئي molecular size marker (Mw) هو معيار البروتين سابق التلطيخ الحاد Sharp Pre-stained Novex® Protein Standard(٢١٦، ١٦٠، ١١٠، ٨٠، ٦٠، ٥٠، ٤٠، ٣٠، ٢٠، ١٥، ١٠، ٥.٣ كيلو دالتون). الشكل ٦أ يوضح هلام بولي ببتيدات ربط عامل نمو البشرة البشري ٢ حيث توضح الحارات الحارة ١: وزن جزيئي، الحارة ٢: (صفر) Z02891 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٢)، الحارة ٣: (أسبوعين) Z02891 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٢)، الحارة ٤ : وزن جزيئي، الحارة ٥: (صفر)Z17341 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٣)، الحارة ٦: (أسبوعين) Z17341 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٣)، الحارة ٧: (صفر) Z17342 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٤)، الحارة ٨: (أسبوعين) Z17342(المتوالية برقم هوية: ٢٧٤). الشكل ٦ب عبارة عن هلام بولي ببتيدات ربط عامل النمو المستمد من الصفيحات بيتا β حيث توضح الحارات: الحارة ١ : وزن جزيئي، الحارة ٢:

(صفر) Z15805 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٥)، الحارة ٣: (أسبوعين) Z15805 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٥)، الحارة ٤ :وزن جزيئي، الحارة ٥: (صفر) Z17343 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٦)، الحارة ٦: (أسبوعين) Z17343 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٦)، الحارة ٧: (صفر) Z17344 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٧)، الحارة ٨: (أسبوعين) Z17344 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٧)

٥ .الشكل ٦ج يوضح هلام بولي ببتيدات ربط مستقبل Fc لحديثي الولادة حيث توضح الحارات: الحارة ١: (صفر) Z10103 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٨)، الحارة ٢: (أسبوعين) Z10103 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٨)، الحارة ٣ :وزن جزيئي، الحارة ٤: (صفر) Z17347 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٩)، الحارة ٥: (أسبوعين) Z17347 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٩)، الحارة ٦: (صفر) Z17348(المتوالية برقم هوية: ٢٨٠)، الحارة ٧: (أسبوعين) Z17348(المتوالية برقم هوية:

١٠ ٢٨٠). وتعد النطاقات العمودية التي تظهر في الشكل ٦ج حقيقة ناجم عن بصمة من هلام ثان ملطخ في نفس الحاوية. .الشكل ٦د عبارة عن هلام بولي ببتيدات ربط الأنهيدراز الكربوني IX حيث توضح الحارات الحارة ١ :وزن جزيئي، الحارة ٢: (صفر) Z09782 (المتوالية برقم هوية: ٢٨١)، الحارة ٣: (أسبوعين) Z09782 (المتوالية برقم هوية: ٢٨١)، الحارة ٤ :وزن جزيئي، الحارة ٥: (صفر) Z17351 (المتوالية برقم هوية: ٢٨٢)، الحارة ٦: (أسبوعين) Z17351

١٥ (المتوالية برقم هوية: ٢٨٢)، الحارة ٧: (صفر) Z17352 (المتوالية برقم هوية: ٢٨٣)، الحارة ٨: (أسبوعين) Z17352(المتوالية برقم هوية: ٢٨٣)؛ الحارة ٩: (صفر) Z17355 (المتوالية برقم هوية: ٢٨٤)، الحارة ١٠: (أسبوعين) Z17355 (المتوالية برقم هوية: ٢٨٤)، الحارة ١١: (صفر) Z17357 (المتوالية برقم هوية: ٢٨٥)، الحارة ١٢: (أسبوعين) Z17357 (المتوالية برقم هوية: ٢٨٥)، الحارة ١٣: (صفر) Z17359 (المتوالية برقم هوية: ٢٨٦)، الحارة ١٤: (أسبوعين)

٢٠ Z17359 (المتوالية برقم هوية: ٢٨٦)، الحارة ١٥: (صفر) Z17360 (المتوالية برقم هوية: ٢٨٧)، الحارة ١٦: (أسبوعين) Z17360 (المتوالية برقم هوية: ٢٨٧) .

**<u>الوصف التفصيلي:</u>**

يتضمن الاختراع بولي نيوكليوتيدات polynucleotides تشفر بولي ببتيدات الاختراع. علاوة على ذلك يشمل الاختراع كذلك نواقل، مثل نواق التعبير، المشتملة على بولي نيوكليوتدات تشفر بولي

ببتيدات الاختراع. كما تندرج في الاختراع خلايا العائل host cells التي تشتمل على تلك النواقل vectors.

يتضمن الاختراع بولي نيوكليوتيدات تشفر بولي ببتيدات الاختراع. علاوة على ذلك يشمل الاختراع كذلك نواقل، مثل نواق التعبير، المشتملة على بولي نيوكليوتدات تشفر بولي ببتيدات الاختراع. كما تندرج في الاختراع خلايا العائل التي تشتمل على تلك النواقل.

يندرج في الاختراع بولي ببتيدات ومركبات ربط C5 السابق وصفها، لاستخدامها في العلاج. بصفة خاصة، يتم استخداام بولي ببتيد مركبات ربط C5 طبقاً للاختراع في طرق لعلاج و/ أو الوقاية من الحالات المتعلقة بـC5، مثل الأمراض الالتهابية inflammatory diseases؛ أمراض المناعة الذاتية autoimmune diseases؛ الأمراض المعدية infectious diseases؛ أمراض قلبية وعائية cardiovascular diseases؛ اضطرابات تنكسية عصبية neurodegenerative disorders؛ إصابة الطعم graft injury؛ أمراض العين eye diseases؛ أمراض الكلى kidney diseases؛ أمراض الرئة pulmonary diseases؛ أمراض الدم haematological diseases مثل بِيلَة هيمُوجلُوبينِيَّةَ لِيلِيَّة انْتِيابِيَّة؛ أمراض الحساسية allergic diseases و الأمراض الجلدية dermatological diseases.

في طرق علاج و/ أو الوقاية، من المفضل إعطاء بولي ببتيد أو مركب ربط C5 في الوريد intravenously، تحت الجلد subcutaneously، بالاستنشاق inhalation، عن طريق الأنف nasally، عن طريق الفم orally، داخل الجسم الزجاجي intravitreally، أو موضعياً.

الجدول I أدناه عبارة عن جدول يوضح متواليات الحمض الأميني لـ:

- أمثلة حافز ربط C5s (المتوالية برقم هوية: ١-٢٤٨)؛
- مركب ربط C5 باسم PSI0242 (المتوالية برقم: ٢٤٩)؛
- نطاق ربط ألبومين (المتوالية برقم هوية: ٢٥٠)؛
- Swiss-Prot entry P01031 لـ C5البشري (المتوالية برقم هوية: ٢٥١) حيث أن السلسلة-α تناظر وحدات بنائية للحمض الأميني amino acid residues ٦٧٨-١٦٧٦ و السلسلة-β تناظر وحدات بنائية للحمض الأميني ١٩-٦٧٣؛
- أمثلة المعدلة بولي ببتيدات ربط C5 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٠، ٢٦٥-٢٦٧).

- أمثلة المعدلة مركبات ربط C5 binding compounds (المتوالية برقم هوية: ٢٥٢-٢٥٩، ٢٦١-٢٦٤، ٢٦٨-٢٧٠).
- أمثلة صور بولي ببتيد بألفة ربط لجزيئات ربط target molecules أخرى (المتوالية برقم هوية: ٢٧٢، ٢٧٥، ٢٧٨، ٢٨١)

٥ أمثلة محسنة الثبات صور بولي ببتيد بألفة ربط لأهداف أخرى (المتوالية برقم هوية: ٢٧٣-٢٧٤، ٢٧٦-٢٧٧، ٢٧٩-٢٨٠، ٢٨٢-٢٨٧).

الجدول ١

| متوالية برقم هوية : | متوالية الحمض الأميني | البولي ببتيد |
|---|---|---|
| ١ | **EVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKLDD** | **CBM06175** |
| ٢ | **EVLEAWNEIDRLPNLTIEQWLAFINKLDD** | **CBM08044** |
| ٣ | **EVIEAWNEIDRLPNLTIEQWLAFINKLDD** | **CBM05998** |
| ٤ | **EVLEAWDEIDRLPNLTLDQWLAFINKLDD** | **CBM06009** |
| ٥ | **EVLDAWDEIDALPNLTLEQWLAFINKLDD** | **CBM06079** |
| ٦ | **EVIDAWDEIDRLPNLTLDQWLAFINKLDD** | **CBM06126** |
| ٧ | **ETLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKLDD** | **CBM06140** |
| ٨ | **EVIDAWNEIDALPNLTLDQWLAFINKLDD** | **CBM06189** |
| ٩ | **EVLDAWDEIDKLPNLTIDQWLAFINKLDD** | **CBM06214** |
| ١٠ | **EVLEAWDEIDHLPNLTLDQWLAFINKLDD** | **CBM06215** |
| ١١ | **EVLEAWDEIDALPNLTIEQWLAFINKLDD** | **CBM06226** |
| ١٢ | **EVLDAWDEIDKLPNLTLEQWLAFINKLDD** | **CBM06018** |
| ١٣ | **ETITAWDEIDKLPNLTIEQWLAFIGKLED** | **CBM05477** |
| ١٤ | **ESMKAWDEIDRLPNLNINQWVAFIDSLYD** | **CBM05363** |
| ١٥ | **ESIEAWTEIDHLPNLTIEQWLAFINKLTD** | **CBM05483** |
| ١٦ | **EVLDAWHEIDTLPNLTVRQWLAFISKLED** | **CBM05538** |
| ١٧ | **EHIQANEEIDRLPNLTIKQWLAFINKLHD** | **CBM05692** |
| ١٨ | **EVLHAWAEIDALPNLTIEQWLAFINKLDD** | **CBM05994** |
| ١٩ | **EVLAAWDEIDSLPNLTLQQWLAFINKLDD** | **CBM05995** |

| | | |
|---|---|---|
| CBM05996 | EVIDAWNEIDALPNLTLEQWLAFINKLDD | ٢٠ |
| CBM05997 | EVLDAWNEIDALPNLTIDQWLAFINKLSD | ٢١ |
| CBM05999 | EVIEAWDEIDGLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢٢ |
| CBM06000 | EVLEAWDEIDHLPNLTLQQWLAFINKLDD | ٢٣ |
| CBM06001 | EVIEAWNEIDALPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢٤ |
| CBM06002 | EVIAAWNEIDRLPNLTLTQWLAFINKLDD | ٢٥ |
| CBM06003 | EVIEAWDEIDALPNLTLQQWLAFINKLDD | ٢٦ |
| CBM06004 | EVIAAWDEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢٧ |
| CBM06005 | EVIAAWDEIDKLPNLTLQQWLAFINKLDD | ٢٨ |
| CBM06006 | ETIAAWDEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢٩ |
| CBM06007 | ETIEAWNEIDRLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٣٠ |
| CBM06008 | EVLEAWREIDALPNLTIQQWLAFINKLDD | ٣١ |
| CBM06010 | EVIEAWDEIDQLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٣٢ |
| CBM06011 | EVLRAWDEIDHLPNLTLEQWLAFINKLDD | ٣٣ |
| CBM06012 | EVLEAWDEIDRLPNLTLNQWLAFINKLDD | ٣٤ |
| CBM06013 | EVLDAWNEIDHLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٣٥ |
| CBM06014 | EVIDAWNEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٣٦ |
| CBM06015 | ETLEAWDEIDQLPNLTLQQWLAFINKLDD | ٣٧ |
| CBM06016 | EVIEAWNEIDALPNLTLDQWLAFINKLDD | ٣٨ |
| CBM06017 | EVIDAWNEIDRLPNLTLQQWLAFINKLDD | ٣٩ |
| CBM06019 | EVIDAWNEIDQLPNLTLEQWLAFINKLDD | ٤٠ |
| CBM06020 | ETIAAWDEIDHLPNLTLEQWLAFINKLDD | ٤١ |
| CBM06024 | EVLQAWDEIDHLPNLTIQQWLAFINKLSD | ٤٢ |
| CBM06025 | ETLHAWAEIDRLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٤٣ |
| CBM06026 | EVLEAWNEIDHLPNLTLAQWLAFINKLDD | ٤٤ |
| CBM06027 | EVIEAWDEIDKLPNLTIAQWLAFINKLDD | ٤٥ |
| CBM06028 | EVLDAWDEIDHLPNLTLQQWLAFINKLDD | ٤٦ |
| CBM06029 | ETIEAWNEIDKLPNLTLTQWLAFINKLDD | ٤٧ |
| CBM06030 | EVLEAWNEIDLLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٤٨ |
| CBM06031 | EVIEAWDEIDHLPNLTIDQWLAFINKLDD | ٤٩ |

