(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **1-0029265**

(51)[7] **C07K 16/36**; C12N 1/19; C12P 21/08; C12N 15/02; C12N 5/10; C12N 1/15; C12N 1/21

(13) **B**

(21) 1-2017-02765 (22) 18/12/2015
(86) PCT/JP2015/006321 18/12/2015 (87) WO/2016/098356 23/06/2016
(30) 2014-257647 19/12/2014 JP
(45) 25/08/2021 401 (43) 27/11/2017 356A
(73) CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (JP)
5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 1158543 (JP)
(72) RUIKE, Yoshinao (SG); SAMPEI, Zenjiro (SG).
(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP GẮN KẾT VỚI C5 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng C5 và các phương pháp sử dụng chúng. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế gắn kết với epitop trong chuỗi beta của C5 có ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit. Sáng chế còn đề cập đến các axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể kháng C5 theo sáng chế. Sáng chế còn đề cập đến các tế bào chủ bao gồm axit nucleic theo sáng chế. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế để kháng thể được sản xuất. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể kháng C5 bao gồm việc miễn dịch động vật chống lại polypeptit bao gồm miền MG1-MG2 của chuỗi beta của C5. Các kháng thể kháng C5 theo sáng chế có thể được sử dụng như dược phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng C5 và các phương pháp sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hệ bổ thể đóng một vai trò quan trọng trong việc giải phóng các phức hợp miễn dịch và đáp ứng miễn dịch với các tác nhân gây bệnh, các kháng nguyên lạ, các tế bào nhiễm virut và các tế bào u. Có khoảng 25-30 protein bổ trợ được tìm thấy như là một loạt các phức hợp của các protein huyết tương và các màng tế bào. Các thành phần bổ thể có các chức năng phòng vệ miễn dịch bằng cách tương tác một loạt sự phân tách enzym phức tạp và các trường hợp liên kết màng tế bào. Các đợt bổ thể này dẫn đến việc sản xuất các sản phẩm có opsonin, lập quy miễn dịch, và các chức năng làm thủng màng tế bào.

Hiện nay người ta đã thừa nhận rằng hệ bổ thể có thể được hoạt hóa qua ba chuỗi các phản ứng hóa sinh riêng biệt: chuỗi các phản ứng hóa sinh cổ điển, chuỗi các phản ứng hóa sinh lextin, và chuỗi các phản ứng hóa sinh thay thế. Các chuỗi các phản ứng hóa sinh này được hưởng nhiều thành phần, và trong khi các chuỗi này khác biệt ở các bước ban đầu, các bước này hội tụ và chia sẻ các thành phần bổ thể tận cùng (C5 đến C9) gây ra việc hoạt hóa và phá hủy các tế bào đích.

Chuỗi các phản ứng hóa sinh cổ điển thường được hoạt hóa bằng cách hình thành các phức hợp kháng thể-kháng nguyên. Bước thứ nhất trong sự hoạt hóa của chuỗi các phản ứng hóa sinh lextin là sự gắn kết của các lectin riêng biệt như lectin gắn kết mannan (MBL), H-ficolin, M-ficolin, L-ficolin và CL-11 lectin lớp C. Ngược lại, chuỗi các phản ứng hóa sinh thay thế tự động trải qua sự hoạt hóa thay thế mức độ thấp, có thể dễ dàng khuếch đại lên các bề mặt lạ hoặc bất thường khác (vi khuẩn, nấm men, các tế bào nhiễm virut, hoặc mô bị hỏng).

Các chuỗi các phản ứng hóa sinh này hội tụ tại một điểm nơi mà thành phần bổ thể C3 bị chia tách bởi proteaza hoạt tính để tạo ra C3a và C3b.

C3a là anaphylatoxin. C3b liên kết với các tế bào vi khuẩn và các tế bào khác, cũng như các virut đã biết và các phức hợp miễn dịch, và đánh dấu chúng để loại bỏ khỏi sự lưu thông (đóng vai trò như opsonin). C3b còn hình thành một phức hợp với các thành phần khác để tạo ra convertaza C5, trong đó tách C5 thành C5a và C5b.

C5 là protein 190 kDa được tìm thấy trong huyết thanh bình thường vào khoảng 80 microgam/ml (0,4 micro M). C5 được glycosylat hóa với khoảng 1,5-3% khối lượng của nó do hydratcacbon. C5 trưởng thành là heterodime của chuỗi 115 kDa alpha mà được liên kết disulfua tới chuỗi 75 kDa beta. C5 được tổng hợp như protein tiền thân chuỗi đơn (tiền thân pro-C5) của các axit amin 1676 (tham khảo, tức là, PTL1 và PTL2). Tiền thân pro-C5 được tách để tạo ra chuỗi beta như đoạn đầu amino và chuỗi alpha như đoạn đầu carboxyl. Các đoạn chuỗi alpha và các đoạn chuỗi beta polypeptit được nối với nhau thông qua liên kết disulfua và tạo thành protein C5trưởng thành.

C5 trưởng thành được tách thành các đoạn C5a và C5b trong suốt quá trình hoạt hóa của chuỗi các phản ứng hóa sinh bổ trợ. C5a được tách từ chuỗi alpha của C5 bởi convertaza C5 như đoạn đầu amino chứa các axit amin 74 đầu tiên của chuỗi alpha. Phần còn lại của C5 trưởng thành là đoạn C5b, chứa phần còn lại của disulfua chuỗi alpha được liên kết với chuỗi beta. Khoảng 20% của 11 kDa khối lượng của C5a là do hydratcacbon.

C5a là anaphylatoxin khác. C5b kết hợp với C6, C7, C8 và C9 để tạo thành phức tấn công màng (MAC, C5b-9, phức bổ trợ đầu mút (TCC)) tại bề mặt của tế bào đích. Khi đủ số lượng MAC được chèn vào các màng tế bào đích, các lỗ MAC được hình thành để làm trung gian phân giải thẩm lọc nhanh chóng các tế bào đích.

Như được đề cập trên đây, C3a và C5a là các anaphylatoxin. Chúng có thể hoạt hóa sự khử hạt tế bào lớn, giải phóng histamin và các chất trung gian khác của sự viêm, dẫn đến sự co cơ trơn, tăng thẩm thấu mạch, hoạt hóa bạch cầu, và các hiện tượng viêm khác bao gồm tăng sinh tế bào dẫn đến tăng tế bào. C5a cũng có chức năng như peptit hóa trị liệu để thu hút các bạch cầu hạt như các bạch cầu trung hòa, các bạch cầu ái toan, các tế bào đã nhuộm màu và các bạch cầu đơn nhân đến vị trí hoạt hóa bổ trợ.

Hoạt động của C5a được điều chỉnh bởi carboxypeptidaza huyết tương enzym N mà loại bỏ arginin đầu carboxy từ C5a tạo ra dẫn xuất C5a-des-Arg. C5a-des-Arg chỉ cho 1% hoát tính mẫn cảm và hoạt tính hóa học đa hình hạt nhân của C5a không biến đổi.

Mặc dù hệ bổ thể chức thích hợp cung cấp khả năng phòng vệ mạnh mẽ chống lại các sự viêm lây nhiễm virut, việc điều chỉnh không thích hợp hoặc sự hoạt hóa bổ trợ có liên quan trong sự phát sinh bệnh của nhiều rối loạn khác nhau bao gồm, tức là, viêm khớp dạng thấp (RA); viêm thận lupus; chấn thương thiếu máu cục bộ; chứng rối loạn máu rối loạn tuần hoàn (PNH); hội chứng u huyết ứ huyết không điển hình (aHUS); bệnh trầm tích dầy đặc (DDD); thoái hóa điểm vàng (tức là, thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi tác (AMD)); phân hủy, tăng men gan, và hội chứng tiểu cầu thấp (HELLP); ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP); mất thai tự nhiên; viêm mạch tụ miễn dịch; bệnh hiếm gặp; mất thai tái phát; đa xơ cứng (MS); trấn thương sọ não; và chấn thương do nhồi máu cơ tim, phế quản phổi và thẩm tách máu (tham khảo, tức là, NPL1). Vì vậy, sự ức chế hoạt hóa quá nhiều hoặc không kiểm soát của chuỗi bổ trợ có thể cho các lợi ích lâm sàng cho bệnh nhân có các rối loạn như vậy.

Chứng rối loạn máu rối loạn tuần hoàn (PNH) là rối loạn máu hiếm thấy, trong đó các tế bào hồng cầu bị tổn thương và do đó bị tiêu diệt nhanh hơn so với các tế bào hồng cầu bình thường. PNH là kết quả của việc mở rộng vô tính của các tế bào gốc tạo máu với những đột biến xôma trong gen PIG-A (phosphatidylinositol glycan nhóm A) nằm trên nhiễm sắc thể X. Các đột biến

trong PIG-A dẫn đến một khối sớm trong việc tổng hợp glycosylphosphatidylinositol (GPI), một phân tử được yêu cầu nương tựa của nhiều protein vào các bề mặt tế bào. Do đó, các tế bào máu PNH thiếu các protein nương tựa GPI, bao gồm các protein điều hòa bổ trợ CD55 và CD59. Trong điều kiện bình thường, các protein điều hòa bổ trợ này ngăn chặn sự hình thành MAC trên các bề mặt tế bào, do đó ngăn ngừa sự phân tách hồng cầu. Sự vắng mặt của các protein nương tựa GPI gây ra sự tan huyết phân thông qua bổ trợ ở PNH.

PNH đặc trưng bởi chứng thiếu máu do tan huyết (giảm số lượng tế bào hồng cầu), hemoglobin niệu (sự hiện diện của hemoglobin trong nước tiểu, đặc biệt rõ ràng sau khi ngủ), và hemoglobinemia (sự hiện diện của hemoglobin trong máu). Các bệnh nhân mắc PNH được biết đến là có các cơn bộc phát, được định nghĩa ở đây như trường hợp nước tiểu sẫm màu. Chứng thiếu máu do tan huyết là do sự hủy hoại các tế bào hồng cầu trong mạch máu bởi các thành phần bổ trợ. Các triệu chứng khác bao gồm chứng khó đọc, mệt mỏi, rối loạn chức năng cương dương, chứng huyết khối và đau bụng tái phát.

Eculizumab là kháng thể đơn dòng được tương thích với người trực tiếp chống lại protein bổ trợ C5, và là liệu pháp điều trị đầu tiên được chấp thuận để điều trị chứng rối loạn máu rối loạn tuần hoàn (PNH) và hội chứng u huyết ứ huyết không điển hình (aHUS) (tham khảo, tức là, NPL2). Eculizumab ức chế sự phân tách của C5 thành C5a và C5b bởi convertaza C5, ngăn ngừa sự hình thành phức bổ trợ đầu mút C5b-9. Cả C5a và C5b-9 dẫn đến các sự kiện trung gian bổ trợ đầu mút là đặc trưng của PNH và aHUS (tham khảo thêm, PTL3, PTL4, PTL5, và PTL6).

Một số báo cáo đã mô tả các kháng thể kháng C5. Ví dụ, WO 95/29697 (PTL7) mô tả kháng thể kháng C5 mà gắn kết với chuỗi alpha của C5 nhưng không gắn kết với C5a, và ngăn chặn sự hoạt hóa của C5, trong khi WO 2002/30985 (PTL8) mô tả kháng thể đơn dòng kháng C5 ức chế sự hình thành C5a. Mặt khác, WO 2004/007553 (PTL9) mô tả kháng thể kháng C5 nhận diện

vị trí proteolytic để convertaza C5 trên chuỗi alpha của C5, và ức chế sự chuyển đổi của C5 thành C5a và C5b. WO 2010/015608 (PTL10) mô tả kháng thể kháng C5 có hằng số ái lực ít nhất là 1 x10^7 M^{-1}.

Các kháng thể (các IgG) gắn kết với thụ thể Fc ở trẻ sơ sinh (FcRn), và có thời gian duy trì huyết tương dài. Sự gắn kết của các IgG tới FcRn thường được quan sát dưới các điều kiện axit (tức là, pH 6,0), và hiếm khi được quan sát dưới các điều kiện trung hòa (tức là, pH=7,4). Thông thường, các IgG không kết hợp không đặc hiệu vào các tế bào qua quá trình nội nhập bào, và trở lại các bề mặt tế bào bằng cách gắn kết với cơ quan nội bào FcRn dưới các điều kiện axit trong các hạt cơ quan nội bào. Sau đó, các IgG tách ra khỏi FcRn dưới các điều kiện trung hòa trong huyết tương. Các IgG không gắn kết với FcRn bị phân hủy trong tiêu thể. Khi khả năng gắn kết FcRn của IgG dưới các điều kiện axit được loại bỏ bằng cách đưa các đột biến vào vùng Fc, IgG không được tái sử dụng từ hạt cơ quan nội bào vào huyết tương, dẫn đến sự suy giảm đáng kể sự duy trì huyết tương của IgG. Để cải thiện sự duy trì huyết tương của các IgG, một phương pháp tăng cường sự gắn kết FcRn dưới các điều kiện axit đã được đưa ra. Khi sự gắn kết FcRn của IgG dưới các điều kiện axit được cải thiện bằng cách đưa sự thế axit amin vào Fc vùng, IgG được tái chế hiệu quả hơn từ hạt cơ quan nội bào vào huyết tương, và do đó cho thấy sự duy trì huyết tương được cải thiện. Trong khi đó, cũng được đưa ra rằng IgG với sự gắn kết FcRn được cải thiện dưới các điều kiện trung hòa không tách ra khỏi FcRn dưới các điều kiện trung hòa trong huyết tương ngay cả khi trở lại bề mặt tế bào qua sự gắn kết với FcRn dưới các điều kiện axit trong các hạt cơ quan nội bào, và do đó sự duy trì huyết tương vẫn không thay đổi, hoặc đúng hơn là tồi tệ hơn (tham khảo, tức là, NPL3; NPL4; NPL5).