| | | |
|---|---|---|
| CBM06032 | EVISAWNEIDALPNLTLQQWLAFINKLDD | ٥٠ |
| CBM06033 | EVIAAWNEIDKLPNLTLEQWLAFINKLDD | ٥١ |
| CBM06034 | ETIEAWNEIDSLPNLTLDQWLAFINKLDD | ٥٢ |
| CBM06035 | EVLDAWNEIDQLPNLTLQQWLAFINKLDD | ٥٣ |
| CBM06037 | EVLAAWNEIDHLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٥٤ |
| CBM06038 | EVLEAWDEIDHLPNLTITQWLAFINKLDD | ٥٥ |
| CBM06039 | ETIDAWNEIDHLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٥٦ |
| CBM06040 | EVIEAWNEIDHLPNLTIQQWLAFINKLDD | ٥٧ |
| CBM06041 | EVIQAWNEIDALPNLTISQWLAFINKLDD | ٥٨ |
| CBM06043 | EVIAAWDEIDSLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٥٩ |
| CBM06044 | EHIEAWNEIDALPNLTIEQWLAFINKLQD | ٦٠ |
| CBM06045 | EVLEAWNEIDKLPNLTLDQWLAFINKLDD | ٦١ |
| CBM06047 | EVIDAWNEIDHLPNLTIEQWLAFINKLAD | ٦٢ |
| CBM06048 | ETIDAWDEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٦٣ |
| CBM06049 | EVIAAWDEIDLLPNLTLQQWLAFINKLAD | ٦٤ |
| CBM06050 | EVIHAWDEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٦٥ |
| CBM06051 | EVIAAWNEIDHLPNLTLEQWLAFINKLDD | ٦٦ |
| CBM06052 | ETLDAWNEIDKLPNLTLSQWLAFINKLDD | ٦٧ |
| CBM06053 | EVLEAWNEIDALPNLTLEQWLAFINKLDD | ٦٨ |
| CBM06054 | EVIQAWDEIDHLPNLTISQWLAFINKLDD | ٦٩ |
| CBM06055 | EVLQAWDEIDSLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٧٠ |
| CBM06056 | ETLEAWDEIDHLPNLTIAQWLAFINKLDD | ٧١ |
| CBM06057 | ETIDAWNEIDRLPNLTISQWLAFINKLDD | ٧٢ |
| CBM06058 | EVLDAWHEIDHLPNLTIQQWLAFINKLDD | ٧٣ |
| CBM06059 | EQIRAWDEIDKLPNLTIEQWLAFINKLAD | ٧٤ |
| CBM06060 | ETLYAWNEIDKLPNLTIEQWLAFIEKLQD | ٧٥ |
| CBM06061 | EVIEAWNEIDALPNLTIDQWLAFINKLDD | ٧٦ |
| CBM06062 | EVLEAWNEIDHLPNLTIQQWLAFINKLDD | ٧٧ |
| CBM06063 | ETIEAWDEIDALPNLTIEQWLAFINKLDD | ٧٨ |
| CBM06065 | EVIEAWNEIDHLPNLTLQQWLAFINKLDD | ٧٩ |

| | | |
|---|---|---|
| CBM06066 | EVIEAWNEIDKLPNLTIQQWLAFINKLDD | ٨٠ |
| CBM06068 | ETLDAWAEIDHLPNLTLDQWLAFINKLDD | ٨١ |
| CBM06069 | EHIDAWNEIDALPNLTLSQWLAFINKLDD | ٨٢ |
| CBM06070 | EVLDAWNEIDKLPNLTIAQWLAFINKLDD | ٨٣ |
| CBM06071 | EVIEAWTEIDYLPNLTLQQWLAFINKLDD | ٨٤ |
| CBM06072 | ETIEAWNEIDHLPNLTIAQWLAFINKLDD | ٨٥ |
| CBM06073 | EVIQAWNEIDKLPNLTLEQWLAFINKLDD | ٨٦ |
| CBM06074 | EVIEAWDEIDHLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٨٧ |
| CBM06075 | ETIDAWNEIDLLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٨٨ |
| CBM06076 | EHIDAWNEIDKLPNLTLDQWLAFINKLDD | ٨٩ |
| CBM06077 | EVVAAWNEIDALPNLTIEQWLAFINKLND | ٩٠ |
| CBM06080 | EVIEAWNEIDALPNLTLAQWLAFINKLDD | ٩١ |
| CBM06081 | EVLQAWDEIDRLPNLTLDQWLAFINKLDD | ٩٢ |
| CBM06082 | EVIDAWDEIDHLPNLTIEQWLAFINKLSD | ٩٣ |
| CBM06083 | EVVEAWNEIDQLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٩٤ |
| CBM06084 | EVIQAWNEIDALPNLTIEQWLAFINKLDD | ٩٥ |
| CBM06085 | EVIQAWDEIDKLPNLTIDQWLAFINKLAD | ٩٦ |
| CBM06086 | EVVAAWDEIDALPNLTLTQWLAFINKLDD | ٩٧ |
| CBM06087 | EVIQAWNEIDGLPNLTLSQWLAFINKLDD | ٩٨ |
| CBM06088 | ETIEAWDEIDALPNLTITQWLAFINKLDD | ٩٩ |
| CBM06089 | EVIDAWNEIDHLPNLTIQQWLAFINKLAD | ١٠٠ |
| CBM06090 | ETIEAWNEIDALPNLTLDQWLAFINKLED | ١٠١ |
| CBM06091 | EHIHAWNEIDELPNLTIEQWLAFINKLAD | ١٠٢ |
| CBM06092 | EVIDAWDEIDHLPNLTIDQWLAFINKLSD | ١٠٣ |
| CBM06093 | EVIDANDEIDALPNLTIAQWLAFINKLHD | ١٠٤ |
| CBM06095 | ETIEAWDEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٠٥ |
| CBM06097 | EVLLAWDEIDHLPNLTLEQWLAFINKLDD | ١٠٦ |
| CBM06098 | EHIDAWNEIDGLPNLTLEQWLAFINKLDD | ١٠٧ |
| CBM06099 | EVIEAWSEIDALPNLTIDQWLAFINKLAD | ١٠٨ |
| CBM06100 | EQLNAWAEIDALPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٠٩ |

| | | |
|---|---|---|
| CBM06101 | EVIDAWNEIDALPNLTIAQWLAFINKLDD | ١١٠ |
| CBM06103 | ETIDAWNEIDQLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١١١ |
| CBM06104 | EVIEAWDEIDKLPNLTLAQWLAFINKLDD | ١١٢ |
| CBM06105 | EVLYAWAEIDHLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١١٣ |
| CBM06107 | EQIDAWNEIDRLPNLTIQQWLAFINKLDD | ١١٤ |
| CBM06108 | EVLAAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١١٥ |
| CBM06109 | EVIEAWDEIDHLPNLTLHQWLAFINKLDD | ١١٦ |
| CBM06110 | EVIEAWNEIDKLPNLTLQQWLAFINKLDD | ١١٧ |
| CBM06111 | EVIDANDEIDALPNLTIEQWLAFINKLHD | ١١٨ |
| CBM06112 | EVIAAWDEIDALPNLTIEQWLAFINKLDD | ١١٩ |
| CBM06113 | EVIEAWTEIDQLPNLTLDQWLAFINKLDD | ١٢٠ |
| CBM06114 | EVINAWNEIDALPNLTLQQWLAFINKLDD | ١٢١ |
| CBM06115 | EHIEAWDEIDHLPNLTIDQWLAFINKLAD | ١٢٢ |
| CBM06116 | EHLEAWREIDALPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٢٣ |
| CBM06117 | EVLDAWNEIDKLPNLTLQQWLAFINKLDD | ١٢٤ |
| CBM06118 | EVIAAWDEIDHLPNLTIQQWLAFINKLDD | ١٢٥ |
| CBM06119 | EVIQAWNEIDALPNLTLEQWLAFINKLDD | ١٢٦ |
| CBM06121 | EVIDAWNEIDHLPNLTIAQWLAFINKLDD | ١٢٧ |
| CBM06122 | EQLDAWDEIDHLPNLTIDQWLAFINKLSD | ١٢٨ |
| CBM06123 | EVLNAWDEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٢٩ |
| CBM06124 | EVLEAWNEIDHLPNLTIDQWLAFINKLDD | ١٣٠ |
| CBM06125 | EVLLAWDEIDRLPNLTIDQWLAFINKLAD | ١٣١ |
| CBM06127 | EVIAAWNEIDQLPNLTLDQWLAFINKLDD | ١٣٢ |
| CBM06128 | ETLLAWDEIDALPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٣٣ |
| CBM06129 | EVIDAWNEIDTLPNLTLEQWLAFINKLDD | ١٣٤ |
| CBM06131 | EVLHAWNEIDHLPNLTLNQWLAFINKLQD | ١٣٥ |
| CBM06132 | EVIQAWNEIDALPNLTIAQWLAFINKLDD | ١٣٦ |
| CBM06133 | ETVDAWNEIDALPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٣٧ |
| CBM06134 | EVIQAWDEIDHLPNLTIDQWLAFINKLDD | ١٣٨ |
| CBM06135 | EVLDAWNEIDQLPNLTIQQWLAFINKLDD | ١٣٩ |

| | | |
|---|---|---|
| CBM06136 | ETIEAWNEIDALPNLTLDQWLAFINKLDD | ١٤٠ |
| CBM06137 | EVIEAWDEIDALPNLTIDQWLAFINKLDD | ١٤١ |
| CBM06138 | EVIEAWNEIDQLPNLTIQQWLAFINKLDD | ١٤٢ |
| CBM06139 | EVIEAWTEIDHLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٤٣ |
| CBM06141 | EVIQAWNEIDHLPNLTLQQWLAFINKLED | ١٤٤ |
| CBM06142 | EVIQANNEIDQLPNLTIEQWLAFINKLHD | ١٤٥ |
| CBM06143 | EVLHAWSEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٤٦ |
| CBM06144 | ETIQAWDEIDKLPNLTLDQWLAFINKLSD | ١٤٧ |
| CBM06145 | ETLRAWDEIDKLPNLTIQQWLAFINKLAD | ١٤٨ |
| CBM06146 | EVIDAWNEIDHLPNLTIEQWLAFINKLED | ١٤٩ |
| CBM06147 | EVIDAWNEIDHLPNLTLQQWLAFINKLAD | ١٥٠ |
| CBM06148 | ETIDAWNEIDALPNLTLDQWLAFINKLDD | ١٥١ |
| CBM06149 | EVIEAWNEIDQLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٥٢ |
| CBM06150 | EVIRAWDEIDQLPNLTLSQWLAFINKLDD | ١٥٣ |
| CBM06151 | EVIEAWNEIDRLPNLTIHQWLAFINKLDD | ١٥٤ |
| CBM06152 | ETIEAWNEIDQLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٥٥ |
| CBM06153 | EVLTAWAEIDALPNLTLSQWLAFINKLDD | ١٥٦ |
| CBM06154 | EVIEAWDEIDKLPNLTVDQWLAFINKLDD | ١٥٧ |
| CBM06155 | EVIDAWNEIDHLPNLTLTQWLAFINKLDD | ١٥٨ |
| CBM06156 | EVIEAWNEIDQLPNLTLDQWLAFINKLDD | ١٥٩ |
| CBM06157 | ETLQAWDEIDHLPNLTLNQWLAFINKLDD | ١٦٠ |
| CBM06158 | EVIDAWNEIDHLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٦١ |
| CBM06159 | EVIEAWNEIDLLPNLTLSQWLAFINKLDD | ١٦٢ |
| CBM06160 | EVIDAWDEIDRLPNLTLKQWLAFINKLDD | ١٦٣ |
| CBM06161 | ETLHAWDEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٦٤ |
| CBM06162 | EVIKAWDEIDHLPNLTLNQWLAFINKLDD | ١٦٥ |
| CBM06163 | EVIEAWNEIDHLPNLTLAQWLAFINKLDD | ١٦٦ |
| CBM06164 | EVIQAWNEIDHLPNLTIDQWLAFITKLED | ١٦٧ |
| CBM06165 | EVIEAWNEIDRLPNLTIKQWLAFINKLDD | ١٦٨ |
| CBM06167 | EVIEAWNEIDSLPNLTLQQWLAFINKLDD | ١٦٩ |

| | | |
|---|---|---|
| CBM06168 | ETIDAWNEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٧٠ |
| CBM06169 | EVLEAWAEIDALPNLTIAQWLAFINKLDD | ١٧١ |
| CBM06170 | ETIDAWNEIDRLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٧٢ |
| CBM06171 | ETLKAWDEIDRLPNLTLEQWLAFINKLDD | ١٧٣ |
| CBM06172 | ETIAAWNEIDALPNLTLQQWLAFINKLDD | ١٧٤ |
| CBM06173 | EVLQAWNEIDHLPNLTIQQWLAFINKLDD | ١٧٥ |
| CBM06174 | EVIEAWSEIDHLPNLTLQQWLAFINKLDD | ١٧٦ |
| CBM06176 | EVIDAWNEIDGLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٧٧ |
| CBM06178 | EVIHAWNEIDHLPNLTLNQWLAFINKLED | ١٧٨ |
| CBM06179 | EVLDAWNEIDSLPNLTLDQWLAFINKLDD | ١٧٩ |
| CBM06180 | EQIEAWNEIDRLPNLTLEQWLAFINKLDD | ١٨٠ |
| CBM06181 | EVVDAWNEIDALPNLTLQQWLAFINKLDD | ١٨١ |
| CBM06182 | EVIEAWNEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٨٢ |
| CBM06183 | EVIEANDEIDRLPNLTIEQWLAFINKLHD | ١٨٣ |
| CBM06184 | ETLQAWDEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٨٤ |
| CBM06185 | EVIEAWDEIDHLPNLTIDQWLAFINKLAD | ١٨٥ |
| CBM06186 | ETIDAWNEIDHLPNLTLQQWLAFINKLAD | ١٨٦ |
| CBM06187 | EVIDAWDEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٨٧ |
| CBM06188 | EVIEAWNEIDKLPNLTLAQWLAFINKLDD | ١٨٨ |
| CBM06190 | EVLQAWDEIDKLPNLTIQQWLAFINKLDD | ١٨٩ |
| CBM06191 | EVIAAWNEIDGLPNLTLQQWLAFINKLDD | ١٩٠ |
| CBM06192 | ETLNAWNEIDALPNLTLQQWLAFINKLDD | ١٩١ |
| CBM06193 | EVLSAWNEIDQLPNLTLEQWLAFINKLDD | ١٩٢ |
| CBM06194 | ETLEAWDEIDHLPNLTLHQWLAFINKLDD | ١٩٣ |
| CBM06195 | EQIEAWNEIDHLPNLTLQQWLAFINKLAD | ١٩٤ |
| CBM06196 | EVVEAWDEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٩٥ |
| CBM06197 | EVLEAWNEIDELPNLTIEQWLAFINKLDD | ١٩٦ |
| CBM06198 | EVIDAWNEIDQLPNLTLQQWLAFINKLDD | ١٩٧ |
| CBM06199 | ETIDAWDEIDKLPNLTLSQWLAFINKLDD | ١٩٨ |
| CBM06200 | ETIDAWNEIDQLPNLTLQQWLAFINKLDD | ١٩٩ |

| | | |
|---|---|---|
| CBM06201 | EVIQAWDEIDALPNLTLNQWLAFINKLDD | ٢٠٠ |
| CBM06202 | EVLDAWAEIDQLPNLTLQQWLAFINKLDD | ٢٠١ |
| CBM06203 | EHIAAWDEIDALPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢٠٢ |
| CBM06206 | EVIRAWDEIDALPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢٠٣ |
| CBM06207 | EVIDAWDEIDALPNLTIDQWLAFINKLAD | ٢٠٤ |
| CBM06208 | EVIDAWNEIDRLPNLTIQQWLAFINKLDD | ٢٠٥ |
| CBM06209 | EVITAWNEIDHLPNLTLSQWLAFINKLDD | ٢٠٦ |
| CBM06210 | EVIDAWNEIDALPNLTIHQWLAFINKLDD | ٢٠٧ |
| CBM06211 | EQLKAWDEIDKLPNLTIEQWLAFIEKLQD | ٢٠٨ |
| CBM06212 | EHIDAWTEIDHLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢٠٩ |
| CBM06213 | EQLRAWDEIDKLPNLTIEQWLAFINKLQD | ٢١٠ |
| CBM06216 | EVLEAWREIDSLPNLTIAQWLAFINKLDD | ٢١١ |
| CBM06217 | EVIQAWNEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢١٢ |
| CBM06218 | EHVEAWNEIDQLPNLTIEQWLAFINKLAD | ٢١٣ |
| CBM06219 | EVIDAWDEIDALPNLTIDQWLAFINKLSD | ٢١٤ |
| CBM06220 | EVIEAWNEIDHLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢١٥ |
| CBM06221 | EVLQAWDEIDKLPNLTIEQWLAFINKLSD | ٢١٦ |
| CBM06222 | EVIKAWNEIDSLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢١٧ |
| CBM06223 | EVLEAWHEIDLLPNLTIQQWLAFINKLDD | ٢١٨ |
| CBM06224 | EVLEAWTEIDRLPNLTLDQWLAFINKLDD | ٢١٩ |
| CBM06225 | EQLYAWNEIDHLPNLTIEQWLAFIEKLQD | ٢٢٠ |
| CBM06227 | EVLNAWDEIDKLPNLTIKQWLAFINKLDD | ٢٢١ |
| CBM06228 | EVIRAWDEIDKLPNLTVEQWLAFINKLDD | ٢٢٢ |
| CBM06230 | EVVQAWDEIDQLPNLTLEQWLAFINKLDD | ٢٢٣ |
| CBM06231 | EVIRAWDEIDQLPNLTLEQWLAFINKLDD | ٢٢٤ |
| CBM06232 | ETIDAWNEIDHLPNLTLDQWLAFINKLDD | ٢٢٥ |
| CBM06233 | EVVAAWTEIDLLPNLTLDQWLAFINKLED | ٢٢٦ |
| CBM06234 | EVVAAWDEIDALPNLTIEQWLAFINKLSD | ٢٢٧ |
| CBM06235 | ETLEAWREIDSLPNLTLEQWLAFINKLDD | ٢٢٨ |
| CBM06236 | EVIKAWNEIDHLPNLTLDQWLAFINKLDD | ٢٢٩ |

| | | |
|---|---|---|
| CBM06237 | EVLEAWTEIDKLPNLTIDQWLAFINKLDD | ٢٣٠ |
| CBM06238 | ETLEAWDEIDKLPNLTIDQWLAFINKLDD | ٢٣١ |
| CBM06239 | EVIEAWNEIDKLPNLTIDQWLAFINKLDD | ٢٣٢ |
| CBM06240 | ETIDAWNEIDKLPNLTLEQWLAFINKLDD | ٢٣٣ |
| CBM06241 | ETLDAWDEIDALPNLTIDQWLAFINKLED | ٢٣٤ |
| CBM06242 | EVLSAWNEIDHLPNLTIQQWLAFINKLDD | ٢٣٥ |
| CBM06244 | EVIQANDEIDKLPNLTIEQWLAFIHKLHD | ٢٣٦ |
| CBM06245 | EHLDAWDEIDHLPNLTIQQWLAFINKLAD | ٢٣٧ |
| CBM06246 | EVIQAWNEIDQLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢٣٨ |
| CBM06247 | EVIEAWNEIDYLPNLTIAQWIAFINKLDD | ٢٣٩ |
| CBM06248 | ETIQAWDEIDRLPNLTLQQWLAFINKLDD | ٢٤٠ |
| CBM06249 | ETIQAWDEIDKLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢٤١ |
| CBM06250 | ETLDAWAEIDHLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢٤٢ |
| CBM06251 | EVIEAWDEIDKLPNLTLNQWLAFINKLDD | ٢٤٣ |
| CBM06252 | EVLDAWNEIDQLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢٤٤ |
| CBM06253 | EVLHAWNEIDHLPNLTIEQWLAFIEKLED | ٢٤٥ |
| CBM06254 | EVIEAWQEIDKLPNLTIDQWLAFINKLDD | ٢٤٦ |
| CBM06257 | EVVDAWNEIDQLPNLTIEQWLAFINKLDD | ٢٤٧ |
| CBM06258 | EQIEAWNEIDALPNLTIEQWLAFINKLAD | ٢٤٨ |
| PSI0242 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKVDGSLAEAKE AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP | ٢٤٩ |
| ABD | LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGV EALKDAILAALP | ٢٥٠ |
| Human C5 | MGLLGILCFLIFLGKTWGQEQTYVISAPKIFRVG ASENIVIQVYGYTEAFDATISIKSYPDKKFSYSSGH VHLSSENKFQNSAILTIQPKQLPGGQNPVSYVYLE VVSKHFSKSKRMPITYDNGFLFIHTDKPVYTPDQS VKVRVYSLNDDLKPAKRETVLTFIDPEGSEVDMV EEIDHIGIISFPDFKIPSNPRYGMWTIKAKYKEDFS TTGTAYFEVKEYVLPHFSVSIEPEYNFIGYKNFKN FEITIKARYFYNKVVTEADVYITFGIREDLKDDQK | ٢٥١ |

| | | |
|---|---|---|
| | EMMQTAMQNTMLINGIAQVTFDSETAVKELSYY<br>SLEDLNNKYLYIAVTVIESTGGFSEEAEIPGIKYVL<br>SPYKLNLVATPLFLKPGIPYPIKVQVKDSLDQLVG<br>GVPVTLNAQTIDVNQETSDLDPSKSVTRVDDGVA<br>SFVLNLPSGVTVLEFNVKTDAPDLPEENQAREGY<br>RAIAYSSLSQSYLYIDWTDNHKALLVGEHLNIIVT<br>PKSPYIDKITHYNYLILSKGKIIHFGTREKFSDASY<br>QSINIPVTQNMVPSSRLLVYYIVTGEQTAELVSDS<br>VWLNIEEKCGNQLQVHLSPDADAYSPGQTVSLN<br>MATGMDSWVALAAVDSAVYGVQRGAKKPLERV<br>FQFLEKSDLGCGAGGGLNNANVFHLAGLTFLTN<br>ANADDSQENDEPCKEILRPRRTLQKKIEEIAAKY<br>KHSVVKKCCYDGACVNNDETCEQRAARISLGPR<br>CIKAFTECCVVASQLRANISHKDMQLGRLHMKT<br>LLPVSKPEIRSYFPESWLWEVHLVPRRKQLQFAL<br>PDSLTTWEIQGVGISNTGICVADTVKAKVFKDVF<br>LEMNIPYSVVRGEQIQLKGTVYNYRTSGMQFCV<br>KMSAVEGICTSESPVIDHQGTKSSKCVRQKVEGS<br>SSHLVTFTVLPLEIGLHNINFSLETWFGKEILVKT<br>LRVVPEGVKRESYSGVTLDPRGIYGTISRRKEFPY<br>RIPLDLVPKTEIKRILSVKGLLVGEILSAVLSQEGI<br>NILTHLPKGSAEAELMSVVPVFYVFHYLETGNH<br>WNIFHSDPLIEKQKLKKKLKEGMLSIMSYRNADY<br>SYSVWKGGSASTWLTAFALRVLGQVNKYVEQNQ<br>NSICNSLLWLVENYQLDNGSFKENSQYQPIKLQG<br>TLPVEARENSLYLTAFTVIGIRKAFDICPLVKIDTA<br>LIKADNFLLENTLPAQSTFTLAISAYALSLGDKTH<br>PQFRSIVSALKREALVKGNPPIYRFWKDNLQHKD<br>SSVPNTGTARMVETTAYALLTSLNLKDINYVNPVI<br>KWLSEEQRYGGGFYSTQDTINAIEGLTEYSLLVK<br>QLRLSMDIDVSYKHKGALHNYKMTDKNFLGRPV<br>EVLLNDDLIVSTGFGSGLATVHVTTVVHKTSTSE<br>EVCSFYLKIDTQDIEASHYRGYGNSDYKRIVACAS<br>YKPSREESSSGSSHAVMDISLPTGISANEEDLKAL<br>VEGVDQLFTDYQIKDGHVILQLNSIPSSDFLCVRF<br>RIFELFEVGFLSPATFTVYEYHRPDKQCTMFYSTS<br>NIKIQKVCEGAACKCVEADCGQMQEELDLTISAE<br>TRKQTACKPEIAYAYKVSITSITVENVFVKYKATL<br>LDIYKTGEAVAEKDSEITFIKKVTCTNAELVKGR<br>QYLIMGKEALQIKYNFSFRYIYPLDSLTWIEYWP<br>RDTTCSSCQAFLANLDEFAEDIFLNGC | |
| PSI0332 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL<br>DRQPEQSSELLSEAKKLNDSQAPKVDGSLAEAKE | ٢٥٢ |

| | | |
|---|---|---|
| | AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP | |
| PSI0334 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLSESQAPKVDGSLAEAKE AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP | ٢٥٣ |
| PSI0335 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKVDGSLAEAKV LANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKL HILAALP | ٢٥٤ |
| PSI0336 | AEAKYAKEVLEAWSEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKVDGSLAEAKE AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP | ٢٥٥ |
| PSI0337 | AEAKYAKEVLEAWDEIERLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKVDGSLAEAKE AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP | ٢٥٦ |
| PSI0339 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFIAKL DDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKVDGSLAEAKE AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP | ٢٥٧ |
| PSI0340 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL EDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKVDGSLAEAKE AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP | ٢٥٨ |
| PSI0369 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPLAEAKEAANAE LDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAAL P | ٢٥٩ |
| PSI0377 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLSESQAP | ٢٦٠ |
| PSI0378 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLSESQAPKVEGSLAEAKEA ANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAALP | ٢٦١ |
| PSI0379 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLSESQAPKVAGSLAEAKE AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP | ٢٦٢ |

| | | |
|---|---|---|
| PSI0381 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLESSQAPKVEGSLAEAKEA ANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAI LAALP | ٢٦٣ |
| PSI0383 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DRQPEQSSELLSEAKKLSESQAPKVEGSLAEAKE AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP | ٢٦٤ |
| PSI0389 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLESSQAP | ٢٦٥ |
| PSI0390 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DRQPEQSSELLSEAKKLSESQAP | ٢٦٦ |
| PSI0400 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLSESQAPK | ٢٦٧ |
| PSI0410 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKVEGSLAEAKE AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP | ٢٦٨ |
| PSI0403 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLNESQAPKVEGSLAEAKE AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP | ٢٦٩ |
| PSI0404 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLSDSQAPKVEGSLAEAKE AANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDA ILAALP | ٢٧٠ |
| PSI0257 | AEAKYAKEVLEAWDEIDRLPNLTIEQWLAFINKL DDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPKVDGS | ٢٧١ |
| Z02891 | AEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRK LYDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK | ٢٧٢ |
| Z17341 | AEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRK LYDDPSQSSELLSEAKKLSESQAPK | ٢٧٣ |
| Z17342 | AEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRK LYRQPEQSSELLSEAKKLSESQAPK | ٢٧٤ |
| Z15805 | AEAKYAKELIEAAAEIDALPNLTRRQWNAFIKKL VDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK | ٢٧٥ |
| Z17343 | AEAKYAKELIEAAAEIDALPNLTRRQWNAFIKKL VDDPSQSSELLSEAKKLSESQAPK | ٢٧٦ |
| Z17344 | AEAKYAKELIEAAAEIDALPNLTRRQWNAFIKKL | ٢٧٧ |

| | | |
|---|---|---|
| | VRQPEQSSELLSEAKKLSESQAPK | |
| Z10103 | AEAKYAKEQDAAAHEIRWLPNLTFDQRVAFIHK<br>LADDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK | ٢٧٨ |
| Z17347 | AEAKYAKEQDAAAHEIRWLPNLTFDQRVAFIHK<br>LADDPSQSSELLSEAKKLSESQAPK | ٢٧٩ |
| Z17348 | AEAKYAKEQDAAAHEIRWLPNLTFDQRVAFIHK<br>LARQPEQSSELLSEAKKLSESQAPK | ٢٨٠ |
| Z09782 | AEAKYAKENLFAGWEISDLPNLTDYQRNAFIYKL<br>WDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK | ٢٨١ |
| Z17351 | AEAKYAKENLFAGWEISDLPNLTDYQRNAFIYKL<br>WDDPSQSSELLSEAKKLSESQAPK | ٢٨٢ |
| Z17352 | AEAKYAKENLFAGWEISDLPNLTDYQRNAFIYKL<br>WRQPEQSSELLSEAKKLSESQAPK | ٢٨٣ |
| Z17355 | AEAKYAKENLFAGWEISDLPNLTDYQRNAFIYKL<br>WDDPSQSSELLSEAKKLNESQAPK | ٢٨٤ |
| Z17357 | AEAKYAKENLFAGWEISDLPNLTDYQRNAFIYKL<br>WRQPEQSSELLSEAKKLNESQAPK | ٢٨٥ |
| Z17359 | AEAKYAKENLFAGWEISDLPNLTDYQRNAFIYKL<br>WDDPSQSSELLSEAKKLSDSQAPK | ٢٨٦ |
| Z17360 | AEAKYAKENLFAGWEISDLPNLTDYQRNAFIYKL<br>WRQPEQSSELLSEAKKLSDSQAPK | ٢٨٧ |