Hiện nay, các kháng thể mà gắn kết với các kháng nguyên theo cách phụ thuộc vào pH đã được đưa ra (tham khảo, tức là, PTL11 và PTL12). Các kháng thể này gắn kết mạnh mẽ với các kháng nguyên dưới các điều kiện trung hòa huyết tương và tách ra khỏi các kháng nguyên dưới các điều kiện axit cơ quan

nội bào. Sau khi tách khỏi các kháng nguyên, các kháng thể trở trên có khả năng gắn kết một lần nữa tới các kháng nguyên khi tái sử dụng vào huyết tương qua FcRn. Vì vậy, một phân tử kháng thể duy nhất có thể gắn kết nhiều lần với nhiều phân tử kháng nguyên. Nói chung, sự duy trì huyết tương của kháng thể ngắn hơn nhiều so với kháng thể mà có cơ chế tái chế trung gian FcRn nêu trên. Do đó, khi kháng nguyên được gắn kết vào kháng thể, kháng nguyên thường cho thấy sự duy trì huyết tương được kéo dài, dẫn đến việc tăng nồng độ huyết tương của kháng nguyên. Mặt khác, cũng có báo cáo rằng các kháng thể được mô tả trên đây, gắn kết với các kháng nguyên theo cách phụ thuộc vào pH, loại bỏ các kháng nguyên khỏi huyết tương nhanh hơn sô với các kháng thể điển hình vì chúng tách ra khỏi các kháng nguyên trong các hạt cơ quan nội bào trong suốt quá trình tái chế trung gian FcRn. WO 2011/111007 (PTL13) còn mô tả phân tích mô hình máy tính cho thấy rằng kháng thể có sự liên kết phụ thuộc pH chống lại C5 có thể kéo dài sự loại bỏ kháng nguyên.

Các tài liệu sáng chế

PTL1: US Patent No. 6,355,245

PTL2: US Patent No. 7,432,356

PTL3: WO 2005/074607

PTL4: WO 2007/106585

PTL5: WO 2008/069889

PTL6: WO 2010/054403

PTL7: WO 95/29697

PTL8: WO 2002/30985

PTL9: WO 2004/007553

PTL10: WO 2010/015608

PTL11: WO 2009/125825

PTL12: WO 2011/122011

PTL13: WO 2011/111007

Tài liệu khác

NPL1: Holers et al., Immunol. Rev. 223:300-316 (2008)

NPL2: Dmytrijuk et al., The Oncologist 13(9):993-1000 (2008)

NPL3: Yeung et al., J Immunol. 182(12): 7663-7671 (2009)

NPL4: Datta-Mannan et al., J Biol. Chem. 282(3):1709-1717 (2007)

NPL5: Dall'Acqua et al., J. Immunol. 169(9):5171-5180 (2002)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế cung cấp các kháng thể kháng C5 và các phương pháp sử dụng các kháng thể này.

Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế gắn kết với epitop trong chuỗi beta của C5. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế gắn kết với epitop trong miền MG1-MG2 của chuỗi beta của C5. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế gắn kết với epitop trong đoạn bao gồm các axit amin 33-124 của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế gắn kết với epitop trong chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5 mà bao gồm ít nhất một đoạn được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin 47-57, 70-76, và 107-110, Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế gắn kết với epitop trong đoạn của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5 mà bao gồm ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109, và His110 của SEQ ID NO: 40, theo một phương án khác nữa, kháng thể gắn kết với C5 có ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit. Theo một phương án khác nữa, kháng thể gắn kết với C5 có ái lực cao hơn ở pH=7,4 so với ở pH=5,8. Theo một phương án khác, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế gắn kết với cùng một epitop là kháng thể mô tả trong bảng 2. Theo một phương án khác nữa, kháng thể gắn kết với cùng một epitop là kháng thể mô tả trong bảng 2 có ái lực cao hơn ở pH=7,4 so với ở pH=5,8. Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 theo sáng chế gắn kết với cùng một epitop là kháng thể được mô tả

trong các bảng 7 hoặc 8. Theo một phương án khác nữa, kháng thể gắn kết với cùng một epitop là kháng thể được mô tả trong các bảng 7 hoặc 8 có ái lực cao hơn ở pH=7,4 so với ở pH=5,8.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm một cặp VH và VL được chọn từ: (a) VH của SEQ ID NO:1 và VL của SEQ ID NO:11; (b) VH của SEQ ID NO: 5 và VL của SEQ ID NO:15; (c) VH của SEQ ID NO:4 và VL của SEQ ID NO:14; (d) VH của SEQ ID NO: 6 và VL của SEQ ID NO: 16; (e) VH của SEQ ID NO:2 và VL của SEQ ID NO:12; (f) VH của SEQ ID NO: 3 và VL của SEQ ID NO: 13; (g) VH của SEQ ID NO:9 và VL của SEQ ID NO:19; (h) VH của SEQ ID NO:7 và VL của SEQ ID NO: 17; (i) aVH của SEQ ID NO:8 và VL của SEQ ID NO:18; và (j) VH của SEQ ID NO:10 và VL của SEQ ID NO:20, Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 có ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit. Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 có ái lực cao hơn ở pH=7,4 so với ở pH=5,8.

Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế có đặc tính được chọn từ nhóm bao gồm: (a) kháng thể tiếp xúc với các axit amin D51 và K109 của C5 (SEQ ID NO:39); (b) ái lực của kháng thể đối với C5 (SEQ ID NO:39) là lớn hơn so với ái lực của kháng thể đối với đột biến C5 bao gồm việc thế E48A của SEQ ID NO:39; hoặc (c) kháng thể gắn kết với protein C5 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39 ở pH=7,4, nhưng không gắn kết với protein C5 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39 với việc thế H72Y ở pH=7,4. Theo một phương án khác nữa, kháng thể gắn kết với C5 có ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit. Theo một phương án khác nữa, kháng thể gắn kết với C5 có ái lực cao hơn ở pH=7,4 so với ở pH=5,8.

Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế ức chế sự hoạt hóa của C5. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế ức chế sự hoạt hóa của R885H biến thể C5. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế là kháng thể đơn

dòng. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế là kháng thể ở người, được làm tương thích với người hoặc dạng khảm. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế là đoạn kháng thể gắn với C5. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế là kháng thể IgG1 hoặc IgG4 có độ dài đầy đủ.

Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế bao gồm (a) HVR-H3 chứa trình tự axit amin $DX_1GYX_2X_3PTHAMX_4X_5$, trong đó X_1 là G hoặc A, X_2 là V, Q hoặc D, X_3 là T hoặc Y, X_4 là Y hoặc H, X_5 là L hoặc Y (SEQ ID NO: 128), (b) HVR-L3 chứa trình tự axit amin $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, trong đó X_1 là S, C, N hoặc T, X_2 là F hoặc K, X_3 là A, T hoặc H (SEQ ID NO: 131), và (c) HVR-H2 chứa trình tự axit amin $X_1IX_2TGSGAX_3YX_4AX_5WX_6KG$, trong đó X_1 là C, A hoặc G, X_2 là Y hoặc F, X_3 là T, D hoặc E, X_4 là Y, K hoặc Q, X_5 là S, D hoặc E, X_6 là A hoặc V (SEQ ID NO: 127).

Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin $SSYYX_1X_2$, trong đó X_1 là M hoặc V, X_2 là C hoặc A (SEQ ID NO: 126), (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin $X_1IX_2TGSGAX_3YX_4AX_5WX_6KG$, trong đó X_1 là C, A hoặc G, X_2 là Y hoặc F, X_3 là T, D hoặc E, X_4 là Y, K hoặc Q, X_5 là S, D hoặc E, X_6 là A hoặc V (SEQ ID NO: 127), và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin $DX_1GYX_2X_3PTHAMX_4X_5$, trong đó X_1 là G hoặc A, X_2 là V, Q hoặc D, X_3 là T hoặc Y, X_4 là Y hoặc H, X_5 là L hoặc Y (SEQ ID NO: 128). Theo một phương án khác nữa, kháng thể bao gồm (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin $X_1ASQX_2IX_3SX_4LA$, trong đó X_1 là Q hoặc R, X_2 là N, Q hoặc G, X_3 là G hoặc S, X_4 là D, K hoặc S (SEQ ID NO: 129); (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin $GASX_1X_2X_3S$, trong đó X_1 là K, E hoặc T, X_2 là L hoặc T, X_3 là A, H, E hoặc Q (SEQ ID NO: 130); và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, trong đó X_1 là S, C, N hoặc T, X_2 là F hoặc K, X_3 là A, T hoặc H (SEQ ID NO: 131).

Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế bao gồm (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin $X_1ASQX_2IX_3SX_4LA$, trong đó X_1 là Q hoặc R, X_2 là N, Q hoặc G, X_3 là G hoặc S, X_4 là D, K hoặc S (SEQ ID NO: 129); (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin $GASX_1X_2X_3S$, trong đó X_1 là K, E hoặc T, X_2 là L hoặc T, X_3 là A, H, E hoặc Q (SEQ ID NO: 130); và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, trong đó X_1 là S, C, N hoặc T, X_2 là F hoặc K, X_3 là A, T hoặc H (SEQ ID NO: 131).

Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế bao gồm khuôn miền biến đổi chuỗi nặng FR1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 132-134; FR2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 135-136; FR3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 137-139; và FR4 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 140-141. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế bao gồm khuôn miền biến đổi chuỗi nhẹ FR1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 142-143; FR2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 144-145; FR3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 146-147; và FR4 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 148.

Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 được phân lập theo sáng chế bao gồm (a) trình tự VH có ít nhất 95% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 10, 106-110; (b) trình tự VL có ít nhất 95% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 20, 111-113; hoặc (c) trình tự VH như trong (a) và trình tự VL như trong (b). Theo một phương án khác nữa, kháng thể bao gồm trình tự VH của bất kỳ các SEQ ID NO: 10, 106-110, Theo một phương án khác nữa, kháng thể bao gồm trình tự VL của bất kỳ các SEQ ID NO: 20, 111-113.

Sáng chế cung cấp kháng thể bao gồm trình tự VH của bất kỳ các SEQ ID NO: 10, 106-110 và trình tự VL của bất kỳ các SEQ ID NO: 20, 111-113.

Sáng chế còn đề cập đến các axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể kháng C5 theo sáng chế. Sáng chế còn đề cập đến các tế bào chủ bao gồm axit nucleic theo sáng chế. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế để cung cấp kháng thể.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể kháng C5. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc miễn dịch động vật chống lại polypeptit bao gồm miền MG1-MG2 (SEQ ID NO: 43) của chuỗi beta của C5. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc miễn dịch động vật chống lại polypeptit bao gồm vùng tương ứng với các axit amin tại các vị trí 33 đến 124 của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc miễn dịch động vật chống lại polypeptit mà bao gồm ít nhất một đoạn được chọn từ các axit amin 47-57, 70-76, và 107-110 của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc miễn dịch động vật chống lại polypeptit bao gồm đoạn của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5, mà bao gồm ít nhất một axit amin được chọn từ Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109, và His110,

Sáng chế còn đề cập đến việc tạo công thức bao gồm kháng thể kháng C5 theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến:

1. kháng thể được phân lập gắn với C5, trong đó kháng thể gắn kết với epitop trong chuỗi beta của C5 có ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể có đặc tính được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) kháng thể tiếp xúc với các axit amin D51 và K109 của C5 (SEQ ID NO:39);

(b) ái lực của kháng thể đối với C5 (SEQ ID NO:39) là lớn hơn so với ái lực của kháng thể đối với đột biến C5 bao gồm việc thế E48A của SEQ ID NO:39; và

(c) kháng thể gắn kết với protein C5 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39 ở pH=7,4, nhưng không gắn kết với protein C5 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39 với việc thế H72Y ở pH=7,4.

3. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm một cặp VH và VL được chọn từ:

(a) VH của SEQ ID NO:1 và VL của SEQ ID NO:11;

(b) VH của SEQ ID NO: 5 và VL của SEQ ID NO:15;

(c) VH của SEQ ID NO:4 và VL của SEQ ID NO:14;

(d) VH của SEQ ID NO: 6 và VL của SEQ ID NO: 16;

(e) VH của SEQ ID NO:2 và VL của SEQ ID NO:12;

(f) VH của SEQ ID NO: 3 và VL của SEQ ID NO: 13;

(g) VH của SEQ ID NO:9 và VL của SEQ ID NO:19;

(h) VH của SEQ ID NO:7 và VL của SEQ ID NO: 17;

(i) VH của SEQ ID NO:8 và VL của SEQ ID NO:18; và

(j) VH của SEQ ID NO: 10 và VL của SEQ ID NO:20,

4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể gắn kết với epitop trong miền MG1-MG2 của chuỗi beta của C5.

5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể gắn kết với epitop trong đoạn bao gồm các axit amin 33-124 của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5.

6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể gắn kết với epitop trong chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5 mà bao gồm ít nhất một đoạn được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin 47-57, 70-76, và 107-110,

7. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể gắn kết với epitop trong đoạn của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5 mà bao gồm ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109, và His110,

8. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, mà gắn kết với cùng epitop là kháng thể được mô tả trong các bảng 2, 7 hoặc 8.

9. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, ức chế sự hoạt hóa của C5.

10. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, ức chế sự hoạt hóa của R885H biến thể C5.

11. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, là kháng thể đơn dòng.

12. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, là kháng thể ở người, được làm tương thích với người hoặc dạng khảm.

13. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, là đoạn kháng thể gắn với C5.

14. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó kháng thể bao gồm (a) HVR-H3 chứa trình tự axit amin $DX_1GYX_2X_3PTHAMX_4X_5$, trong đó X_1 là G hoặc A, X_2 là V, Q hoặc D, X_3 là T hoặc Y, X_4 là Y hoặc H, X_5 là L hoặc Y (SEQ ID NO: 128), (b) HVR-L3 chứa trình tự axit amin $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, trong đó X_1 là S, C, N hoặc T, X_2 là F hoặc K, X_3 là A, T hoặc H (SEQ ID NO: 131), và (c) HVR-H2 chứa trình tự axit amin $X_1IX_2TGSGAX_3YX_4AX_5WX_6KG$, trong đó X_1 là C, A hoặc G, X_2 là Y hoặc F, X_3 là T, D hoặc E, X_4 là Y, K hoặc Q, X_5 là S, D hoặc E, X_6 là A hoặc V (SEQ ID NO: 127).

15. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó kháng thể bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin $SSYYX_1X_2$, trong đó X_1 là M hoặc V, X_2 là C hoặc A (SEQ ID NO: 126), (b) HVR-H2 chứa trình tự axit

amin $X_1IX_2TGSGAX_3YX_4AX_5WX_6KG$, trong đó X_1 là C, A hoặc G, X_2 là Y hoặc F, X_3 là T, D hoặc E, X_4 là Y, K hoặc Q, X_5 là S, D hoặc E, X_6 là A hoặc V (SEQ ID NO: 127), và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin $DX_1GYX_2X_3PTHAMX_4X_5$, trong đó X_1 là G hoặc A, X_2 là V, Q hoặc D, X_3 là T hoặc Y, X_4 là Y hoặc H, X_5 là L hoặc Y (SEQ ID NO: 128).

16. Kháng thể theo điểm 15, còn chứa (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin $X_1ASQX_2IX_3SX_4LA$, trong đó X_1 là Q hoặc R, X_2 là N, Q hoặc G, X_3 là G hoặc S, X_4 là D, K hoặc S (SEQ ID NO: 129); (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin $GASX_1X_2X_3S$, trong đó X_1 là K, E hoặc T, X_2 là L hoặc T, X_3 là A, H, E hoặc Q (SEQ ID NO: 130); và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, trong đó X_1 là S, C, N hoặc T, X_2 là F hoặc K, X_3 là A, T hoặc H (SEQ ID NO: 131).

17. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, bao gồm (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin $X_1ASQX_2IX_3SX_4LA$, trong đó X_1 là Q hoặc R, X_2 là N, Q hoặc G, X_3 là G hoặc S, X_4 là D, K hoặc S (SEQ ID NO: 129); (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin $GASX_1X_2X_3S$, trong đó X_1 là K, E hoặc T, X_2 là L hoặc T, X_3 là A, H, E hoặc Q (SEQ ID NO: 130); và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, trong đó X_1 là S, C, N hoặc T, X_2 là F hoặc K, X_3 là A, T hoặc H (SEQ ID NO: 131).

18. Kháng thể theo điểm 15, còn chứa khuôn miền biến đổi chuỗi nặng FR1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 132-134; FR2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 135-136; FR3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 137-139; và FR4 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 140-141.

19. Kháng thể theo điểm 17, còn chứa khuôn miền biến đổi chuỗi nhẹ FR1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 142-143; FR2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 144-145; FR3 chứa trình tự axit amin của

bất kỳ các SEQ ID NO: 146-147; và FR4 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 148.

20. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, bao gồm (a) trình tự VH có ít nhất 95% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 10, 106-110; (b) trình tự VL có ít nhất 95% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 20, 111-113; hoặc (c) trình tự VH như trong (a) và trình tự VL như trong (b).

21. Kháng thể theo điểm 20, bao gồm trình tự VH của bất kỳ các SEQ ID NO: 10, 106-110,

22. Kháng thể theo điểm 20, bao gồm trình tự VL của bất kỳ các SEQ ID NO: 20, 111-113.

23. Kháng thể bao gồm trình tự VH của bất kỳ các SEQ ID NO: 10, 106-110 và trình tự VL của bất kỳ các SEQ ID NO: 20, 111-113.

24. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 23, là kháng thể IgG1 hoặc IgG4 có độ dài đầy đủ.

25. Axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24.

26. tế bào chủ chứa axit nucleic theo điểm 25.

27. Phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 26 để kháng thể được sản xuất.

28. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng C5 bao gồm việc miễn dịch động vật chống lại polypeptit, trong đó polypeptit bao gồm miền MG1-MG2 (SEQ ID NO: 43) của chuỗi beta của C5.

29. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng C5 bao gồm việc miễn dịch động vật chống lại polypeptit, trong đó polypeptit bao gồm vùng tương ứng với các axit amin tại các vị trí 33 đến 124 của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5.

30. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng C5 bao gồm việc miễn dịch động vật chống lại polypeptit, trong đó polypeptit bao gồm ít nhất một đoạn được chọn từ các axit amin 47-57, 70-76, và 107-110 của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5.

31. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng C5 bao gồm việc miễn dịch động vật chống lại polypeptit, trong đó polypeptit bao gồm đoạn của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5 mà bao gồm ít nhất một axit amin được chọn từ Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109, và His110,

32. Việc tạo công thức bao gồm kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24 và chất mang dược dụng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 minh họa việc gắn kết epitop của các kháng thể kháng C5, như mô tả trong ví dụ 2,2. Các kháng thể được tập hợp thành nhóm vào cùng một hộp epitop được đóng gói với một nét dài.

Fig. 2A minh họa ký hiệu cảm biến BIACORE (nhãn được đã đăng ký) của các kháng thể kháng C5 ở pH=7,4 (nét đậm) và pH=5,8 (nét đứt) để đánh giá độ phụ thuộc của pH, như mô tả trong ví dụ 3,2. CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, và CFA0599 là các kháng thể được tập hợp thành nhóm vào epitop C, như mô tả trong ví dụ 2,2.

Fig. 2B minh họa ký hiệu cảm biến BIACORE (nhãn được đã đăng ký) của các kháng thể kháng C5 ở pH=7,4 (nét đậm) và pH=5,8 (nét đứt) để đánh giá độ phụ thuộc của pH, như mô tả trong ví dụ 3,2. CFA0666, CFA0672, và CFA0675 là các kháng thể được tập hợp thành nhóm vào epitop C, và CFA0330 và CFA0341 là các kháng thể được tập hợp thành nhóm vào epitop B, như mô tả trong ví dụ 2,2. 305LO5 là kháng thể được làm tương thích với người của CFA0305, như mô tả trong ví dụ 2,3.

Fig. 3 minh họa phép phân tích thẩm tách Western kháng các đoạn có nguồn gốc từ chuỗi beta C5 (các axit amin 19-180, 161-340, 321-500, và 481-

660 của SEQ ID NO:40) được nối với nhãn GST, như mô tả trong ví dụ 4,1. CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672, và CFA0675 là các kháng thể được tập hợp thành nhóm vào epitop C. Kháng thể kháng GST là đối chứng dương tính. Vị trí của các đoạn GST-nối C5(46-49 kDa) được đánh dấu bằng mũi tên.

Fig. 4 minh họa ký hiệu cảm biến BIACORE (nhãn được đã đăng ký) của các kháng thể kháng C5 về phía miền MG1-MG2 của Chuỗi C5 beta, như mô tả trong ví dụ 4,3. Hình vẽ trên cùng cho biết kết quả của CFA0305 (nét đậm), CFA0307 (nét đứt), CFA0366 (nét đứt đoạn), và eculizumab (nét chấm). Hình vẽ ở giữa cho biết kết quả của CFA0501 (nét đậm), CFA0599 (nét đứt), CFA0538 (nét đứt đoạn), và eculizumab (nét chấm). Hình vẽ dưới cùng cho biết kết quả của CFA0666 (nét đậm), CFA0672 (nét đứt), CFA0675 (nét đứt đoạn), và eculizumab (nét chấm). CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672, và CFA0675 là các kháng thể được tập hợp thành nhóm vào epitop C. Eculizumab là kháng thể kháng C5 kiểm soát.

Fig. 5A minh họa phép phân tích thẩm tách Western kháng các đoạn peptit có nguồn gốc từ miền MG1-MG2 (các axit amin 33-124, 45-124, 52-124, 33-111, 33-108, và 45-111 của SEQ ID NO:40) được nối với nhãn GST, như mô tả trong ví dụ 4,4. Kháng thể kháng GST được sử dụng là kháng thể để phản ứng. Vị trí của các đoạn GST-nối C5(35-37kDa) được đánh dấu bằng mũi tên.

Fig. 5B minh họa phép phân tích thẩm tách Western kháng lại các đoạn peptit có nguồn gốc từ miền MG1-MG2 (các axit amin 33-124, 45-124, 52-124, 33-111, 33-108, và 45-111 của SEQ ID NO:40) được nối với nhãn GST, như mô tả trong ví dụ 4,4. CFA0305 được sử dụng là kháng thể để phản ứng.

Fig. 5C tóm tắt sự phản ứng gắn kết của các kháng thể kháng C5 đến các đoạn có nguồn gốc từ chuỗi beta C5, như mô tả trong ví dụ 4,4. Các đoạn mà các kháng thể kháng C5 được tập hợp thành nhóm vào epitop C (CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672, và

CFA0675) sự gắn kết được chỉ trong ở màu xám, và các đoạn mà chúng không gắn kết được chỉ ra ở màu trắng.

Fig. 6 minh họa phép phân tích thẩm tách Western kháng lại các đột biến điểm C5 trong đó E48, D51, và K109 của chuỗi beta được thế với alanin (E48A, D51A, và K109A, tương ứng), như mô tả trong ví dụ 4,5. Trong hình vẽ bên trái, eculizumab (kháng thể kháng C5, gắn kết chuỗi alpha) được sử dụng là kháng thể để phản ứng và vị trí của chuỗi alpha của C5 (khoảng 113kDa) được đánh dấu bằng mũi tên. Trong hình vẽ bên phải, CFA0305 (được tập hợp thành nhóm vào epitop C, gắn kết chuỗi beta) được sử dụng là kháng thể để phản ứng và vị trí của chuỗi beta của C5 (khoảng 74kDa) được đánh dấu bằng đầu mũi tên.

Fig. 7 minh họa ký hiệu cảm biến BIACORE (nhãn được đã đăng ký) cho thấy sự tương tác của eculizumab-F760G4 (hình vẽ trên cùng) hoặc 305LO5 (hình vẽ dưới cùng) với các đột biến C5, như mô tả trong ví dụ 4,6. Ký hiệu cảm biến thu được bằng cách tiêm C5-wt (đường cong nét đậm), C5-E48A (đường cong đứt ngắn), C5-D51A (đường cong đứt dài), và C5-K109A (đường cong nét nhạt), tương ứng, trên bề mặt cảm biến được cố định với eculizumab-F760G4 hoặc 305LO5. Eculizumab là kháng thể kháng C5 kiểm soát. 305LO5 là kháng thể được làm tương thích với người của CFA0305 (được tập hợp thành nhóm vào epitop C), như mô tả trong ví dụ 2,3.

Fig. 8 minh họa ký hiệu cảm biến BIACORE (nhãn được đã đăng ký) cho thấy sự tương tác của 305LO5 với các đột biến C5 His để đánh giá độ phụ thuộc của pH, như mô tả trong ví dụ 4,7. Ký hiệu cảm biến thu được bằng cách tiêm C5-wt (đường cong nét đậm), C5-H70Y (đường cong đứt dài), C5-H72Y (đường cong đứt ngắn), C5-H110Y (đường chấm), và C5-H70Y+H110Y (đường cong nét nhạt), tương ứng, trên bề mặt cảm biến được cố định với 305LO5. Các phức kháng thể/kháng nguyên được cho phân ly ở pH=7,4, sau đó phân ly bổ sung ở pH=5,8 (được chỉ ra bằng mũi tên) để đánh giá các sự tương tác phụ thuộc vào pH.