**الأمثلة**

المثال ١: اختبار الثبات لمثبط C5 معروف

تمت صياغة مركب ربط C5 باسم PSI0242 (المتوالية برقم هوية: ٢٤٩) في ٢٥ ملي مولار NaP/ ١٢٥ ملي مولار NaCl رقم هيدروجيني ٧,٠ و تعريضه إلى دراسة ثبات معجل لمدة أسبوعين عند ٣٧ درجة مئوية. تم قياس الثبات حسب مظهر الصور الجديدة بعد اختبار الثبات عن طريق SDS-PAGE و استشراب سائل عالي الأداء للطور العكسي Reversed Phase (RPC). في كلا التحليلين تم تشغيل العينة الأولية والتي تم تعريضها إلى دراسة الثبات على التوازي. بالنسبة لـ SDS-PAGE، تم تحميل ٥,٧ ميكرو جم بروتين في كل عين. استشراب سائل عالي الأداء للطور العكسي تم تشغيله على Agilent 1100استشراب سائل عالي الأداء باستخدام

طور متحرك Mobile Phase أ مكون من ٠,١ ٪ حمض تراي فلورو أسيتيك trifluoroacetic acid (TFA) في الماء، و باستخدام طور متحرك ب مكون من ٠,١ ٪ حمض تراي فلورو أسيتيك/ ٤٥ ٪ MeOH / ٤٥ ٪ أيزو بروبيل أمين isopropylamine (IPA)/ ١٠ ٪ الماء.

توضح النتائج أن الصور الجديدة من البروتينات تتكون أثناء الاحتضان، وتظر تلك الصور الجديدة كنطاقات في SDS-PAGE (الشكل ١) وكقمم جديدة في استشراب سائل عالي الأداء للطور العكسي (الشكل ٢). وفي الشكل ٢، تناظر القمة الرئيسية بعد أسبوعين من الاحتضان ٥٧٪ من عينة البروتين الأصلية original protein sample.

تم إنتاج المواضع ١-٦٠ في المتوالية برقم هوية: ٢٤٩ المناظرة للبولي ببتيد Z06175a، الذي سبق الكشف عنه في البراءة الدولية ١٢٦٠٠٦/٢٠١٣ على أنه المتوالية برقم هوية: ٧٥٣. PSI0242 (المتوالية برقم هوية: ٢٤٩) بشكل أساسي كما تم وصفه في البراءة الدولية ١٢٦٠٠٦/٢٠١٣.

المثال ٢: ثبات المعدلة بولي ببتيدات ومركبات ربط C5

تم تخليق بولي ببتيدات ومركبات ربط C5 المعدلة وتنقيتها بشكل أساسي كما تم وصفه في الطلب الدولي ١٢٦٠٠٦/٢٠١٣.

باختصار، كان دى ان أيه DNA المشفر لصور Z الرابطة لـC5 هو كودون إشرشيا كولاي الذي تمت أمثلته وتخليقه بمعرفة GeneArt, G. وتم الانتساخ الفرعي لهذه الجينات التخليقية synthetic genes الممثلة لصور Z الرابطة لـC5 والتعبير عنها في إشريشيا كولاي.

تمت تنقية صور Z المعبر عنها داخل الخلايا باستخدام طرق الكروماتوجراف chromatography methods التقليدية. وتم إجراء التجانس و التصفية بالموجات الصوتية ثم الطرد المركزي والترشيح. تم استخدام كروماتوجراف التبادل الأيوني Anion exchange chromatography كخطوة احتجاز. تم الحصول على مزيد من التنقية عن طريق كروماتوجراف تفاعل غير الآلف للماء hydrophobic interaction chromatography. وتم تنفيذ عمليات التنقية عند ظروف حامضية acidic conditions (رقم هيدروجيني ٥,٥). تم إجراء الصقل والتبادل المنظم عن طريق كروماتوجراف الاستبعاد الحجمي size exclusion chromatography.

تمت صياغة البروتينات المنقاة في ٢٥ ملي مولار NaP/ ١٢٥ ملي مولار NaCl رقم هيدروجيني ٧,٠ و تعريضها إلى دراسة ثبات معجل accelerated stability لمدة أسبوعين عند ٣٧ درجة مئوية. تم قياس الثبات حسب مظهر الصور الجديدة بعد اختبار الثبات عن طريق SDS-PAGE و استشراب سائل عالي الأداء للطور العكسي. في كلا التحليلين تم تشغيل العينة الأولية والتي تم تعريضها إلى دراسة الثبات على التوازي. بالنسبة لـ SDS-PAGE، تم تحميل ٧. ٥ ميكرو جم بروتين في كل عين. يظهر أحد أمثلة الهلام الناتج في الشكل ٣.

استشراب سائل عالي الأداء للطور العكسي تم تشغيله على Agilent 1100استشراب سائل عالي الأداء باستخدام طور متحرك أ مكون من ٠,١ ٪ حمض تراي فلورو أسيتيك في الماء، و طور متحرك ب مكون من ٠,١ ٪ حمض تراي فلورو أسيتيك / ٤٥ ٪ MeOH / ٤٥ ٪ أيزو بروبيل أمين/ ١٠ ٪ الماء. يظهر أحد أمثلة مخطط استشرابي الناتجة في الشكل ٤ للمتوالية برقم هوية: ٢٥٣.

نتائج اختبار الثبات تم تلخيص في الجدول ٢، أدناه.

الجدول ٢

| المتوالية برقم هوية: | الاسم | نطاقات SDS-PAGE | قمم استشراب سائل عالي الأداء للطور العكسي | القمة الأساسية (٪ إجمالي البروتين) | استشراب سائل عالي الأداء للطور العكسي بعد القمم |
|---|---|---|---|---|---|
| ٢٤٩ | PSI0242 | ٢ | ٢ | ٥٧ | ١ |
| ٢٥٢ | PSI0332 | ٢ | ١ | ٥٧ | ١ |
| ٢٥٣ | PSI0334 | ١ | ١ | ٧٣ | ٠ |
| ٢٥٤ | PSI0335 | ٢ | ٢ | ٥٧ | ١ |

| ٢٥٥ | PSI0336 | ٢ | ٢ | ٥٧ | ١ |
|---|---|---|---|---|---|
| ٢٥٦ | PSI0337 | ٢ | ٢ | ٥٧ | ١ |
| ٢٥٧ | PSI0339 | ٢ | ٢ | ٥٧ | ١ |
| ٢٥٨ | PSI0340 | ٢ | ٢ | ٦٧ | ١ |
| ٢٥٩ | PSI0369 | ٢ | ١ | ٩٠ | ١ |
| ٢٦٠ | PSI0377 | ١ | ٠ | ٧٧ | ٠ |
| ٢٦١ | PSI0378 | ١ | ٠ | ٨٩ | ٠ |
| ٢٦٢ | PSI0379 | ١ | ٠ | ٨٨ | ٠ |
| ٢٦٣ | PSI0381 | ١ | ٠ | ٨٧ | ٠ |
| ٢٦٤ | PSI0383 | ١ | ٠ | ٩١ | ٠ |
| ٢٦٧ | PSI0400 | ١ | ٠ | ٩١ | ٠ |
| ٢٦٨ | PSI0410 | ١ | ١ | ٧٢ | ١ |
| ٢٦٩ | PSI0403 | ١ | ١ | ٧٧ | ١ |
| ٢٧٠ | PSI0404 | ١ | ١ | ٨٨ | ٠ |

يمكن استنتاج من الجدول ٢ أن بولي ببتيدات أو مركبات ربط C5 معدلة معينة ذات خواص محسنة، مثل زيادة الثبات مقارنة بـPSI0242 . تشمل بولي ببتيدات أو مركبات ربط C5 المحسنة PSI0334 (المتوالية برقم هوية: ٢٥٣)، PSI0340 (المتوالية برقم هوية: ٢٥٨)، PSI0369

(المتوالية برقم هوية: ٢٥٩)، PSI0377 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٠)، PSI0378 (المتوالية برقم هوية: ٢٦١)، PSI0379 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٢)، PSI0381 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٣)، PSI0383 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٤)، PSI0400 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٧)، PSI0410 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٨)، PSI0403 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٩) و PSI0404 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٠). في ستة من الصور المذكورة (المتوالية برقم هوية: ٢٥٣، ٢٦٠، ٢٦١، ٢٦٢، ٢٦٤ و ٢٦٧)، تم استبدال الوحدات البنائية للحمض الأميني في المواضع ٥٢-٥٣ من ND (راجع PSI0242) إلى SE. في المتوالية برقم هوية: ٢٦٣، يكون الاستبدال المناظر من ND إلى ES. في المتوالية برقم هوية: تم استبدال ٢٦٩ فقط وحدة الحمض الأميني البنائية amino acid residue في الموضع ٥٣ من D إلى E، بينما في المتوالية برقم هوية: ٢٧٠ تم استبدال وحدة الحمض الأميني البنائية في الموضع ٥٢ من N إلى S.

علاوة على ذلك، تشترك PSI0378 (المتوالية برقم هوية: ٢٦١)، PSI0381 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٣)، PSI0383 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٤)، PSI0410 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٨)، PSI0403 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٩) و PSI0404 (المتوالية برقم هوية: ٢٧٠) في استبدال لوحدة الحمض الأميني البنائية من D إلى E في الموضع ٦٠.

يمكن رؤية الفائدة المشتركة لاستبدالات تعزيز الثبات في الموضع ٥٢ أو ٥٣ و الموضع ٦٠ في الشكل ٥، حيث يوضح مخطط استشرابي لـPSI0383 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٤). في PSI0379 (المتوالية برقم هوية: ٢٦٢) يكون الاستبدال في الموضع ٦٠ من د إلى أ.

في PSI0369 (متوالية برقم هوية: ٢٥٩) تتم إزالة الشق الرابط (مثل D60)، فينتج مركب ربط C5 أكثر ثباتاً مما يدل على تأثير الموضع ٦٠ على ثبات مركبات ربط C5.

المثال ٣: ربط مركبات معدلة بـC5 البشري

تم نقل ألبومين مصل بشري Human serum albumin الجيل الثاني تفاعلي الأمين Amine Reactive 2nd generation Dip and Read Biosensors (AR2G) Pall Life sciences (ForteBio) Cat # 18-5092) عن طريق الاقتران بالأمين. وتم تحميل PSI0242 (المتوالية برقم هوية: ٢٤٩؛ ١ ميكرو مولار) ومركبات ربط C5 (١ ميكرو مولار) في محلول منظم قراءة

read buffer (محلول منظم اتش بي إس- إي بي HBS-EP جاهز للاستخدام ٢٠٠ مل، GE Healthcare #BR100188)، كل منها على مستشعر منفصل separate sensor مع اتش أس أيه HSA، لمدة ١٢٠ ثانية ثم تسجيل خط أساسي لمدة ٦٠ ثانية في محلول منظم قراءة قبل تعريضه إلى C5 بشري (Quidel Cat # 403) في تركيزات تتراوح من ٠,٧٩ نانو مولار إلى ٢٥ نانو مولار في محلول منظم قراءة مع دورة تجديد regeneration cycle وتسجيل خط أساسي بين كل تركيز. كانت ظروف التجديد للمستشعرات sensors هي ١٠ ملي مولار جلايسين Glycine، رقم هيدروجيني ٢ (ثلاث نبضات مع ٣٠ ثانية و محلول منظم للدورة لمدة ٦٠ ثانية). وتم طرح كل مخطط طيفي spectrogram مرجعياً من مكون مناظر يحتوي على نطاق ربط الألبومين (متوالية برقم هوية: ٢٥٠) ولكن دون القدرة على ربط C5. تم تحليل البيانات طبقاً لنموذج Langmuir ١: ١ باستخدام (Pall Life sciences (ForteBio) kinetics software) ForteBio Analysis 7.1.