Fig. 9A minh họa sự ức chế bổ trợ-sự tiêu thể mỡ hoạt tính bởi các kháng thể kháng C5, như mô tả trong ví dụ 5,1. Các kết quả của CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672, và CFA0675 được tập hợp thành nhóm vào epitop C, như mô tả trong ví dụ 2,2, được hiển thị.

Fig. 9B minh họa sự ức chế bổ trợ-sự tiêu thể mỡ hoạt tính bởi các kháng thể kháng C5, như mô tả trong ví dụ 5,1. Các kết quả của các kháng thể CFA0330 và CFA0341 được tập hợp thành nhóm vào epitop B, như mô tả trong ví dụ 2,2, được hiển thị.

Fig. 10A minh họa ức chế sự tạo ra C5a bởi các kháng thể kháng C5, như mô tả trong ví dụ 5,2. nồng độ C5a được định lượng trong các chất thu được trong suốt quá trình thử nghiệm tiêu thể mỡ mô tả trong Fig. 9A.

Fig. 10B minh họa ức chế sự tạo ra C5a bởi các kháng thể kháng C5, như mô tả trong ví dụ 5,2. nồng độ C5a được định lượng trong các chất thu được trong suốt quá trình thử nghiệm tiêu thể mỡ mô tả trong Fig. 9B.

Fig. 11 minh họa sự ức chế bổ trợ-phân hủy hoạt hóa bởi các kháng thể kháng C5, như mô tả trong ví dụ 5,3. Các thành phần được hoạt hóa qua chuỗi các phản ứng hóa sinh cổ điển.

Fig. 12 minh họa sự ức chế bổ trợ-phân hủy hoạt hóa bởi các kháng thể kháng C5, như mô tả trong ví dụ 5,4. Các thành phần được hoạt hóa qua chuỗi các phản ứng hóa sinh thay thế.

Fig. 13 minh họa sự ức chế bổ trợ-sự tiêu thể mỡ hoạt tính bởi các kháng thể kháng C5, như mô tả trong ví dụ 8,1. Các kết quả của các kháng thể 305LO15-SG422, 305LO16-SG422, 305LO18-SG422, 305LO19-SG422, 305LO20-SG422, và 305LO20-SG115 được chỉ ra.

Fig. 14 minh họa sự ức chế bổ trợ-sự tiêu thể mỡ hoạt tính bởi các kháng thể kháng C5, như mô tả trong ví dụ 8,1. Các kết quả của các kháng thể 305LO15-SG115 và 305LO23-SG429 được chỉ ra.

Fig. 15 minh họa sự ức chế bổ trợ-sự tiêu thể mỡ hoạt tính bởi các kháng thể kháng C5, như mô tả trong ví dụ 8,1. Các kết quả của các kháng thể 305LO22-SG115, 305LO22-SG422, 305LO23-SG115, và 305LO23-SG422 được chỉ ra.

Fig. 16 minh họa ức chế sự tạo ra C5a bởi các kháng thể kháng C5, như mô tả trong ví dụ 8,2. Các nông độ C5a được định lượng trong các chất thu được trong suốt quá trình thử nghiệm tiêu thể mỡ mô tả trong Fig. 13.

Fig. 17 minh họa ức chế sự tạo ra C5a bởi các kháng thể kháng C5, như mô tả trong ví dụ 8,2. nồng độ C5a được định lượng trong các chất thu được trong suốt quá trình thử nghiệm tiêu thể mỡ mô tả trong Fig. 14.

Fig. 18 minh họa sự ức chế hoạt tính bổ trợ trong huyết tương khỉ bởi các kháng thể kháng C5, như mô tả trong ví dụ 8,3. Các kháng thể kháng C5 được đưa vào trong khỉ Cynomolgus, và các hoạt tính bổ sung trong huyết tương của khỉ được đo trong thử nghiệm phân hủy.

Fig. 19 minh họa sự ức chế hoạt tính sinh học của C5 dạng tự nhiên (WT) và các biến thể C5 (V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N, và E1437D) bởi kháng thể kháng C5 (eculizumab), như mô tả trong ví dụ 8,4.

Fig. 20 minh họa sự ức chế hoạt tính sinh học của C5 dạng tự nhiên (WT) và các biến thể C5 (V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N, và E1437D) bởi kháng thể kháng C5 (biến thể 305), như mô tả trong ví dụ 8,4.

Fig. 21 minh họa sự ức chế bổ trợ-sự tiêu thể mỡ hoạt tính bởi các kháng thể kháng C5 (biến thể BNJ441 và 305), như mô tả trong ví dụ 8,5.

Các Fig. 22A và Fig. 22B minh họa cấu trúc tinh thể của 305 Fab được gắn kết vào miền C5 ở người (hC5)-MG1, như mô tả trong ví dụ 9,6. Fig. 22A minh họa đơn vị không đối xứng. MG1 được chỉ ra ở bề mặt và 305 Fab được chỉ ra như ruy- băng (xám đậm: chuỗi nặng, xám nhạt: chuỗi nhẹ). Fig. 22B minh họa các phân tử 1 và 2 chống lên nhau (xám đậm: phân tử 1, xám nhạt: phân tử 2).

Fig. 23A minh họa epitop của vùng tiếp xúc 305 Fab trên miền MG1, như mô tả trong ví dụ 9,6. Fig. 23A minh họa việc lập bản đồ epitop trong trình tự axit amin MG1 (xám đậm: ngắn hơn 3,0 angstrom, xám nhạt: ngắn hơn 4,5 angstrom).

Fig. 23B minh họa epitop của vùng tiếp xúc 305 Fab trên miền MG1, như mô tả trong ví dụ 9,6. Fig. 23B minh họa việc lập bản đồ epitop trong cấu trúc tinh thể (hình cầu xám đậm: ngắn hơn 3,0 angstrom, que xám nhạt: ngắn hơn 4,5 angstrom).

Fig. 24A minh họa cận cảnh hơn của các sự tương tác E48, D51, và K109 (hình que) với 305 Fab (bề mặt), như mô tả trong ví dụ 9,7.

Fig. 24B minh họa các sự tương tác giữa E48 và môi trường của nó (nét chấm xám đậm: liên kết hydro với Fab, nét chấm xám nhạt: liên kết hydro trung gian qua nước), như mô tả trong ví dụ 9,7.

Fig. 24C minh họa các sự tương tác giữa D51 và môi trường của nó (nét chấm xám đậm: liên kết hydro với Fab), như mô tả trong ví dụ 9,7.

Fig. 24D minh họa các sự tương tác giữa K109 và môi trường của nó (nét chấm xám đậm: liên kết hydro với Fab, nét chấm xám nhạt: cầu muối với H-CDR3_D95), như mô tả trong ví dụ 9,7.

Fig. 25A minh họa cận cảnh hơn của các sự tương tác của H70, H72, và H110 (hình que) với 305 Fab (bề mặt), như mô tả trong ví dụ 9,8, theo hướng tương tự như Fig. 24A.

Fig. 25B minh họa các sự tương tác giữa H70 và môi trường của nó, như mô tả trong ví dụ 9,8. Gốc histidin được chỉ tra trong hình que và mắt lưới. Liên kết hydro được biểu thị bởi nét chấm.

Fig. 25C minh họa các sự tương tác giữa H72 và môi trường của nó, như mô tả trong ví dụ 9,8. Gốc histidin được chỉ tra trong hình que và mắt lưới. Liên kết hydro được biểu thị bởi nét chấm.

Fig. 25D minh họa các sự tương tác giữa H110 và môi trường của nó, như mô tả trong ví dụ 9,8. Gốc histidin được chỉ tra trong hình que và mắt lưới. Khoảng cách giữa H110 và H-CDR3_H100c là được chỉ ra bằng nét chấm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các kỹ thuật và các quy trình sản xuất được mô tả hoặc được đề cập ở đây thường được hiểu và và áp dụng sử dụng phương pháp thông thường bởi người có trình độ trong lĩnh vực kỹ thuật như, ví dụ, các phương pháp được sử dụng rộng rãi được mô tả trong 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., (2003)); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames và G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow và Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, và 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 và P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, và D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley và Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir và C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller và M.P. Calos, eds., 1987); PCR: 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 và Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway và 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 và C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow và D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); Antibodies (M. Zanetti

và J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); và Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

I. Định nghĩa

Trừ khi có chỉ định khác, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có cùng ý nghĩa với những kỹ thuật thông thường được sử dụng bởi người có trình độ trong lĩnh vực kỹ thuật. Singleton et al., Dictionary of Microbiology và Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), và March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms và Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992), cung cấp cho người có trình độ trong lĩnh vực kỹ thuật có một hướng dẫn trung cho nhiều thuật ngữ được sử dụng theo sáng chế. Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn ở đây, bao gồm các đơn và các công bố sáng chế được kết hợp bằng cách tham khảo toàn bộ.

Để mô tả sáng chế, các thuật ngữ sau đây được áp dụng vào bất cứ khi vào có thể, các thuật ngữ được sử dụng ở số ít hoặc số nhiều hoặc ngược lại. Cũng được hiểu rằng các thuật ngữ được sử dụng ở đây để mô tả các phương án cụ thể và không làm giới hạn tới sáng chế. Trong trường hợp bất kỳ thuật ngữ nào dưới đây mâu thuẫn với bất kỳ tài liệu nào được kết hợp dưới đây bằng cách tham khảo, thuật ngữ được nêu dưới đây sẽ kiểm soát.

"Khung chấp nhận ở người" được đề cập ở đây là khung chứa khung trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có nguồn gốc từ khung miễn dịch globulin ở người hoặc khung liên ứng ở người như được đề cập dưới đây. Khung chấp nhận ở người "có nguồn gốc từ" khung miễn dịch globulin ở người hoặc khung liên ứng ở người có thể chứa cùng một trình tự axit amin của nó, hoặc có thể chứa các sự thay đổi trình tự axit amin. Theo một số phương án, số lượng thay đổi axit amin là 10 hoặc ít hơn, 9 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 7 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 5 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, 3 hoặc ít hơn, hoặc 2 hoặc ít hơn. Theo một số phương án, VL

khung chấp nhận ở người là giống hệt về trình tự với trình tự khung miễn dịch globulin ở người VL hoặc trình tự khung liên ứng ở người.

"Ái lực" đề cập đến cường độ của tổng các sự tương tác không cộng hóa trị giữa ví trí gắn kết đơn của phân tử (tức là, kháng thể) và kháng thể đối tác của nó (tức là, kháng nguyên). Trừ khi có chỉ định khác, theo sáng chế, "ái lực gắn kết" đề cập đến ái lực gắn kết nội phản ánh 1:1 sự tương tác giữa các thành viên của một cặp gắn kết (tức là, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X đối với đối tác Y có thể được thể hiện bằng hằng số phân ly (Kd). Ái lực có thể được đo bằng các phương pháp thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm các mô tả dưới đây. Các phương án và ví dụ điển hình để xác định ái lực gắn kết được mô tả sau đây.

Kháng thể "ái lực trưởng thành" đề cập đến kháng thể với một hoặc nhiều sự biến đổi ở một hoặc nhiều vùng siêu biến đổi (HVRs), so với kháng thể gốc không có các sự biến đổi này, các sự biến đổi này dẫn đến sự cải thiện về ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên.

Các thuật ngữ "kháng thể kháng C5" và "kháng thể gắn với C5" đề cập đến kháng thể that có khả năng gắn kết C5 với ái lực vừa đủ để kháng thể có ích như là một tác nhân điều trị và/hoặc chữa bệnh nhắm vào C5. Theo một phương án, mức độ gắn kết của kháng thể kháng C5 tới protein phi C5 không liên quan là nhỏ hơn vào khoảng 10% của sự gắn kết của kháng thể so với C5 được đo, tức là, bởi thử nghiệm chất miễn dịch phóng xạ (RIA). Theo các phương án nhất định, kháng thể gắn với C5 có hằng số phân ly (Kd) là:

$\leq$ 1 micro M, $\leq$ 100 nM, $\leq$ 10 nM, $\leq$ 1 nM, $\leq$ 0.1 nM, $\leq$ 0.01 nM, or $\leq$ 0.001 nM

(tức là, 10^{-8} M hoặc ít hơn, tức là, từ 10^{-8} M tới 10^{-13} M, tức là, từ 10^{-9} M tới 10^{-13} M). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 gắn kết với epitop của C5 mà được bảo tồn trong C5 từ các loại khác nhau.

Thuật ngữ "kháng thể" ở đây được sử dụng theo nghĩa rộng rãi và bao gồm các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các

kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa đặc hiệu (tức là, các kháng thể dạng khảm), và các đoạn kháng thể miễn là chúng biểu hiện hoạt tính gắn kết kháng nguyên mong muốn.

"Đoạn kháng thể" đề cập đến phân tử không phải là kháng thể nguyên vẹn mà bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn gắn kết kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn gắn kết. Các ví dụ của các đoạn kháng thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; các thể dia-; các kháng thể mạch thẳng; các phân tử kháng thể chuỗi đơn (tức là, scFv); và các kháng thể đa đặc hiệu được hình thành từ các đoạn kháng thể.

"Kháng thể gắn với cùng epitop" là kháng thể đề cập đến kháng thể ngăn chặn sự gắn kết của kháng thể tham chiếu với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh, và/hoặc ngược lại, kháng thể tham chiếu ngăn chặn sự gắn kết của kháng thể với kháng nguyên trong thử nghiệm cạnh tranh. Thử nghiệm cạnh tranh mẫu được cung cấp ở đây.