يظهر ثابت انفصال $K_D$ التفاعل مع C5 بالنسبة لـPSI0242 (متوالية برقم هوية: ٢٤٩) في الجدول ٣. وقد تراوح $K_D$ ل PSI0242 من ١- ٣ نانو مولار في دورات مختلفة.

تدل النتائج التي في الجدول ٣ على أن مركبات ربط C5 الخاصة بالاختراع ذات قدرة ارتباط بـC5 البشري مشابهة لتلك الخاصة بالبولي ببتيد PSI0242 (متوالية برقم هوية: ٢٤٩) التي تم الكشف عنها في الطلب الدولي ١٢٦٠٠٦/٢٠١٣.

الجدول ٣

| المتوالية برقم هوية: | الاستبدال | الحقيقي. $K_D$ |
|---|---|---|
| ٢٤٩ | PSI0242 | ١,٠ |
| ٢٥٣ | PSI0334 | ١,١ |
| ٢٦١ | PSI0378 | ١,٣ |
| ٢٦٣ | PSI0381 | ٢٣ |

| | | |
|---|---|---|
| ٢٦٤ | PSI0383 | ٢,١ |

المثال ٤: ثبات مخلق كيميائياًC5 ربط بولي ببتيد

تم طلب PSI0400 مخلق كيميائياً (المتوالية برقم هوية: ٢٦٧) من BACHEM AG. تم اختبار ثبات البولي ببتيد بنفس الطريقة كما في المثال ٢. نتائج اختبار الثبات موضحة في الجدول ٤.

الجدول ٤

| المتوالية برقم هوية: | الا سم | نطاقات SDS-PAGE | قمم استشراب سائل عالي الأداء للطور العكسي | القمة الأساسية (٪ إجمالي البروتين) | استشراب سائل عالي الأداء للطور العكسي بعد القمم |
|---|---|---|---|---|---|
| ٢٦٧ | PSI0400 | ١ | ٠ | ٩١ | ٠ |

٥ كان ثبات PSI0400 مشابهاً للبولي ببتيدات التي تم إنتاجها في إشريشيا كولاي في المثال ٢.

تمت مقارنة تكامل طي PSI0400 integrity of fold (متوالية برقم هوية: ٢٦٧) ببولي ببتيد ربط C5 الناتج عن عودة الارتباط الجيني (PSI0257، متوالية برقم هوية: ٢٧١)، الذي تم إنتاجه وفقاً لطرق المثال ٢، باستخدام أطياف spectra تلون ثنائي مستدير circular dichroism (CD) للاشعة فوق البنفسجية البعيدة.

١٠ تم تسجيل أطياف تلون ثنائي مستدير عن طريق مقياس الاستقطاب الطيفي spectropolarimeter تلون ثنائي مستدير J-720 (جاسكو، اليابان). تم تخفيف العينات إلى ٠,١٧ مجم/ مل من تركيز البروتين باستخدام محلول منظم Pi (٥ ملي مولار $Na-K-PO_4$، برقم هيدروجيني ٧). تم أولاً تسجيل طيف تلون ثنائي مستدير للمحلول المنظم Pi، ثم تسجيل الأطياف لكل عينة وأخيراً للمحلول المنظم Pi مرة أخرى. وعندما يتوافق طيفي محلول منظم buffer spectra، تم استخدام ١٥ الطيف المسجل recorded spectrum أولاً كطيف للمحلول المنظم buffer spectrum. تم تنظيم طيف المحلول المنظم باستخدام إجراء Savitzky-Golay بعرض لفة قدره ٢٥. تم تنظيم باقي الأطياف وفقاً لنفس الإجراء بعرض لفة ١٥. ثم تم طرح طيف المحلول المنظم smoothened

buffer spectrum الذي تم تنظيمه من الطيف المنظم smoothened spectra الآخر. تم استخدام برنامج سى دى ان ان CDNN في تقدير المحتوى الثانوية من البروتينات وعرض التقديرات الناتجة في الجدول ٤. دلت النتائج على عدم تأثير كلا استبدالي الحمض الأمين عند الموضع ٥٢ و ٥٣ وإنتاج البولي ببتيد عن طريق التخليق الكيميائي chemical synthesis على محتوى البنية الثانوي للبولي ببتيد المخلق كيميائياً chemically synthesized polypeptide. تمت مقارنة سلامة البنية الثانوية بـPSI0257 المنتج بعودة الارتباط الجيني (متوالية برقم هوية: ٢٧١).

الجدول ٥

| | المتوالية برقم هوية: ٢٧١ | المتوالية برقم هوية: ٢٦٧ |
|---|---|---|
| حلزون | ٦٣ ٪ | ٦٩ ٪ |
| عكسي التوازي | ٣ ٪ | ٢ ٪ |
| متوازي | ٣ ٪ | ٣ ٪ |
| دوران- بيتا | ١٣ ٪ | ١٢ ٪ |
| ملف عشوائي | ١٣ ٪ | ١١ ٪ |

المثال ٥: ربط مركبات وبولي ببتيدات بـC5 معدلة البشري

تم تحليل ألفة ارتباط مركبات ربط PSI0242 C5 (متوالية برقم هوية: ٢٤٩)، وPSI0340 (متوالية برقم هوية: ٢٥٨)، وPSI0378 (متوالية برقم هوية: ٢٦١)، وPSI0410 (متوالية برقم هوية: ٢٦٨) وبولي ببتيد ربط PSI0400 C5 (متوالية برقم هوية: ٢٦٧) لـC5 البشري وذلك باستخدام جهاز Biacore T200 (GE Healthcare). تم اقتران C5 البشري (A403, Quidel Corporation) بشريحة مستشعر CM5 sensor chip (900 RU) باستخدام كميائي اقتران أمين

amine coupling chemistry طبقا لبروتوكول المصنع. تم إجراء الاقتران بحقن hC5 بتركيز ٧,٥ ميكرو جم/ م ل في ١٠ ملي مولار محلول منظم Na – أسيتات acetate برقم هيدروجيني = ٥ (GE Healthcare). تمت معالجة الخلية المرجعية reference cell بنفس المواد الكاشفة reagents ولكن دون حقن C5 البشري. تمت دراسة ارتباط روابط C5 بـ hC5 المنقول بطريقة حراكيات الدائرة cycle kinetics الواحدة، حيث تم حقن خمس تركيزات للعينة نمطياً ٢٥، ١٢,٥، ٦,٢٥، ٣,١٢، و١,٥٦ نانو مولار في محلول منظم HBS-EP (١٠ ملي مولار اتش إي بي إي إس HEPES رقم هيدروجيني ٧,٤، ١٥٠ ملي مولار NaCl، و٣ ملي مولار ايدتا EDTA، و٠,٠٠٥٪ خافض توتر سطحي P20 Surfactant، GE Healthcare) واحداً تلو الآخر بمعدل تدفق ٣٠ ميكرو لتر/ دقيقة عند ٢٥ْ م في نفس الدورة دون تجديد بين علميات الحقن. تم طرح البيانات من العينة المرجعية لمعادلة تغيرات معامل الانكسار السائب bulk refractive index. وفي معظم الحالات، تم أيضاً إدراج حقن HBS-EP كعينة مقارنة بحيث تم تفريغ مخططات المستشعرات sensorgrams ضعفين. تم تجديد الأسطح في المحلول المنظم HBS-EP. وتم حساب ثوابت الحراكيات من مخططات المستشعرات باستخدام نموذج تحليل Langmuir ١: ١ لبرنامج Biacore T200 Evaluation Software version 1.0. وتظهر قيم $K_D$ الناتجة للتفاعلات في الجدول ٥.

الجدول ٦

| المتوالية برقم هوية: | الاسم | $K_D$(نانو مولار) |
|---|---|---|
| ٢٤٩ | PSI0242 | ١,٣ |
| ٢٥٨ | PSI0340 | ٢,٥ |
| ٢٦١ | PSI0378 | ٢,١ |
| ٢٦٧ | PSI0400 | ٠,٥٣ |
| ٢٦٨ | PSI0410 | ١,٣ |

لا تعتبر استبدالات الحمض الأميني المعززة للثبات أساسية لقدرة الجزئيات على الارتباط بـC5 ومن ثم لا تؤثر على أنشطتها الحيوية.

المثال ٦: تثبيط انحلال الدم

لدراسات مسار المكمل التقليدي وتثبيطه عن طريق مركبات ربط PSI0378 C5 (المتوالية برقم هوية ٢٦١) وPSI0410 C5 (المتوالية برقم هوية ٢٦٨)، وبولي ببتيد ربط PSI0400 C5 (المتوالية برقم هوية ٢٦٧)، تم تحضير خلايا كرات دم من الغنم s من دم غنم كامل طازج في محلول Alsever's (Swedish National Veterinary Institute) ثم معالجتها بمصل مضاد antiserum من لكرات دم الغنم مأخوذة من الأرانب rabbit anti-sheep erythrocyte (Sigma) لتصبح كرات دم غنم ذات حساسية للجسم المضاد antibody sensitized sheep erythrocyte (EA). تم إجراء العملية بالكامل تحت ظروف معقمة. وكانت جميع الكواشف reagents من مصادر تجارية.

تم إجراء الاختبار المعملي في طبق عياري دقيق microtiter plate على شكل حرف U به ٩٦ عيناً بالإضافات المتتالية لبروتين اختبار، ومصل مكمل complement serum و معلق suspension اي ايه EA. وكانت التركيزات النهائية لجميع الكواشف، في حجم تفاعل إجمالي ٥٠ ميكرو لتر لكل عين عند رقم هيدوجيني ٧,٣- ٧,٤ هو: ٠,١٥ ملي مولار CaCl 2؛ ٠,٥ ملي مولار MgCl 2؛ و٣ ملي مولار NaN 3؛ ١٣٨ ملي مولار NaCl ؛ ٠,١٪ جيلاتين gelatin؛ ١,٨ ملي مولار باربتال صوديوم sodium barbital؛ ٣,١ ملي مولار حمض باربتوريك barbituric acid؛ ٥ مليون EA؛ مصل بروتين مكمل C5 بتخفيف مناسب؛ ومركب أو بولي ببتيد رابط لـC5 بالتركيزات المطلوبة.

تم الاحتضان المسبق لمركبات وبولي ببتدات ربط C5 مع مصل المكمل الموصوف أعلاه لمدة ٢٠ دقيقة على الثلج قبل بدء التفاعل بإضافة معلق EA. تم السماح لتفاعل الانحلال الدموي hemolytic reaction بالبدء عند ٣٧°م أثناء التقليب لمدة ٤٥ دقيقة وتم اختيارياً الإنهاء بإضافة ١٠٠ ميكرو لتر من محلول ملحلي مبرد بالثلج ice-cold saline يحتوي على ٠,٠٢٪ توين ٢٠.

وتم إجراء الطرد المركزي للخلايا وتم نقل الجزء السفلي والعلوي، ويناظر لـ١٠٠ ميكرو لتر خافض توتر سطحي، إلى طبق دقيق شفاف transparent microplate به أعين لنصف المساحة ومسطحة القاع. وتم تحليل نتائج التفاعل ككثافة ضوئية باستخدام قارئ أطباق دقيقة العيار microtiter plate reader عند طول موجي ٤١٥ نانو متر.

في جميع ظروف الاختبار، تم إدراج عينة مقارنة (PSI0242، المتوالية برقم هوية: ٢٤٩) وناقل في كل طبق لتحديد قيم التفاعلات غير المثبطة والمثبطة، على الترتيب. تم استخدام تلك القيم في حساب نسبة تثبيط الانحلال الدموي المكمل عند أي تركيز للعينة. تم تحديد القوى المثبطة inhibitory potencies (قيم IC 50) لمركبات وبولي ببتيدات ربط C5 المختبرة عن طريق استخدام نفس الاختبار في وجود تركيز مقنن لـC5 البشري مضافاً إلى مصل مستنفد C5 depleted serum. وبالنسبة للمثبطات القوية (نانو مولار منخفض إلى نانو مولار فرعي)، تم التحكم في تركيز خليط التفاعل عند ٠,١ نانو مولار، والذي أنشئ اختيارياً باستخدام أمصال مستنفدة C5 أو ضعيفة. والنتاج مقدمة فيما يلي في الجدول ٦.

الجدول ٧

| المتوالية برقم هوية: | الاسم | القوة (٪) | IC 50(نانو مولار) |
|---|---|---|---|
| ٢٤٩ | PSI0242 | ١٠٠ | ٠,٤٧ |
| ٢٦١ | PSI0378 | ٨٣ | ٠,٥٨ |
| ٢٦٧ | PSI0400 | - | ٤ |
| ٢٦٨ | PSI0410 | ١٠٧ | ٠,٤٩ |

تدل النتائج من اختبار الانحلال الدموي hemolysis assay أن مركبات ربط C5 المطورة للمتوالية برقم هوية: ٢٦١ و٢٦٨ كانت مشابهة للمركب المرجعي. وكان بولي ببتيد ربط C5 للمتوالية برقم

هوية: ٢٦٧ وظيفياً في الاختبار ولكن نظراً لعدم احتواءه على نطاق ربط ألبومين فلا يمكن مقارنة النتائج مباشرة بالمركب المرجعي.

المثال ٧: الارتباط بالالبومين البشري

لتقييم ألفة ارتباط مركبات ارتباط C5 للألبومين، تم استخدام ألبومين إى ال آى أس أيه ELISA بشري باستخدام ألبومين بشري ناتج عن عودة الارتباط (غلاف) وأجسام مضادة متوفرة تجارياً (رئيسية وكاشفة) يتم شراؤها من Novozymes, Affibody AB وakoCytomation، على الترتيب. وتم استخدام معيار طريقة PSI0242 (متوالية برقم هوية: ٢٤٩)، المشتمل على بولي ببتيد رابط لـC5 ونطاق ربط ألبومين لبروتين عقدي G، في قياس العينات.

تمت تغطية طبق دقيق به ٩٦ عيناً بألبومين بشري ناتج عن عودة الارتباط. ثم تم غسل الطبق بمحلول ملحي منظم بالفوسفات phosphate buffered saline يحتوي على ٠,٠٥٪ توين ٢٠ (بى بى أس تى PBST) ومعاق لمدة ١- ٢ ساعة بـ١٪ كاسين casein في محلول منظم بالفوسفات phosphate-buffered saline (PBS). وبعد غسل الطبق، تتم إضافة المقياس، وعينات مقارنة الطريقة وعينة المقارنة وعينات الاختبار للطبق. وبعد الاحتضان لمدة ساعتين، تمت إزالة المادة غير المربوطة unbound material بالغسل. وتمت إضافة Anti-Affibody® IgG من الماعز (Affibody AB, cat no. 20.1000.01.0005) إلى الأعين واحتضان الطبق لمدة ١,٥ ساعة للسماح بالارتباط بمركبات ربط C5 المربوطة. وبعد الغسل، تم السماح لـIgG HRP مضاد للماعز مأخوذ من الأرنب بالارتباط بأجسام مضادة من الماعز لمدة ساعة، و بعد الغسل النهائية، تم رصد كمية اتش آر بى HRP المربوط عن طريق إضافة ركيزة تى ام بى TMB، حيث تحولت إلى منتج أزرق اللون بفعل الإنزيم. أوقفت إضافة ١ مولار حمض هيدروكلوريك hydrochloric acid بعد ٣٠ دقيقة التفاعل وتغير لون محتويات العين من الأزرق إلى الأصفر. تم قياس الامتصاص عند ٤٥٠ نانو متر ضوئياً، باستخدام الامتصاص عند ٦٥٠ نانو متر كطول موجي مرجعي reference wavelength. تناسبت شدة اللون مع كمية PSI0242 (متوالية برقم هوية: ٢٤٩) وقياس تركيزات العينات من المنحنى المعياري.

وقد أثبتت مركبات ربط C5 المشتملة على نطاق ربط ألبومين لبروتين G قدرتها على الارتباط بألبومين بشري والبيانات ممثلة في الجدول ٨ التالي.

الجدول ٨

| المتوالية برقم هوية: | الاسم | ٪ من إجمالي محتوى البروتين |
|---|---|---|
| ٢٤٩ | PSI0242 | ١٠٣ |
| ٢٦١ | PSI0378 | ٨٥ |
| ٢٦٨ | PSI0410 | ١٥٠ |

لقد دلت النتائج من التجربة أن كلاً من مركبي ربط C5 المحسنة للثبات الذي تمت دراستهما يحتفظ بقدرت على ربط الألبومين البشري human albumin.

المثال ٨: اختبار ثبات لمدة ٣ أشهر لمركبات/ بولي ببتيدات ربط C5

تم تعريض مركبات / بولي ببتيدات ربط C5 التي أثبتت تحسن الثبات مقارنة بـPSI0242 في اختبار الثبات لمدة أسبوعين عند ٣٧°م (المثال ٢) إلى اختبار ثبات أطول لمدة ٣ أشهر عند ٣٧°م. كان إعداد اختبار الثبات كما ت م وصفه في المثال ٢ وتم تقييم الثبات عن طريق قياس القمة الرئيسية للنسبة المؤية لمخطط استشرابي لإجمالي محتوى الروتين عن طريق استشراب سائل عالي الأداء للطور العكسي، وتم إجراء طريقة استشراب سائل عالي الأداء للطور العكسي كما تم وصفه في المثال ٢. وتدخل بيانات الأسبوعين من المثال ٢ في الجدول ٩ التالي لتسهيل التفسير.

الجدول ٩

| المتوالية برقم هوية: | الاسم | أسبوعين،٣٧ْ م القمة الأساسية (٪ إجمالي البروتين) | 3أشهر، 37 °C القمة الأساسية (٪ إجمالي البروتين) |
|---|---|---|---|
| ٢٥٣ | PSI0334 | ٧٣ | ١٦ |
| ٢٦١ | PSI0378 | ٨٩ | ٥٩ |
| ٢٦٢ | PSI0379 | ٨٨ | ٥٨ |
| ٢٦٣ | PSI0381 | ٨٧ | ٤٦ |
| ٢٦٤ | PSI0383 | ٩١ | ٥٩ |
| ٢٦٨ | PSI0410 | ٧٢ | ١٦ |
| ٢٦٩ | PSI0403 | ٧٧ | ٣٥ |
| ٢٧٠ | PSI0404 | ٨٨ | ٤٦ |

تحتوي مركبات ربط C5 مع استبدالات الحمض الأميني في الموضع ٥٢، ٥٣ من ND إلى SE و استبدال في الموضع ٦٠ من D إلى E أو A (المتوالية برقم هوية: ٢٦١، ٢٦٤، و ٢٦٢) مقارنة بـPSI0242 على نسبة أعلى من بروتين في الصورة الأصلية بعد ٣ أشهر عند ٣٧ درجة مئوية مقارنة بـ PSI0242 (المتوالية برقم هوية: ٢٤٩) بعد أسبوعين في نفس الظروف. كما قد تظهر باقي المركبات زيادة في الثبات أيضاً. المثال:9 ثبات بولي ببتيدات معدلة بشكل مشابه.

بالمثل تم تعديل صور البولي ببتيدات المعروفة من قبل المشتقة من البروتين Z (Grönwall *et al*. J Biotechnol 2007, 128:162-183) بألفة ارتباط لجزيئات هدف أخرى غير C5 في

مواضع معينة من متوالية الحمض الأميني من أجل تحسينا لثبات. ولقد تم و صف اختيار وإنتاج صور البولي ببتيدات الأصلية ذات ألفة ارتباط لمستقبل عامل نمو البشرة البشري ٢ human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)، وعامل النمو المستمد من الصفيحات بيتا platelet-derived growth factor receptor beta (PDGF-Rβ)، ومستقبل Fc لحديثي الولادة neonatal Fc receptor (FcRn)، والأنهيدراز الكربوني IX carbonic anhydrase IX (CAIX)، على سبيل المثال في البراءة الدولية ٢٠٠٩/٠٨٠٨١٠، البراءة الدولية ٢٠٠٩/٠٧٧١٧٥، طلب نشر براءة الاختراع الأوربية رقم ٢٠١٤/٠٥٥٢٩٩ والبراءة الدولية ٢٠١٤/٠٩٦١٦٣. تم إنتاج صور بولي ببتيدات محسنة الثبات عن طريق التطفير المتجهة للموقع site-directed mutagenesis عند مواضع مختارة لمتوالية الحمض الأميني. وفيما يلي في الجدول ٩ استبدالات الحمض الأمين المحسنة للثبات في صور البولي ببتيدات Z02891 (متوالية برقم هوية: ٢٧٢)، المستهدفة لـ عامل نمو البشرة البشري ٢؛ و Z15805 (متوالية برقم هوية: ٢٧٥)، المستهدفة ل عامل النمو المستمد من الصفيحات بيتا Z10103 β (متوالية برقم هوية: ٢٧٨)، المستهدفة لـ مستقبل Fc لحديثي الولادة؛ و Z09782 (متوالية برقم هوية: ٢٨١)، المستهدفة لـ الأنهيدراز الكربوني IX. تختلف صور البولي ببتيدات محسنة الثبات عن بولي ببتيدات ربط C5 الخاصة بالاختراع الحالي على سبيل المثال في أن بها محفز ربط [ حافز ربط ] بألفة ارتباط لـ عامل نمو البشرة البشري ٢، عامل النمو المستمد من الصفيحات بيتا β، مستقبل Fc لحديثي الولادة، و الأنهيدراز الكربوني IX.

تم انتساخ جميع الصور ببطاقة طرفية N ×٦ هيستدين 6 x Histidine (His6) وشفرت المكونات الناتجة البولي ببتيدات في تنسيق [Z#####]-MGSSHHHHHHLQ. تم إدخال الطفرات في بلازميدات plasmids صور البولي ببتيدات باستخدام أزواج رئيسية لأوليجو نيوكليوتيدات متداخلة overlapping oligonucleotide تشفر استبدالات الحمض الأميني الناتجة وبتطبيق طريقة البيولوجيا الجزيئية. وتم تأكيد متواليات البلازميدات plasmid sequences الصحيحة باستخدام عمل متواليات دنا DNA.

تم تويل خلايا الإشريشيا كولاي (السلالة T7E2) (GeneBridge) باستخدام بلازميدات تحتوي على شظايا جين gene fragments مشفرة للبولي ببتيدات الأصلية والمعدلة. تمت زراعة الخلايا عند

٣٧°م في وسط TSB-YE الذي تم إكماله بـ٥٠ ميكرو جم/ مل كاناميسين kanamycin و تم إحداث التعبير عن البروتين بعد ذلك بإضافة آى بى تى جى IPTG. تم تمزق الخلايا المحببة Pelleted cells باستخدام جهاز التجانس homogenizer (Nordic Biolabs) FastPrep®-24 وتمت إزالة بقايا الخلايا cell debris بالطرد المركزي. تمت تنقية كل مادة طافية supernatant تحتوي على صورة البولي ببتيد مثل بروتين به بطاقة ٦× هيستدين تمت تنقيته بكروماتوجراف ألفة affinity chromatography أيون فلزي ثابت immobilized metal ion (IMAC) باستخدام أعمدة His GraviTrapTM (GE Healthcare) طبقاً لتعليمات المصنع. تم استبدال صور البولي ببتيد المنقاة منظم بمحلول منظم بالفوسفات (١,٤٧ ملي مولار KH2PO4، ٨,١ ملي مولار Na2HPO4، ١٣٧ ملي مولار NaCl، ٢,٦٨ ملي مولار KCl، برقم هيدروجيني ٧,٤) باستخدام أعمدة تحلية desalting columns (GE Healthcare) PD-10. تمت التأكد من الهوية الصحيحة لكل بولي ببتيد عن طريق SDS-PAGE و HPLC-MS .

الجدول ١٠

| المتوالية برقم هوية: | الاسم | الهدف | استبدالات الحمض الأميني | الأصلية مقابل المعدلة |
|---|---|---|---|---|
| ٢٧٢ | Z02891 | عامل نمو البشرة البشري ٢ | - | الأصلية |
| ٢٧٣ | Z17341 | عامل نمو البشرة البشري ٢ | D53E،N52S | المعدلة |
| ٢٧٤ | Z17342 | عامل نمو البشرة البشري ٢ | S39E، D37Q،D36R ، D53E،N52S | المعدلة |
| ٢٧٥ | Z15805 | عامل النمو المستمد من الصفيحات بيتاβ | - | الأصلية |
| ٢٧٦ | Z17343 | عامل النمو المستمد من الصفيحات بيتاβ | D53E،N52S | المعدلة |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ٢٧٧ | Z17344 | عامل النمو المستمد من الصفيحات بيتاβ | S39E، D37Q،D36R ، D53E،N52S | المعدلة |
| ٢٧٨ | Z10103 | مستقبل Fc لحديثي الولادة | - | الأصلية |
| ٢٧٩ | Z17347 | مستقبل Fc لحديثي الولادة | D53E،N52S | المعدلة |
| ٢٨٠ | Z17348 | مستقبل Fc لحديثي الولادة | S39E، D37Q،D36R ، D53E،N52S | المعدلة |
| ٢٨١ | Z09782 | الأنهيدراز الكربوني IX | - | الأصلية |
| ٢٨٢ | Z17351 | الأنهيدراز الكربوني IX | D53E،N52S | المعدلة |
| ٢٨٣ | Z17352 | الأنهيدراز الكربوني IX | S39E، D37Q،D36R ، D53E،N52S | المعدلة |
| ٢٨٤ | Z17355 | الأنهيدراز الكربوني IX | D53E | المعدلة |
| ٢٨٥ | Z17357 | الأنهيدراز الكربوني IX | S39E، D37Q،D36R ، D53E | المعدلة |
| ٢٨٦ | Z17359 | الأنهيدراز الكربوني IX | N52S | المعدلة |
| ٢٨٧ | Z17360 | الأنهيدراز الكربوني IX | S39E، D37Q،D36R ، N52S | المعدلة |

بغض النظر عن استبدالات أحد (المتوالية برقم هوية: ٣٨٤- ٣٨٧) أو كل من (المتوالية برقم هوية: ٢٧٣-٢٧٤, ٢٧٦-٢٧٧, ٢٧٩-٢٨٠, ٢٨٢-٢٨٣) N52 وD53 ، تم إجراء الاستبدالات في المواضع المناظرة للحلقة [L2]. ومن ثم، في صور البولي ببتيدات للمتوالية برقم هوية: ٢٧٤, ٢٧٧, ٢٨٠, ٢٨٣, ٢٨٥ و٢٨٧، كانت L2] هي RQPE.

لإجراء اختبارات الثبات، تم تخفيف صور البولي ببتيد، وصياغتها في محلول منظم بالفوسفات برقم هيدروجيني ٧,٤ إلى ١ مجم/ مل وتم احتضان قسيمات aliquotes ٢٠٠ ميكرو لتر عند ٣٧°م لمدة أسبوعين. تم تحليل العينات التي تم جمعها قبل وبعد اختبار الثبات عن طريق SDS-PAGE باستخدام هلام ١٠٪ بيس- تريس NuPAGE (Invitrogen) وتحميل ٥ ميكرو جم بروتين في كل عين. ويظهر الشكل ٦ الهلام الملطخ بأزرق كوماسي Coomassie blue stained gels الناتج. وتم تقييم الثبات حسب مظهر الأنواع الجديدة بعد الاحتضان عند درجة الحرارة المرتفعة وتمت مقارنة الأنواع المطفرة بالبولي ببتيد الأصلي المناظر.