Thuật ngữ kháng thể "dạng khảm" đề cập đến kháng thể trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc nhẹ có nguồn gốc từ các loại hoặc gốc cụ thể, trong khi phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc nhẹ có nguồn gốc từ các loại hoặc gốc khác nhau.

"Lớp" của kháng thể đề cập đến dạng của miền ổn định hoặc vùng ổn định có chuỗi nặng. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một số laoị này có thể còn được chia ra thành các phân lớp (các isotyp), tức là, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, và IgA_2. Các miền ổn định chuỗi nặng mà tương ứng với các lớp khác nhau trong các globulin miễn dịch được gọi là alpha, delta, epsilon, gamma, và mu, tương ứng.

Thuật ngữ "tác nhân gây độc tế bào" theo sáng chế đề cập đến chất mà ức chế hoặc ngăn ngừa chức năng tế bào và/hoặc gây chết hoặc phá hủy tế bào. Các tác nhân gây độc tế bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất đồng vị phóng xạ (tức là, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} và các

chất đồng vị phóng xạ của Lu); các tác được làm tương thích với người liệu pháp hoặc các dược phẩm (tức là, methotrexat, adriamyxin, vinca alkaloit (vincristin, vinblastin, etoposit), doxorubixin, melphalan, mitomyxin C, chlorambuxil, daunorubixin hoặc các tác nhân xen giữa khác); các tác nhân ức chế tăng trưởng; các enzym và các đoạn của nó như các nucleolytic enzym; các kháng sinh; các toxin như các toxin phân tử nhỏ hoặc các toxin hoạt tính enzyma của vi khuẩn, nấm, gốc thực vật hoặc động vật, bao gồm các đoạn và/hoặc các biến thể của nó; và các tác nhân kháng u hoặc kháng ung thư khác nhau được bộc lộ dưới đây.

"Các chức năng hiệu quả" đề cập đến các hoạt động sinh học có liên quan đến vùng Fc của kháng thể, mà thay đổi theo kháng thể isotyp. Các ví dụ của các chức năng hiệu quả kháng thể bao gồm: gắn kết C1q và tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ sung (CDC); gắn kết thụ thể Fc; tính gây độc tế bào thông qua tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC); sự thực bào; sự điều chỉnh xuống của các thụ thể bề mặt tế bào (tức là, thụ thể tế bào B); và hoạt hóa tế bào B.

"Lượng hữu hiệu" của tác nhân, tức là, việc tạo công thức dược, đề cập đến một lượng hữu hiệu, ở liệu lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả phòng ngừa hoặc điều trị mong muốn.

Thuật ngữ "epitop" bao gồm bất kỳ yếu tố quyết định có khả năng bị gắn kết bởi kháng thể. Epitop là một vùng của kháng nguyên mà được gắn kết bởi bởi kháng thể nhắm vào kháng nguyên, và bao gồm các axit amin đặc hiệu liên kết trực tiếp với kháng thể. Các yếu tố quyết định epitop có thể bao gồm các nhóm có bề mặt hoạt tính hóa học của các phân tử như các axit amin, các chuỗi đường bên, các nhóm phosphoryl hoặc sulfonyl, và có thể có các đặc tính cấu trúc ba chiều đặc hiệu, và/hoặc các đặc tính tích điện đặc hiệu. Nói chung, các kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên đích cụ thể sẽ ưu tiên nhận ra epitop trên kháng nguyên đích trong một hỗn phức hợp của các protein và/hoặc các đại phân tử.

Thuật ngữ " vùng Fc " ở đây được sử dụng để xác định vùng đầu C của chuỗi nặng globulin miễn dịch mà chứa ít nhất một phần của vùng ổn định. Thuật ngữ bao gồm các vùng trình tự tự nhiên Fc và các vùng Fc biến đổi. Theo một phương án, vùng Fc chuỗi nặng IgG ở người trải dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đầu carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin đầu C (Lys447) của vùng Fc có thể hoặc không có mặt. Ngoài các chỉ định khác ở đây, số lượng các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng ổn định theo hộ số đếm EU, còn được gọi là chỉ số EU, như mô tả trong Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Khung" hoặc "FR" đề cập đến các gốc miền biến đổi không phải là các gốc vùng siêu biến đổi (HVR). FR của miền biến đổi thường bao gồm bốn miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Vì vậy, các trình tự HVR và FR thường xuất hiện trong trình tự sau đây trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Các thuật ngữ "trình tự có độ dài đầy đủ," "kháng thể nguyên vẹn," và "kháng thể đầy đủ" được sử dụng ở đây có thay thế cho nhau đề cập đến kháng thể có cấu trúc về cơ bản tương tự như cấu trúc kháng thể tự nhiên hoặc có các chuỗi nặng mà chứa vùng Fc như được định nghĩa ở đây.

Các thuật ngữ "tế bào chủ," "dòng tế bào chủ," và "nuôi cấy tế bào chủ" được sử dụng thay thế cho nhau và đề cập đến các tế bào trong đó axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, bao gồm dòng dõi của các tế bào này. Các tế bào chủ bao gồm "các biến tính" và "các tế bào biến đổi," bao gồm tế bào biến đổi sơ cấp và con cái được tạo ra từ đó mà không quan tâm đến số lượng các ống. Con các có thể không hoàn toàn giống hệt nhau trong hàm lượng axit nucleic so với các tế bào gốc, nhưng có thể chứa các đột biến. Thế hệ đột biến mà có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học được sàng lọc hoặc chọn lọc trong tế bào biến đổi ban đầu được bao gồm ở đây.

"Kháng thể người" là một chuỗi có chứa trình tự axit amin tương ứng với kháng thể được sản xuất bởi người hoặc tế bào ở người hoặc có nguồn gốc từ không phải là người sử dụng kháng thể ở người hoặc kháng thể ở người khác- các trình tự mã hóa. Định nghĩa của kháng thể ở người đặc biệt loại trừ kháng thể được làm tương thích với người bao gồm kháng nguyên không phải ở người- các gốc gắn kết.

"Khung liên ứng ở người" là khung dại diện cho các gốc axit amin thông thường nhất trong việc lựa trọn các trình tự khung VL hoặc VH globulin miễn dịch ở người. Nói chung, việc lựa chọn các trình tự khung VL hoặc VH globulin miễn dịch ở người là từ một phân nhóm của các trình tự miền biến đổi. Nói chung, phân nhóm của các trình tự là một phân nhóm như trong Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Theo một phương án, đối với VL, phân nhóm là phân nhóm kappa I như trong Kabat et al., nêu trên. Theo một phương án, đối với VH, phân nhóm là phân nhóm III như trong Kabat et al., nêu trên.

Kháng thể "được làm tương thích với người" đề cập đến kháng thể dạng khảm bao gồm các gốc axit amin từ các HVR không phải ở người và các gốc axit amin từ các FR ở người. Theo các phương án nhất định, kháng thể được làm tương thích với người sẽ bao gồm tất cả ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó toàn bộ hoặc tất cả các HVR (tức là, các CDR) tương ứng với kháng thể không phải ở người, và toàn bộ hoặc tất cả các FR tương ứng với kháng thể ở người. Kháng thể được làm tương thích với người tùy ý có thể bao gồm ít nhất một phần của vùng ổn định kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể ở người. "Dạng được làm tương thích với người " của kháng thể, tức là, kháng thể không phải ở người, đề cập đến kháng thể that đã trải qua sự nhân tính hóa.

Thuật ngữ "vùng siêu biến đổi" hoặc "HVR" theo sáng chế đề cập đến mỗi của các vùng của miền biến đổi kháng thể là sự siêu biến đổi trong trình tự ("các vùng xác định bổ trợ" hoặc "các CDR") và/hoặc tạo các vòng được xác định về

cấu trúc ("các vòng siêu biến đổi") và/hoặc chứa kháng nguyên-các gốc tiếp xúc ("tiếp xúc kháng nguyên "). Nói chung, các kháng thể chứa sáu HVR: ba trong VH (H1, H2, H3), và ba trong VL (L1, L2, L3). Các HVR mẫu ở đây bao gồm: (a) các vòng siêu biến đổi xuất hiện ở các gốc axit amin 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), và 96-101 (H3) (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));(b) các CDR xuất hiện ở các gốc axit amin 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), và 95-102 (H3) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NIH, Bethesda, MD (1991));(c) kháng nguyên tiếp xúc xuất hiện ở các gốc axit amin 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), và 93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)); và(d) các sự kết hợp của (a), (b), và/hoặc (c), bao gồm các gốc axit amin 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), và 94-102 (H3).

Trừ khi có chỉ định khác, các gốc HVR và các gốc khác trong miền biến đổi (tức là, các gốc FR) được đánh số ở đây theo Kabat et al., nêu trên.

"Tiếp hợp miễn dịch" là kháng thể tiếp hợp với một hoặc nhiều (các) phân tử dị hợp, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở tác nhân gây độc tế bào.

"Các thể" hoặc "chủ thể" là động vật có vú.Các động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật trong nhà (tức là, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), động vật linh trưởng (tức là, người và động vật linh trưởng không phải là người như khỉ), thỏ, và động vật gặm nhấm (tức là, chuột và chuột cống). Theo các phương án nhất định, cá thể hoặc chủ thể là người.

Kháng thể "được phân lập" là kháng thể đã được tách ra khỏi một thành phần ở môi trường tự nhiên của nó. Theo một số phương án, kháng thể được tinh chế để đạt được độ tinh khiết lớn hơn 95% hoặc 99% được xác định bởi, ví dụ, phương pháp điện chuyển (tức là, SDS-PAGE, tập trung đẳng điện (IEF), điện di mao mạch) hoặc sắc ký (tức là, trao đổi ion hoặc pha nghịch HPLC). Để xem xét

các phương pháp đánh giá độ tinh khiết của kháng thể, tham khảo, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

Axit nucleic "được phân lập" đề cập đến phân tử axit nucleic đã được tách ra khỏi một thành phần ở môi trường tự nhiên của nó. Axit nucleic được phân lập bao gồm phân tử axit nucleic được chứa trong các tế bào mà thường có chứa phân tử axit nucleic, nhưng phân tử axit nucleic không mang tình trạng di truyền nhiễm sắc thể hoặc ở vị trí nhiễm sắc thể khác với vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó.

"Axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể kháng C5" đề cập đến một hoặc nhiều phân tử axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể (hoặc các đoạn của nó), bao gồm (các) phân tử axit nucleic trong vectơ đơn hoặc các vectơ riêng biệt, và (các) phân tử axit nucleic có mặt tại một hoặc nhiều vị trí trong tế bào chủ.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" theo sáng chế đề cập đến kháng thể thu được từ một quần thể kháng thể đồng nhất, ví dụ, các kháng thể riêng biệt chứa quần thể đều giống và/hoặc gắn kết cùng một epitop, ngoại trừ các biến thể kháng thể có thể, tức là, chứa các đột biến xuất hiện một cách tự nhiên hoặc phát sinh trong quá trình sản xuất chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể này thường có mặt với một lượng nhỏ. Ngược lại với các chế phẩm kháng thể đa dòng, thường bao gồm các kháng thể khác nhau trực tiếp chống lại các yếu tố quyết định khác (các epitop), mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng trực tiếp chống lại yếu tố quyết định đơn lẻ trong kháng nguyên. Do đó, thuật ngữ "đơn dòng" cho thấy đặc tính của kháng thể thu được từ quần thể đồng nhất của các kháng thể, và không được hiểu như là yêu cầu sản xuất của kháng thể bởi bất kỳ phương pháp cụ thể nào. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng được sử dụng theo sáng chế có thể được thực hiện theo các kỹ thuật khác nhau, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở phương pháp lai tế bào, phương pháp tái tổ hợp DNA, phương pháp hiển thị thực khuẩn, và phương pháp sử dụng các động vật biến đổi gen chứa toàn bộ hoặc một phần vị trí gen globulin miễn dịch ở

người, các phương pháp này và các phương pháp mẫu khác để tạo các kháng thể đơn dòng được mô tả ở đây.

"Kháng thể rỗng " đề cập đến kháng thể không tiếp hợp với gốc dị hợp (tức là, gốc gây độc tế bào) hoặc đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ. Kháng thể rỗng có thể có mặt trong sự tạo công thức dược.

"Các kháng thể tự nhiên" đề cập đến các phân tử globulin miễn dịch tự nhiên có các cấu trúc khác nhau. Ví dụ, các kháng thể tự nhiên IgG là các glycoprotein heterotetrameric vào khoảng 150.000 dalton, gồm hai chuỗi nhẹ giống hệt nhau và hai chuỗi nặng giống hệt nhau được gắn kết disulfua. Từ đầu N đến đầu C, Mỗi chuỗi nặng có một vùng biến đổi (VH), cũng được gọi là miền chuỗi nặng biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, theo sau bởi ba miền ổn định (CH1, CH2, và CH3). Tương tự, từ đầu N đến đầu C, mỗi chuỗi nhẹ có vùng biến đổi (VL), còn được gọi là miền chuỗi nhẹ biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, theo sau bởi miền chuỗi nhẹ ổn định(CL). Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được chia thành một hoặc hai loại, gọi là kappa (kappa) và lambda (lambda), dựa trên trình tự axit amin của miền ổn định của nó.