أظهرت جميع أنواع البولي ببتيد مع التعديلات المبينة في الجدل ٩ تحسن في الثبات مقارنة بالبولي ببتيد الأصلي المناظر بحيث لم يظهر نطاق ثاني مباشرة فقو النطاق الرئيسي الملاحظ لعينات البولي ببتيد الأصلي في عينات البولي ببتيدات المعدلة ذات الاستبدال D53E و/ أو N52S، راجع الشكل ٦. وقد أظهرت البولي ببتيدات ذات الاستبدالات D53E و/ أو N52S المدمجة مع الاستبدالات D36R، D37Q، وS39E خواص مشابهة على الهلام SDS-PAGE. ويبدو أن استبدال D53E بمفرده أو بالاشتراك مع الاستبدالات D36R، D37Q، وS39E قد قلل من كمية النوع مع تأكيد بديل ظهر باعتباره نطاق ثان على هلام specie، و لكن لم يمكنه منع تكون هذا النوع تماماً.

بالإضافة إلى ذلك، تم اختبار قدرة ارتباط صور البولي ببتيد المعدلة. وقد احتفظت جميع صور البولي ببتيد بألفة ارتباطها لهدفها بعد تعديلها (النتائج غير مبينة).

تتناظر النتائج السابق عرضها لأنواع البولي ببتيد ذات ألفة ارتباط لجزيئات هدف أخرى غير C5 جيدا مع النتائج المقدمة لبولي ببتيدات ومركبات ربط C5 الخاصة بالاختراع الحالي (راجع، على سبيل المثال، المثال ٢ و٤). لذلك، يبدون أن استبدالات الحمض الأميني كما تم وصفها في

الوثيقة الحالية ذات تأثير مثبت بغض النظر عن متوالية الحمض الأميني ل[حافز ربط]. ومن ثم تعتبر تعديلات أو استبدالات الحمض الأميني الموصوفة في الوثيقة الحالية تحسن من ثبات جميع بولي ببتيدات ومركبات ربط C5 كما تم وصفها في الوثيقة الحالية وفي الطلب الدولي ١٢٦٠٠٦/٢٠١٣.

٥ قائمة التتابع:

"أ" mAU

"ب" ٥٠ دقيقة

## عناصر الحماية

١. بولي ببتيد polypeptide قادر على ربط مكون مكمل بشري human complement component 5 (C5)، حيث يتم اختيار البولي ببتيد polypeptide المذكور من:

(أ) بولي ببتيد polypeptide يشتمل على متوالية الحمض الأميني amino acid sequence

[*BM*]-[L2]-QSX$_{42}$X$_{43}$LLX$_{46}$EAKKLX$_{52}$X$_{53}$X$_{54}$Q

حيث يكون كل من ما يلي مستقل عن الآخر،

[*BM*] هي حافز ربط binding motif C5؛

[L2] يتم اختيارها من دي دي بي إس DDPS و آر كيو بي إي RQPE؛

X$_{42}$ يتم اختيارها من A و S؛

X$_{43}$ يتم اختيارها من N و E؛

X$_{46}$ يتم اختيارها من A، S و C؛

X$_{52}$ يتم اختيارها من E، N و S؛

X$_{53}$ يتم اختيارها من D، E و S، بشرط ألا تكون X$_{53}$ هي D حين تكون X$_{52}$ هي N؛ و

X$_{54}$ يتم اختيارها من A و S ؛ و

(ب) بولي ببتيد polypeptide مشابه بنسبة ٨٩٪ على الأقل لمتوالية الحمض الأميني amino acid sequence للبولي ببتيد polypeptide الخاص بـ (أ)، بشرط ألا تكون X$_{53}$ هي D حين تكون X$_{52}$ هي N.

٢. البولي ببتيد polypeptide طبقا لعنصر الحماية ١، حيث يتم اختيار البولي ببتيد polypeptide المذكور من:

(أ) بولي ببتيد polypeptide يشتمل على متوالية الحمض الأميني amino acid sequence

AEAKYAK-[*BM*]-[L2]-QSX$_{42}$X$_{43}$LLX$_{46}$EAKKLX$_{52}$X$_{53}$X$_{54}$QAP

حيث، كل منها مستقل عن الآخر،

حافز ربط binding motif [BM]، [L2]، X$_{42}$، X$_{43}$، X$_{46}$، X$_{52}$ ، X$_{53}$ و X$_{54}$ هي كما تم تعريفها في عنصر الحماية ١؛ و

(ب) بولي ببتيد polypeptide مشابه بنسبة ٩٠٪ على الاقل لمتوالية الحمض الأميني amino acid sequence للبولي ببتيد polypeptide الخاص بـ (أ)، بشرط ألا تكون $X_{53}$ هي عن D حين تكون $X_{52}$ هي N.

٣- البولي ببتيد polypeptide طبقا لعنصر الحماية ١ أو ٢، حيث يتم اختيار $X_{52}$ و$X_{53}$ بشكل مستقل من E و S؛

$X_{52}$ هي S و$X_{53}$ هي E؛

$X_{52}$ هي E و $X_{53}$ هي S؛

$X_{52}$ هي S و $X_{53}$ هي D أو

$X_{52}$ هي N وتكون $X_{53}$ هي E.

٤- البولي ببتيد polypeptide طبقاً لأي من عناصر الحماية ١ إلى ٣، حيث يكون حافز ربط binding motif عبارة عن بولي ببتيد polypeptide يتم اختياره من بين:

(أ) بولي ببتيد polypeptide يشتمل على متوالية الحمض الأميني amino acid sequence

$EX_9X_{10}X_{11}A\ X_{13}X_{14}EIDX_{18}LPNLX_{23}X_{24}X_{25}QWX_{28}AFIX_{32}X_{33}LX_{35}$؛

حيث، كل منها مستقل عن الآخر،

$X_9$ يتم اختيارها من H، Q، S، T و V؛

$X_{10}$ يتم اختيارها من I، L، M و V؛

$X_{11}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، K، L، N ، Q، R، S، T و Y؛

$X_{13}$ يتم اختيارها من N و W؛

$X_{14}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، N، Q، R، S و T؛

$X_{18}$ يتم اختيارها من A، E، G، H، K، L، Q، R، S، T و Y؛

$X_{23}$ يتم اختيارها من N و T؛

$X_{24}$ يتم اختيارها من I، L و V؛

$X_{25}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، K، N، Q، R، S و T؛

$X_{28}$ يتم اختيارها من I، L و V؛

$X_{32}$ يتم اختيارها من D، E، G، H، N، S وT؛

$X_{33}$ يتم اختيارها من K وS؛

$X_{35}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، N، Q، S، T وY؛ و

(ب) بولي ببتيد polypeptide مشابه بنسبة ٨٥٪ على الأقل لمتوالية الحمض الأميني amino acid sequence للبولي ببتيد polypeptide الخاص بـ (أ).

٥- البولي ببتيد polypeptide طبقاً لأي من عناصر الحماية ١ إلى ٤ حيث يتم اختياره من بين:

(أ) بولي ببتيد polypeptide يشتمل على متوالية الحمض الأميني amino acid sequence

AEAKYAKE$X_9X_{10}X_{11}AX_{13}X_{14}EIDX_{18}LPNLX_{23}X_{24}X_{25}QWX_{28}AFIX_{32}X_{33}LX_3$

$_5$-[L2]-$QSX_{42}X_{43}LLX_{46}EAKKLX_{52}X_{53}X_{54}QAP$؛

حيث، كل منها مستقل عن الآخر،

$X_9$ يتم اختيارها من H، Q، S، T وV؛

$X_{10}$ يتم اختيارها منI، L، M وV؛

$X_{11}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، K، L، N ، Q، R، S، T وY؛

$X_{13}$ يتم اختيارها من N وW؛

$X_{14}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، N، Q، R، S وT؛

$X_{18}$ يتم اختيارها منA، E، G، H، K، L، Q، R، S، T وY؛

$X_{23}$ يتم اختيارها من N وT؛

$X_{24}$ يتم اختيارها من I، L وV؛

$X_{25}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، K، N، Q، R، S وT؛

$X_{28}$ يتم اختيارها من I، L وV؛

$X_{32}$ يتم اختيارها من D، E، G، H، N، S وT؛

$X_{33}$ يتم اختيارها من K وS؛

$X_{35}$ يتم اختيارها من A، D، E، H، N، Q، S، T وY؛ و

[L2] يتم اختيارها من DDPS وRQPE؛

$X_{42}$ يتم اختيارها من A و S؛

$X_{43}$ يتم اختيارها من N وE؛

$X_{46}$ يتم اختيارها منA، S وC؛

$X_{52}$ يتم اختيارها منE، N وS؛

$X_{53}$ يتم اختيارها منD، E وS، بشرط ألا تكون $X_{53}$ هي حين تكون $X_{52}$ هي N؛ و

$X_{54}$ يتم اختيارها من A وS؛ و

(ب) بولي ببتيد polypeptide مشابه بنسبة ٩٠٪ على الأقل لمتوالية الحمض الأميني amino acid sequence للبولي ببتيد polypeptide الخاص بـ (أ)، بشرط ألا تكون $X_{53}$ هي D حين تكون $X_{52}$ هي N.

٦- البولي ببتيد polypeptide طبقا لعنصر الحماية ٤ أو ٥، حيث يتم تحقيق واحد على الأقل من الشروط التالية:

$X_9$ هي V،

$X_{10}$ هي L،

$X_{11}$ هي E،

$X_{13}$ هي W،

$X_{14}$ هي D،

$X_{18}$ هي R،

$X_{23}$ هي T،

$X_{24}$ هي I،

$X_{25}$ هي E،

$X_{28}$ هي L،

$X_{32}$ هي N،

$X_{33}$ هي K،

$X_{35}$ هي D،

[L2] هي DDPS،

$X_{42}$ هي S،

$X_{43}$ هي E،

$X_{46}$ هي S،

$X_{54}$ هي S.

٧- البولي ببتيد polypeptide طبقاً لأي من عناصر الحماية ١ إلى ٦، حيث يشتمل حافز ربط binding motif على متوالية حمض أميني amino acid sequence يتم اختيارها من المجموعة المكونة من المواضع ١- ٢٨ في المتواليات بأرقام: ١- ٢٤٨، ويفضل أن يشتمل حافز ربط binding motif على متوالية الحمض الأميني amino acid sequence الموضحة في المواضع ١-٢٨ في المتوالية رقم ١.

٨- البولي ببتيد polypeptide طبقاً لأي من عناصر الحماية ١ إلى ٧، حيث يتم اختياره من بولي ببتيد polypeptide يشتمل على متوالية الحمض الأميني amino acid sequence التي تظهر في صورة المتوالية برقم هوية: ٢٦٠، المتوالية برقم هوية: ٢٦٥، المتوالية برقم هوية: ٢٦٦، أو المتوالية برقم هوية: ٢٦٧.

٩- مركب قادر على ربط C5، حيث يشتمل المركب المذكور على:

أ. بولي ببتيد رابط polypeptide binding لـC5 واحد على الأقل طبقاً لأي من عناصر الحماية السابقة؛

ب. نطاق ربط ألبومين albumin binding domain للبروتين العقدي streptococcal protein G واحد على الأقل؛ و

ج. اختيارياً، شق رابط linking moiety لربط الألبومين albumin الواحد على الأقل المذكور أو أحد مشتقاته بالطرف C أو N لبولي ببتيد ربط C5 binding polypeptide الواحد على الأقل المذكور، يفضل أن يكون جزء الربط المذكور عبارة عن ببتيد peptide يشتمل على متوالية حمض أميني amino acid sequence KVX60GS، حيث يتم اختيار X60 من D وE و A.

١٠- المركب طبقاً لعنصر الحماية ٩، حيث تكون $X_{60}$ عبارة عن E، ويكون المركب المذكور عبارة عن بولي ببتيد polypeptide يشتمل على متوالية الحمض الأميني amino acid sequence التي تظهر في صورة المتوالية برقم هوية: ٢٦١، المتوالية برقم هوية: ٢٦٣، المتوالية برقم هوية: ٢٦٤، المتوالية برقم هوية: ٢٦٩ أو المتوالية برقم هوية: ٢٧٠.

١١- المركب طبقاً لعنصر الحماية ٩، حيث تكون $X_{60}$ هي A ويكون المركب عبارة عن بولي ببتيد polypeptide يشتمل على متوالية الحمض الأميني amino acid sequence التي تظهر في صورة المتوالية برقم هوية: ٢٦٢.

١٢- بولي ببتيد ربط C5 binding polypeptide طبقاً لأي من عناصر الحماية ١-٨ أو مركب ربط C5 binding compound طبقاً لأي من عناصر الحماية ٩-١١ لاستخدامه في العلاج.