Thuật ngữ "sản phẩm đóng gói" được sử dụng đề cập đến các hướng dẫn thường được bao gồm trong gói sản phẩm thương mại của các sản phẩm trị liệu, chứa các thông tin về chỉ định, cách sử dụng, liều lượng, cách dùng, liệu pháp phối hợp, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm trị liệu này.

"Phần trăm (%) đồng nhất trình tự axit amin" đối với trình tự polypeptit tham khảo được định nghĩa là phần trăm của các gốc axit amin trong trình tự ứng viên đồng nhất với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham khảo, sau khi sắp xếp các trình tự và bổ sung các khoảng trống, nếu cần, để đạt được sự đồng nhất trình tự phần trăm tối đa, và không xem xét bất kỳ sự thế nào như là một phần của sự đồng nhất trình tự. Sự sắp xếp để xác định phần trăm đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được bằng nhiều cách khác nhau đối với người

có trình tự trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, sử dụng phần mềm máy tính sẵn có đã công bố như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Người có trình độ trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định các thông số thích hợp để sắp xếp các trình tự, bao gồm bất kỳ thuật toán nào cần thiết để đạt được sự sắp xếp tối đa trên toàn bộ độ dài của các trình tự được so sánh. Đối với các mục đích ở đây, các giá trị % đồng nhất trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được viết bởi Genentech, Inc., và hóa nguồn đã được đệ trình cùng với tài liệu hướng dẫn sử dụng trong US Copyright Office, Washington D.C., 20559, được đăng ký dưới US Copyright Registration No. TXU510087. Chương trình ALIGN-2 là sẵn có từ Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể biên soạn từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 có thể được biên soạn để sử dụng trong hệ điều hành UNIX, bao gồm UNIX V4,0D kỹ thuật số. Tất cả các tham số so sánh trình tự được thiết lập bởi chương trình ALIGN-2 và không thay đổi.

Trong trường hợp ALIGN-2 được sử dụng để so sánh trình tự axit amin, % đồng nhất trình tự axit amin của trình tự axit amin A nhất định cùng với, hoặc chống lại trình tự axit amin B nhất định (mà có thể được phân loại như là trình tự axit amin A nhất định có hoặc bao gồm % đồng nhất trình tự axit amin cùng với, hoặc chống lại trình tự axit amin B nhất định) được tính toán như sau: 100 lần phân số X/Y, khi X là số lượng các gốc axit amin ghi được sự đồng nhất bởi chương trình sắp xếp trình tự ALIGN-2 trong sự sắp xếp của chương trình A và B, và khi Y là tổng số lượng các gốc axit amin trong B. Điều này sẽ được đánh giá cao khi mà độ dài của trình tự axit amin A là không bằng với độ dài của trình tự axit amin B, % đồng nhất trình tự axit amin của A so với B sẽ không bằng % đồng nhất trình tự axit amin của B so với A. Trừ khi có chỉ định khác, toàn bộ các giá trị % đồng nhất trình tự axit amin được sử dụng ở đây thu được như mô tả trên đây sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Thuật ngữ "dược phẩm" đề cập đến chế phẩm ở dạng như vậy để cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính được chứa ở đây là có hiệu quả, và không chứa các thành phần bổ sung mà không gây độc hại đối với chủ thể để chế phẩm sẽ được cung cấp.

"Chất mang dược dụng" đề cập đến thành phần trong dược phẩm, không phải là thành phần hoạt tính, không độc với chủ thể, chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất đệm, tá dược, chất ổn định, hoặc chất bảo quản.

Thuật ngữ "C5", theo sáng chế, bao gồm bất kỳ C5 tự nhiên nào từ bất kỳ động vật có xương sống nào, bao gồm động vật có vú như linh trưởng (tức là, người và khỉ) và bộ gặm nhấm (tức là, chuột và chuột cống). Trừ khi có chỉ định khác, thuật ngữ "C5" đề cập đến protein C5 ở người có trình tự axit amin được chỉ ra trong SEQ ID NO: 39 và chứa trình tự chuỗi beta được chỉ ra trong SEQ ID NO: 40, Thuật ngữ bao gồm "độ dài đầy đủ," C5 chưa xử lý cũng như bất kỳ dạng nào của C5 mà dẫn đến quá trình trong tế bào. Thuật ngữ còn bao gồm các biến thể xuất hiện tự nhiên của C5, tức là, các biến thể nối hoặc các biến thể đẳng vị. Trình tự axit amin của C5 ở người được chỉ ra trong SEQ ID NO: 39 ("dạng hoang dại " hoặc "WT" C5). Trình tự axit amin của chuỗi beta của C5 người được chỉ ra trong SEQ ID NO: 40, các trình tự axit amin của các miền MG1, MG2 và MG1-MG2 của chuỗi beta của C5 người được chỉ ra trong SEQ ID NO: 41, 42, và 43, tương ứng. Các trình tự axit amin của khi Cynomolgus và C5 chuột được chỉ ra trong SEQ ID NO: 44 và 105, tương ứng. Các gốc axit amin 1-19 của các SEQ ID NO: 39, 40, 43, 44, và 105 tương ứng với một trình tự tín hiệu được loại bỏ trong quá trình điều chế trong tế bào và do đó thiếu từ trình tự axit amin tương ứng.

Theo sáng chế, "việc điều trị" (và các biến thể ngữ pháp của nó như "điều trị" hoặc "được điều trị") đề cập đến việc can thiệp lâm sàng nhằm thay đổi tiến trình tự nhiên của cá nhân được điều trị, và có thể được thực hiện để hoặc phòng bệnh hoặc trong quá trình bệnh lý lâm sàng. Các hiệu ứng mong muốn của việc

điều trị bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ngăn ngừa sự xuất hiện hoặc tái phát bệnh, giảm triệu chứng, giảm bất kỳ hậu quả bệnh lý trực tiếp hoặc gián tiếp nào của bệnh, ngăn ngừa di căn, giảm tỷ lệ tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc thuyên giảm trình trạng của bệnh, và miễn giảm hoặc tiên lượng bệnh được cải thiện. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng để làm chậm sự phát triển của bệnh hoặc làm chậm tiến triển của bệnh.

Thuật ngữ "vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" đề cập đến miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ kháng thể có liên quan đến việc gắn kết kháng thể tới kháng nguyên. Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (VH và VL, tương ứng) của kháng nguyên tự nhiên thường có các cấu trúc tương tự, với mỗi miền bao gồm bốn vùng khung bảo tồn (các FR) và ba vùng siêu biến đổi (các HVR). (Tham khảo, tức là, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman và Co., page 91 (2007 A single VH hoặc VL domain).) có thể đủ để có kháng nguyên-gắn kết đặc hiệu. Ngoài ra, các kháng thể mà gắn kết kháng nguyên cụ thể có thể bị phân lập sử dụng miền VH hoặc VL từ kháng thể mà gắn kết kháng nguyên của các miền VL hoặc VH bổ trợ, tương ứng. Tham khảo, tức là, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).

Thuật ngữ "vectơ" theo sáng chế, đề cập đến phân tử axit nucleic có khả năng nhân bản axit nucleic khác mà nó liên kết. Thuật ngữ bao gồm vectơ như là một cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vectơ kết hợp vào bộ gencủa tế bào chủ mà nó được được đưa vào. Các vectơ có khả năng điều khiển sự biểu hiện của các axit nucleic mà chúng được liên kết với nhau. Các vectơ này được đề cập ở đây như " các vectơ biểu hiện".

II. Chế phẩm và các phương pháp

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng C5 và việc sử dụng chúng. Theo các phương án nhất định, các kháng thể mà gắn kết với C5

được cung cấp. Các kháng thể theo sáng chế là hữu ích, tức là, để chẩn đoán hoặc điều trị các bệnh.

A. Các mẫu kháng thể kháng C5

Theo một khía cạnh, sáng chế cung cấp các kháng thể được phân lập mà gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế gắn kết với epitop trong chuỗi beta của C5. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 gắn kết với epitop trong miền MG1-MG2 của chuỗi beta của C5. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 gắn kết với epitop trong đoạn bao gồm các axit amin 19-180 của chuỗi beta của C5. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 gắn kết với epitop trong miền MG1 (các axit amin 20-124 của SEQ ID NO: 40 (SEQ ID NO: 41)) của chuỗi beta của C5. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 gắn kết với epitop trong đoạn bao gồm các axit amin 33-124 của chuỗi beta của C5 (SEQ ID NO: 40). Theo một phương án khác, kháng thể không gắn kết với đoạn ngắn hơn so với đoạn bao gồm các axit amin 33-124 của chuỗi beta của C5, tức là, đoạn bao gồm các axit amin 45-124, 52-124, 33-111, 33-108, hoặc 45-111 của chuỗi beta của C5 (SEQ ID NO: 40).

Theo khía cạnh khác, sáng chế cung cấp các kháng thể kháng C5 mà cho thấy các đặc tính gắn kết phụ thuộc pH. Theo sáng chế, việc biểu hiện "gắn kết phụ thuộc pH" có nghĩa là kháng thể cho thấy "việc gắn kết với C5 ở pH có tính axit bị giảm so với veiệc gắn kết này tại pH trung hòa" (theo sáng chế, cả hai việc biểu hiện này có thể được sử dụng thay thế cho nhau). Ví dụ, các kháng thể "có các đặc tính gắn kết phụ thuộc pH" bao gồm các kháng thể mà gắn kết với C5 với ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit. Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế gắn kết với C5 với ít nhất 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, hoặc ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit. Theo một số phương án, các kháng thể gắn kết với C5 với ái lực cao hơn ở pH=7,4 so với ở pH=5,8. Theo một phương án khác nữa, các kháng thể theo sáng chế gắn

kết với C5 với ít nhất 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, hoặc ái lực cao hơn ở pH=7,4 so với ở pH=5,8.

"Ái lực" của kháng thể đối với C5, theo sáng chế, được biểu hiện dưới dạng KD của kháng thể. KD của kháng thể đề cập đến the hằng số phân ly cân bằng của kháng thể-sự tương tác kháng nguyên. Giá trị KD càng cao đối với kháng thể gắn kết với kháng nguyên của nó, ái lực gắn kết của nó đối với kháng nguyên cụ thể càng yếu. Do đó, theo sáng chế, việc biểu hiện " ái lực tại pH trung hòa cao hơn so với pH có tính axit" (hoặc việc biểu hiện tương tự "gắn kết phụ thuộc pH") đề cập đến KD đối với kháng thể gắn kết với C5 ở pH có tính axit là cao hơn so với KD đối với kháng thể gắn kết với C5 tại pH trung hòa. Ví dụ, theo sáng chế, kháng thể gắn kết với C5 có ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit nếu KD của kháng thể gắn kết với C5 ở pH có tính axit là ít nhất lớn hơn gấp 2 lần so với KD của kháng thể gắn kết với C5 tại pH trung hòa. Do đó, sáng chế bao gồm các kháng thể mà gắn kết với C5 ở pH có tính axit có KD ít nhất là 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, hoặc nhiều lần hơn so với KD của kháng thể gắn kết với C5 tại pH trung hòa. Theo một phương án khác, giá trị KD của kháng thể tại pH trung hòa có thể là 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, hoặc ít hơn. Theo một phương án khác, giá trị KD của kháng thể ở pH có tính axit có thể là 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, hoặc lớn hơn.

Theo một phương án khác nữa kháng thể được coi là gắn kết với C5 có ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit nếu KD của kháng thể gắn kết với C5 ở pH=5,8 là ít nhất lớn hơn gấp 2 lần so với KD của kháng thể gắn kết với C5 ở pH=7,4. Theo một số phương án cung cấp các kháng thể gắn kết với C5 ở pH=5,8 có KD ít nhất là 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, hoặc nhiều lần hơn so với KD của kháng thể gắn kết với C5 ở pH=7,4. Theo một phương án khác, giá trị KD của kháng thể ở pH=7,4 có thể là 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M,

10^{-12} M, hoặc ít hơn. Theo một phương án khác, giá trị KD của kháng thể ở pH=5,8 có thể là 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, hoặc lớn hơn.

Các đặc tính gắn kết của kháng thể đối với kháng nguyên cụ thể còn có thể được biểu hiện dưới dạng KD của kháng thể. KD của kháng thể đề cập đến hằng số tỷ lệ phân ly của kháng thể đối với kháng nguyên cụ thể và được biểu hiện dưới dạng giây hàm số nghịch (tức là, sec^{-1}). Sự gia tăng giá trị kd biểu hiện sự gắn kết yếu hơn của kháng thể tới kháng nguyên của nó. Sáng chế còn bao gồm các kháng thể mà gắn kết với C5 có giá trị kd cao hơn ở pH có tính axit so với tại pH trung hòa. Sáng chế bao gồm các kháng thể mà gắn kết với C5 ở pH có tính axit có KD ít nhất là 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, hoặc nhiều lần hơn so với KD của kháng thể gắn kết với C5 tại pH trung hòa. Theo một phương án khác, giá trị KD của kháng thể tại pH trung hòa có thể là 10^{-2} 1/s, 10^{-3} 1/s, 10^{-4} 1/s, 10^{-5} 1/s, 10^{-6} 1/s, hoặc ít hơn. Theo một phương án khác, giá trị KD của kháng thể ở pH có tính axit có thể là 10^{-3} 1/s, 10^{-2} 1/s, 10^{-1} 1/s, hoặc lớn hơn. Sáng chế còn bao gồm các kháng thể mà gắn kết với C5 có giá trị kd cao hơn ở pH=5,8 so với ở pH=7,4. Sáng chế bao gồm các kháng thể mà gắn kết với C5 ở pH=5,8 có KD ít nhất là 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, hoặc nhiều lần hơn so với KD của kháng thể gắn kết với C5 ở pH=7,4. Theo một phương án khác, giá trị KD của kháng thể ở pH=7,4 có thể là 10^{-2} 1/s, 10^{-3} 1/s, 10^{-4} 1/s, 10^{-5} 1/s, 10^{-6} 1/s, hoặc ít hơn. Theo một phương án khác, giá trị KD của kháng thể ở pH=5,8 có thể là 10^{-3} 1/s, 10^{-2} 1/s, 10^{-1} 1/s, hoặc lớn hơn.

Trong một số trường hợp nhất định, "gắn kết với C5 ở pH có tính axit bị giảm so với gắn kết của nó tại pH trung hòa" được biểu hiện dưới dạng tỷ lệ của giá trị KD của kháng thể gắn kết với C5 ở pH có tính axit so với giá trị KD của kháng thể gắn kết với C5 tại pH trung hòa (hoặc ngược lại). Ví dụ, kháng thể có thể được coi là biểu hiện "gắn kết với C5 ở pH có tính axit bị giảm so với gắn kết của nó tại pH trung hòa", theo sáng chế, nếu kháng thể biểu hiện tỷ lệ KD có

tính axit/trung hòa là 2 hoặc lớn hơn. Theo một số ví dụ minh họa, tỷ lệ pH=5,8/pH=7,4 KD đối với kháng thể theo sáng chế là 2 hoặc lớn hơn. Theo một số ví dụ minh họa, tỷ lệ KD có tính axit/trung hòa đối với kháng thể theo sáng chế có thể là 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, hoặc lớn hơn. Theo một phương án khác, giá trị KD của kháng thể tại pH trung hòa có thể là 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, hoặc ít hơn. Theo một phương án khác, giá trị KD của kháng thể ở pH có tính axit có thể là 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, hoặc lớn hơn. Theo một số trường hợp khác, kháng thể có thể biểu hiện "gắn kết với C5 ở pH có tính axit bị giảm so với gắn kết của nó tại pH trung hòa", theo sáng chế, nếu kháng thể biểu hiện tỷ lệ pH=5,8/pH=7,4 KD là 2 hoặc lớn hơn. Theo một số ví dụ minh họa, tỷ lệ pH=5,8/pH=7,4 KD đối với kháng thể theo sáng chế có thể là 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, hoặc lớn hơn. Theo một phương án khác, giá trị KD của kháng thể ở pH=7,4 có thể là 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, hoặc ít hơn. Theo một phương án khác, giá trị KD của kháng thể ở pH=5,8 có thể là 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, hoặc lớn hơn.

Theo một số trường hợp nhất định, "gắn kết với C5 ở pH có tính axit bị giảm so với gắn kết của nó tại pH trung hòa" được biểu hiện dưới dạng tỷ lệ của giá trị KD của kháng thể gắn kết với C5 ở pH có tính axit so với giá trị KD của kháng thể gắn kết với C5 tại pH trung hòa (hoặc ngược lại). Ví dụ, kháng thể có thể biểu hiện "gắn kết với C5 ở pH có tính axit bị giảm so với gắn kết của nó tại pH trung hòa", theo sáng chế, nếu kháng thể biểu hiện tỷ lệ KD có tính axit/trung hòa là 2 hoặc lớn hơn. Theo một số ví dụ minh họa, tỷ lệ pH=5,8/pH=7,4 KD đối với kháng thể theo sáng chế là 2 hoặc lớn hơn. Theo một số ví dụ minh họa, tỷ lệ KD có tính axit/trung hòa đối với kháng thể theo sáng chế có thể là 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, hoặc lớn hơn. Theo một số trường hợp nhất định, tỷ lệ pH=5,8/pH=7,4 KD đối với kháng thể theo sáng chế có thể là 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, hoặc lớn hơn. Theo một phương án khác, giá trị KD của kháng thể tại pH trung hòa có thể là 10^{-2} 1/s, 10^{-3} 1/s, 10^{-4} 1/s, 10^{-5} 1/s, 10^{-6} 1/s, hoặc ít hơn. Theo một phương án khác nữa, giá trị KD của kháng thể ở pH=7,4 có thể là 10^{-2} 1/s, 10^{-3} 1/s, 10^{-4} 1/s, 10^{-5} 1/s, 10^{-6} 1/s, hoặc ít hơn. Theo một phương án khác, giá trị KD của kháng thể ở pH có tính axit có thể là 10^{-3} 1/s, 10^{-2} 1/s, 10^{-1} 1/s, hoặc lớn hơn. Theo một phương án khác nữa, giá trị KD của kháng thể ở pH=5,8 có thể là 10^{-3} 1/s, 10^{-2} 1/s, 10^{-1} 1/s, hoặc lớn hơn.

Theo sáng chế, việc biểu hiện "pH có tính axit" đề cập đến pH là 4,0 đến 6,5. Việc biểu hiện "pH có tính axit" bao gồm các giá trị pH của bất kỳ của 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, và 6,5. Theo khía cạnh cụ thể, “pH có tính axit" là 5,8.

Theo sáng chế, việc biểu hiện "pH trung hòa" đề cập đến pH là 6,7 đến khoảng 10,0, Việc biểu hiện "pH trung hòa" bao gồm các giá trị pH của bất kỳ của 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, và 10,0, Theo khía cạnh cụ thể, “pH trung hòa" là 7,4.

Các giá trị KD, và các giá trị kd, như được thể hiện ở đây, có thể được xác định bằng cách sử dụng thiết bị cảm biến sinh học dựa trên sự cộng hưởng gen nguyên sinh bề mặt để mô tả kháng thể- các sự tương tác kháng nguyên. (tham khảo, tức là, ví dụ 3, ở đây). Các giá trị KD, và các giá trị KD có thể được xác định ở 25 độ C hoặc 37 độ C.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế gắn kết với epitop trong chuỗi beta của C5 mà bao gồm miền MG1 (SEQ ID NO:41). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế gắn kết với epitop trong chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5 mà bao gồm ít nhất một đoạn được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin 47-57, 70-76, và 107-110, Theo các

phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế gắn kết với epitop trong đoạn của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5 mà bao gồm ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Thr47, Glu48, Ala49, Phe50, Asp51, Ala52, Thr53, Lys57, His70, Val71, His72, Ser74, Glu76, Val107, Ser108, Lys109, và His110, Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế gắn kết với epitop trong đoạn của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5 mà bao gồm ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109, và His110, Theo các phương án nhất định, việc gắn kết của kháng thể kháng C5 theo sáng chế tới đột biến C5 bị giảm so với việc gắn kết của nó tới C5 dạng tự nhiên, trong đó đột biến C5 có ít nhất một sự thế axit amin tại vị trí được chọn từ nhóm bao gồm Glu48, Asp51, His72, và Lys109. Theo một phương án khác, gắn kết phụ thuộc pH của kháng thể kháng C5 theo sáng chế tới đột biến C5 bị giảm so với gắn kết phụ thuộc pH của nó ở C5 dạng tự nhiên, trong đó đột biến C5 có ít nhất một sự thế axit amin tại vị trí được chọn từ nhóm bao gồm His70, His72, và His110, Theo một phương án khác nữa, axit amin tại vị trí được chọn từ Glu48, Asp51, và Lys109 được thế với alanin, và axit amin tại vị trí được chọn từ His70, His72, và His110 được thế với tyrosin trong đột biến C5.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm một cặp VH và VL được chọn từ: (a) VH của SEQ ID NO:1 và VL của SEQ ID NO:11; (b) VH của SEQ ID NO: 22 và VL của SEQ ID NO:26; (c) VH của SEQ ID NO:21 và VL của SEQ ID NO:25; (d) VH của SEQ ID NO: 5 và VL của SEQ ID NO:15; (e) VH của SEQ ID NO:4 và VL của SEQ ID NO:14; (f) VH của SEQ ID NO: 6 và VL của SEQ ID NO: 16; (g) VH của SEQ ID NO:2 và VL của SEQ ID NO:12; (h) VH của SEQ ID NO: 3 và VL của SEQ ID NO: 13; (i) VH của SEQ ID NO:9 và VL của SEQ ID NO:19; (j) VH của SEQ ID NO:7 và VL của SEQ ID NO: 17; (k) aVH của SEQ ID NO:8 và VL của SEQ ID NO:18; (l) VH của SEQ ID NO: 23 và VL của SEQ ID NO:27; và (m) VH của SEQ ID NO: 10 và VL của SEQ ID NO:20,

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế gắn kết C5 và tiếp xúc axit amin Asp51 (D51) của SEQ ID NO:39. Theo các phương án khác, kháng thể kháng C5 theo sáng chế gắn kết C5 và tiếp xúc axit amin Lys109 (K109) của SEQ ID NO:39. Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 theo sáng chế gắn kết C5 và tiếp xúc axit amin Asp51 (D51) và axit amin Lys109 (K109) của SEQ ID NO:39.

Theo các phương án nhất định, việc gắn kết của kháng thể kháng C5 theo sáng chế tới đột biến C5 bị giảm so với việc gắn kết của nó tới C5 dạng tự nhiên, trong đó đột biến C5 có việc thế Glu48Ala (E48A) của SEQ ID NO:39. Theo một phương án khác, gắn kết phụ thuộc pH của kháng thể kháng C5 theo sáng chế tới đột biến C5 bị giảm so với gắn kết phụ thuộc pH của nó ở C5 dạng tự nhiên, trong đó đột biến C5 có việc thế Glu48Ala (E48A) của SEQ ID NO:39.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 gắn kết với protein C5 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39, nhưng không gắn kết với protein C5 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39 với việc thế H72Y, trong đó protein C5 và protein C5 được thế H72Y được điều chế và sàng lọc dưới các điều kiện tương tự. Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 gắn kết với protein C5 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39 ở pH=7,4, nhưng không gắn kết với protein C5 được thế H72Y ở pH=7,4.

Không bị giới hạn bởi bất kỳ lý thuyết cụ thể nào, có thể được suy đoán rằng sự gắn kết của kháng thể kháng C5 tới C5 bị giảm (hoặc gần như là mất) khi gốc axit amin trên C5 được thế với axit amin khác, điều này có nghĩa rằng gốc axit amin trên C5 là rất quan trọng đối với các sự tương tác giữa kháng thể kháng C5 và C5, và kháng thể có thể nhận ra epitop xung quanh gốc axit amin trên C5.

Theo sáng chế, nhóm các kháng thể kháng C5 mà cạnh tranh với nhau hoặc gắn kết với cùng một epitop có thể cho thấy các đặc tính gắn kết phụ thuộc pH. Trong số các axit amin, histidin, có giá trị pKa vào khoảng 6,0 tới 6,5, có thể có

các trạng thái phân ly proton khác nhau giữa pH có tính axit và pH trung hòa. Do đó, gốc histidin trên C5 có thể góp phần tương tác phụ thuộc vào pH giữa kháng thể kháng C5 và C5. Không bị giới hạn bởi bất kỳ lý thuyết cụ thể nào, có thể được suy đoán rằng kháng thể kháng C5 có thể nhận ra cấu trúc đối xứng xung quanh gốc histidin trên C5, là biến số phụ thuộc vào pH. Sự suy đoán đó có thể phù hợp với các kết quả thử nghiệm mô tả dưới đây: mà tính phụ thuộc vào pH của kháng thể kháng C5 bị giảm (hoặc gần như mất) khi gốc histidin trên C5 được thế với axit amin khác (tức là, kháng thể kháng C5 có các đặc tính gắn kết phụ thuộc pH gắn kết với đột biến histidin của C5 có ái lực tương tự với C5 dạng tự nhiên tại pH trung hòa, trong khi kháng thể tương tự gắn kết với đột biến histidin của C5 với ái lực cao hơn so với C5 dạng tự nhiên ở pH có tính axit).

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế gắn kết với C5 từ hơn một loài. Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 từ người và động vật không phải là người. Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 từ người và khỉ (tức là, khỉ cynomolgus, khỉ rhesus macaque, marmoset, tinh tinh, hoặc khỉ đầu cho).