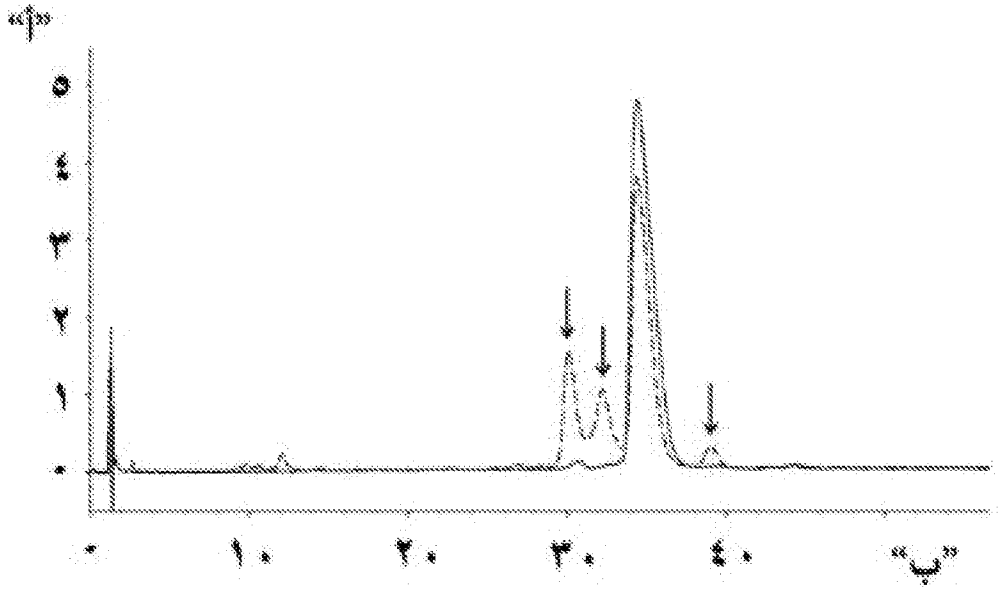
١٣- بولي ببتيد ربط C5 binding polypeptide طبقاً لأي من عناصر الحماية ١-٨ أو مركب ربط C5 binding compound طبقاً لأي من عناصر الحماية ٩-١١ لاستخدامه في طريقة لعلاج و/ أو الوقاية من حالة مرتبطة بـC5.

١٤- بولي ببتيد ربط C5 binding polypeptide أو مركب ربط C5 binding compound لاستخدامه طبقا لعنصر الحماية ١٣، حيث تكون الحالة المرتبطة بـC5 المذكورة عبارة عن حالة يتم اختيارها من الأمراض الالتهابية inflammatory diseases؛ أمراض المناعة الذاتية autoimmune diseases؛ الأمراض المعدية infectious diseases؛ أمراض قلبية وعائية cardiovascular diseases؛ اضطرابات تنكسية عصبية neurodegenerative disorders؛ إصابة الطعم graft injury؛ أمراض العين eye diseases؛ أمراض الكلى kidney diseases؛ أمراض الرئة pulmonary diseases؛ أمراض الدم haematological

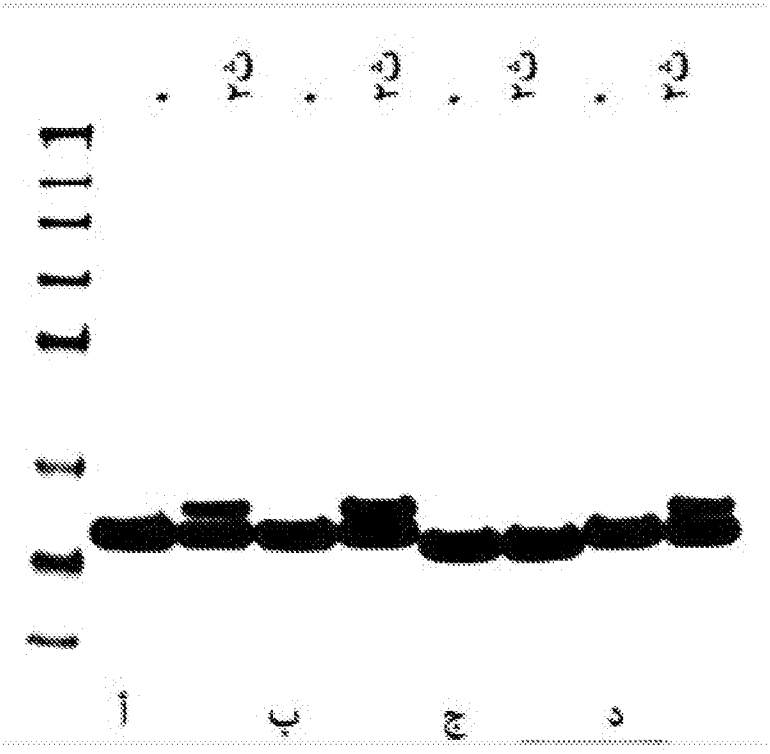
diseases مثـل بِيلَـة هيمُوجلُوبينِيَّـةَ لِيلِيَّـة انْتِيابِيَّـة paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)؛ و الأمراض الجلدية dermatological diseases.

١٥- بولي ببتيد ربط C5 binding polypeptide أو مركب ربط C5 binding compound لاستخدامه طبقاً لأي من عناصر الحماية ١٢- ١٤ حيث يتم إعطاء البولي ببتيد polypeptide الرابط لـC5 أو المركب المذكور في الوريد intravenously، تحت الجلد subcutaneously، بالاستنشاق inhalation، عن طريق الأنف nasally، عن طريق الفم orally، داخل الجسم الزجاجي intravitreally، أو موضعياً.

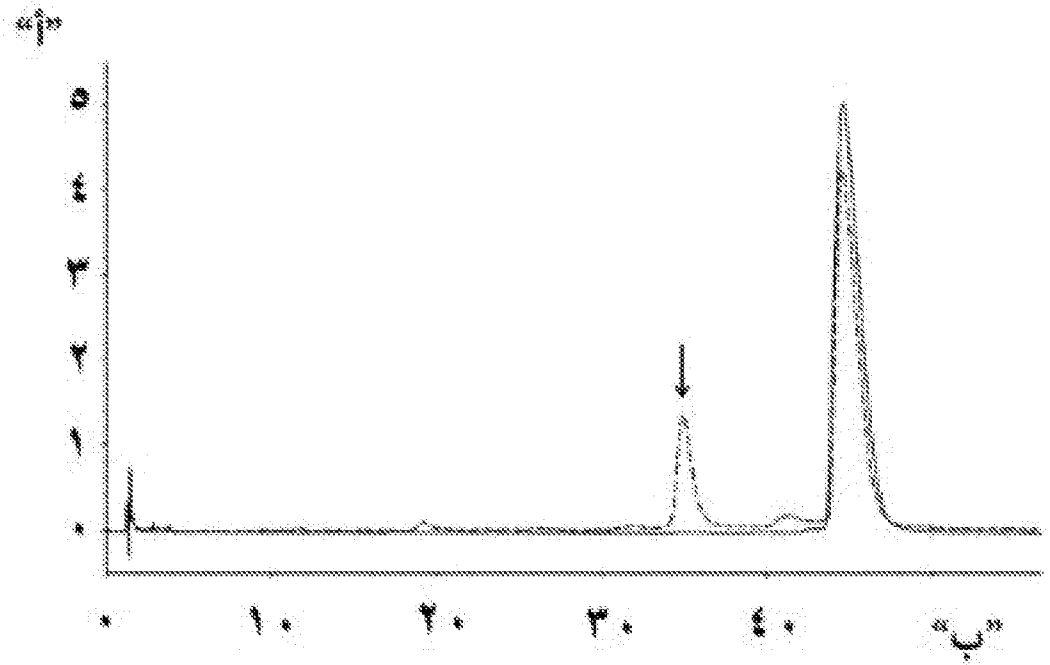
شكل ١



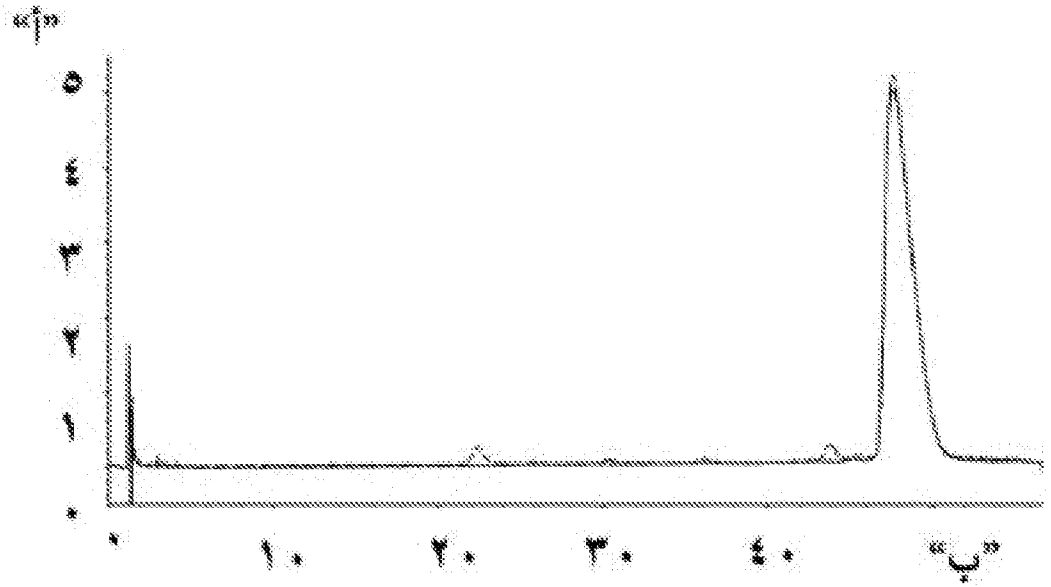

شكل ٢



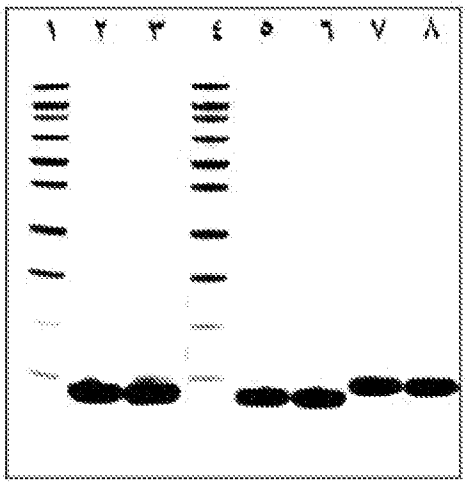

شكل ٣



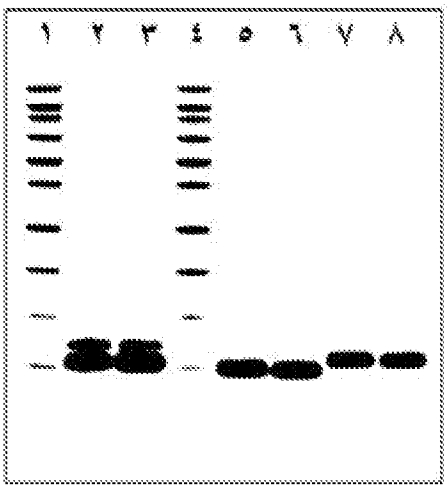

شكل ٤



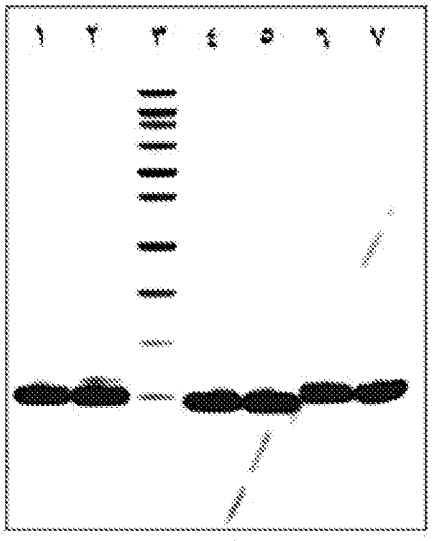

شكل ٥



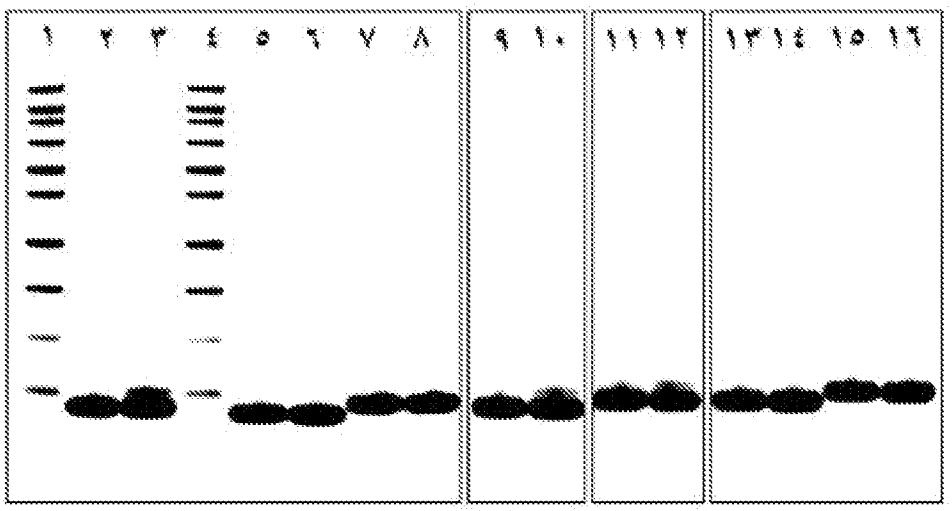

شكل ٦ب




شكل ٦أ




شكل ٦جـ




شكل ٦ د

**مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب**

وذلك بشرط تسديد المقابل المالي السنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية

صادرة عن
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية ، مكتب البراءات السعودي
ص ب ٦٠٨٦ ، الرياض ١١٤٤٢ ، المملكة العربية السعودية
بريد الكتروني: patents@kacst.edu.sa