Theo một khía cạnh, sáng chế cung cấp các kháng thể kháng C5 mà ức chế sự hoạt hóa của C5. Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng C5 được cung cấp mà chống lại sự phân tách của C5 để tạo thành C5a và C5b, do đó ngăn chặn sự phát triển của hoạt tính anaphylatoxic liên quan đến C5a, cũng như ngăn ngừa việc lắp ráp phức tấn công màng C5b-9 (MAC) liên quan đến C5b. Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng C5 được cung cấp để ngăn ngừa sự chuyển hóa của C5 thành C5a và C5b bởi convertaza C5. Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng C5 được cung cấp ngăn ngừa sự truy cập của convertaza C5 tới vị trí phân tách trên C5. Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng C5 được cung cấp ngăn ngừa hoạt tính thiếu máu do tan huyết gây ra bởi sự hoạt hóa của C5. Theo một phương án khác nữa, các

kháng thể kháng C5 theo sáng chế ức chế sự hoạt hóa của C5 qua chuỗi các phản ứng hóa sinh cổ điển và/hoặc chuỗi các phản ứng hóa sinh thay thế.

Theo một khía cạnh, sáng chế cung cấp các kháng thể kháng C5 mà ức chế sự hoạt hóa của C5 biến thể. biến thể C5 đề cập đến biến thể gen của C5 là do sự biến đổi gen như đột biến, đa hình hoặc biến thể allelic. Biến thể gen có thể bao gồm việc xóa, thế hoặc chèn một hoặc nhiều nucleotit. Biến thể C5 có thể bao gồm một hoặc nhiều biến đổi gen trong C5. Theo các phương án nhất định, biến thể C5 có hoạt tính sinh học tương tự như C5 dạng tự nhiên. Biến thể C5 có thể chứa ít nhất một biến thể được chọn từ nhóm bao gồm V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N, và E1437D. Ở đây, R885H, ví dụ, đề cập đến biến thể gen khi arginin ở vị trí 885 được thế bởi histidin. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế ức chế sự hoạt hóa của cả C5 dạng tự nhiên và ít nhất một biến thể C5 được chọn từ nhóm bao gồm V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N, và E1437D.

Theo một khía cạnh, sáng chế cung cấp kháng thể kháng C5 bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu vùng siêu biến đổi (các HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 45-54; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 55-64; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65-74; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 75-84; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 85-94; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95-104.

Theo một khía cạnh, sáng chế cung cấp kháng thể bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 45-54; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 55-64; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65-74. Theo một phương án, kháng thể bao gồm HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65-74. Theo một phương án khác, kháng thể bao gồm HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ

các SEQ ID NO: 65-74 và HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95-104. Theo một phương án khác nữa, kháng thể bao gồm HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65-74, HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95-104, và HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 55-64. Theo một phương án khác nữa, kháng thể bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 45-54; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 55-64; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65-74.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cung cấp kháng thể bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 75-84; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 85-94; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95-104. Theo một phương án, kháng thể bao gồm (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 75-84; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 85-94; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95-104.

Theo khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm (a) miền VH bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 45-54, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 55-64, và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65-74; và (b) miền VL bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 75-84, (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 85-94, và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95-104.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cung cấp kháng thể bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 45-54; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 55-64; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65-74; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit

amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 75-84; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 85-94; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95-104.

Theo một khía cạnh, sáng chế cung cấp kháng thể kháng C5 bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131.

Theo một khía cạnh, sáng chế cung cấp kháng thể bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128. Theo một phương án, kháng thể bao gồm HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128. Theo một phương án khác, kháng thể bao gồm HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128 và HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131. Theo một phương án khác nữa, kháng thể bao gồm HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128, HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131, và HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127. Theo một phương án khác nữa, kháng thể bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cung cấp kháng thể bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131. Theo một phương án, kháng thể bao gồm (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131.

Theo khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm (a) miền VH bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127, và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128; và (b) miền VL bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129, (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130, và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cung cấp kháng thể bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131.

Theo các phương án nhất định, bất kỳ một hoặc nhiều axit amin của kháng thể kháng C5 như được cung cấp trên đây được thế ở các vị trí HVR sau đây: (a)

trong HVR-H1 (SEQ ID NO: 45), tại các vị trí 5, và 6; (b) trong HVR-H2 (SEQ ID NO: 55), tại các vị trí 1, 3, 9, 11, 13, và 15; (c) trong HVR-H3 (SEQ ID NO: 65), tại các vị trí 2, 5, 6, 12, và 13; (d) trong HVR-L1 (SEQ ID NO: 75), tại các vị trí 1, 5, 7, và 9; (e) trong HVR-L2 (SEQ ID NO: 85), tại các vị trí 4, 5, và 6; và (f) trong HVR-L3 (SEQ ID NO: 95), tại các vị trí 2, 4, và 12.

Theo các phương án nhất định, các việc thế là các việc thế bảo toàn, như được cung cấp ở đây. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều việc thế sau đây có thể được thực hiện ở bất kỳ sự kết hợp nào: (a) trong HVR-H1 (SEQ ID NO: 45), M5V hoặc C6A; (b) trong HVR-H2 (SEQ ID NO: 55), C1A hoặc G, Y3F, T9D hoặc E, Y11K hoặc Q, S13D hoặc E, hoặc A15V; (c) trong HVR-H3 (SEQ ID NO: 65), G2A, V5Q hoặc D, T6Y, Y12H, hoặc L13Y; (d) trong HVR-L1 (SEQ ID NO: 75), Q1R, N5Q hoặc G, G7S, D9K hoặc S; (e) trong HVR-L2 (SEQ ID NO: 85), K4T hoặc E, L5T, hoặc A6H, A6 E, hoặc A6Q; (f) trong HVR-L3 (SEQ ID NO: 95) C2S, C2N, hoặc C2T, F4K; hoặc A12T hoặc A12H.

Tất cả các kết hợp có thể của các việc thế trên đây đều được bao gồm bởi các trình tự liên ứng của các SEQ ID NO: 126, 127, 128, 129, 130, và 131 đối với HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3, tương ứng.

Theo bất kỳ phương án nào trên đây, kháng thể kháng C5 được được làm tương thích với người. Theo một phương án, kháng thể kháng C5 bao gồm các HVR như trong bất kỳ phương án nào trên đây, và còn bao gồm khung chấp nhận ở người, tức là, khung miễn dịch globulin ở người hoặc khung liên ứng ở người. Theo một phương án khác, kháng thể kháng C5 bao gồm các HVR như trong bất kỳ phương án nào trên đây, và còn bao gồm VH hoặc VL bao gồm trình tự FR, trong đó các trình tự FR như sau. Đối với miền biến đổi chuỗi nặng, FR1 bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 132-134, FR2 bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 135-136, FR3 bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 137-139, FR4 bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 140-141. Đối với miền miến đổi chuỗi nhẹ, FR1 bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 142-143, FR2 bao

gồm trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 144-145, FR3 bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 146-147, FR4 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 148.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 1-10, Theo các phương án nhất định, trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa lên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc xóa ở bất kỳ một của các SEQ ID NO: 1-10, Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các vùng bên ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH ở bất kỳ một của các SEQ ID NO: 1-10, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, Vh bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 45-54, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 55-64, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65-74.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 được cung cấp, trong đó kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 11-20, Theo các phương án nhất định, trình tự VL có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc xóa ở bất kỳ một của các SEQ ID NO: 11-20, Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các

vùng bên ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VL ở bất kỳ một của các SEQ ID NO: 11-20, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, VL bao gồm một,hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 75-84; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 85-94; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95-104.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 được cung cấp, trong đó kháng thể bao gồm VH như trong bất kỳ các phương án nào được cung cấp trên đây, và VL như trong bất kỳ các phương án nào được cung cấp trên đây. Theo một phương án, kháng thể bao gồm cac trình tự VH và VL ở bất kỳ một của các SEQ ID NO: 1-10 và bất kỳ một của các SEQ ID NO: 11-20, tương ứng, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của các trình tự này.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 10, 106-110, Theo các phương án nhất định, trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc xóa ở bất kỳ một của các SEQ ID NO: 10, 106-110, Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các vùng bên ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH ở bất kỳ một của các SEQ ID NO: 10, 106-110, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, Vh bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ

các SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 10, 106-110, Theo các phương án nhất định, trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc xóa ở bất kỳ một của các SEQ ID NO: 10, 106-110, Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các vùng bên ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH ở bất kỳ một của các SEQ ID NO: 10, 106-110, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, Vh bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID NO:10, Theo các phương án nhất định, trình tự VH là trình tự axit amin của SEQ ID NO:10, Theo các phương án nhất định, trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc xóa trong SEQ ID NO: 10, Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các vùng bên

ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH trong SEQ ID NO: 10 bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, Vh bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 54, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 74.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 106. Theo các phương án nhất định, trình tự VH là trình tự axit amin của SEQ ID NO:106. Theo các phương án nhất định, trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc xóa trong SEQ ID NO: 106. Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các vùng bên ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH trong SEQ ID NO: 106, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, Vh bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 117, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 118, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 121.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 107. Theo các phương án nhất định, trình tự VH là trình tự axit amin của SEQ ID NO:107. Theo các phương án nhất định, trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm

trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc xóa trong SEQ ID NO: 107. Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các vùng bên ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH trong SEQ ID NO: 107, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, Vh bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 117 (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 119, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 121.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 108. Theo các phương án nhất định, trình tự VH là trình tự axit amin của SEQ ID NO:108. Theo các phương án nhất định, trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc xóa trong SEQ ID NO: 108. Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các vùng bên ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH trong SEQ ID NO: 108, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, Vh bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 117 (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 118, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 121.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 109. Theo các phương án nhất định, trình tự VH là trình tự axit amin của SEQ ID NO:109. Theo các phương án

nhất định, trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc xóa trong SEQ ID NO: 109. Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các vùng bên ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH trong SEQ ID NO: 109, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, Vh bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 117 (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 118, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 121.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 110, Theo các phương án nhất định, trình tự VH là trình tự axit amin của SEQ ID NO:110, Theo các phương án nhất định, trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc xóa trong SEQ ID NO: 110, Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các vùng bên ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VH trong SEQ ID NO: 110, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, Vh bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 117 (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 120, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 121.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 được cung cấp, trong đó kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 20, 111-113. Theo các phương án nhất định, trình tự VL có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc xóa ở bất kỳ một của các SEQ ID NO: 20, 111-113. Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các vùng bên ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VL ở bất kỳ một của các SEQ ID NO: 20, 111-113, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, VL bao gồm một,hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 được cung cấp, trong đó kháng thể bao gồm VL có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, Theo các phương án nhất định, trình tự VL là trình tự axit amin của SEQ ID NO:20, Theo các phương án nhất định, trình tự VL có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc xóa trong SEQ ID NO: 20, Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các vùng bên ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VL trong SEQ ID NO: 20, bao gồm các biến đổi

hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, VL bao gồm một,hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 84; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 94; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 104.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 được cung cấp, trong đó kháng thể bao gồm VL có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 111. Theo các phương án nhất định, trình tự VL là trình tự axit amin của SEQ ID NO:111. Theo các phương án nhất định, trình tự VL có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc xóa trong SEQ ID NO: 111. Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các vùng bên ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VL trong SEQ ID NO: 111, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, VL bao gồm một,hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 122; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 123; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 125.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 được cung cấp, trong đó kháng thể bao gồm VL có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 112. Theo các phương án nhất định, trình tự VL là trình tự axit amin của SEQ ID NO:112. Theo các phương án nhất định, trình tự VL có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc

xóa trong SEQ ID NO: 112. Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các vùng bên ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VL trong SEQ ID NO: 112, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, VL bao gồm một,hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 122; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 123; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 125.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 được cung cấp, trong đó kháng thể bao gồm VL có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 113. Theo các phương án nhất định, trình tự VL là trình tự axit amin của SEQ ID NO:113. Theo các phương án nhất định, trình tự VL có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất chứa các việc thế (tức là, các việc thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự mà giữ khả năng gắn kết với C5. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, chèn và/hoặc xóa trong SEQ ID NO: 113. Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa xảy ra ở các vùng bên ngoài các HVR (tức là ở, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng C5 bao gồm trình tự VL trong SEQ ID NO: 113, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của trình tự. Trong một phương án cụ thể, VL bao gồm một,hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 122; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 124; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 125.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 được cung cấp trong đó kháng thể bao gồm VH như trong bất kỳ các phương án nào được cung cấp trên đây, và VL như trong bất kỳ các phương án nào được cung cấp trên đây. Theo một phương án, kháng thể bao gồm cac trình tự VH và VL ở bất kỳ một của các SEQ ID NO: 10, 106-110 và bất kỳ một của các SEQ ID NO: 20, 111-113, tương ứng, bao gồm các biến đổi hậu tịnh tiến của các trình tự này.Theo một phương án,

kháng thể bao gồm trình tự VH của SEQ ID NO:10 và trình tự VL của SEQ ID NO: 20, Theo một phương án, kháng thể bao gồm trình tự VH của SEQ ID NO:106 và trình tự VL của SEQ ID NO: 111. Theo một phương án khác, kháng thể bao gồm trình tự VH của SEQ ID NO:107 và trình tự VL của SEQ ID NO: 111. Theo một phương án khác, kháng thể bao gồm trình tự VH của SEQ ID NO:108 và trình tự VL của SEQ ID NO: 111. Theo một phương án khác, kháng thể bao gồm trình tự VH của SEQ ID NO:109 và trình tự VL của SEQ ID NO: 111. Theo một phương án khác, kháng thể bao gồm trình tự VH của SEQ ID NO:109 và trình tự VL của SEQ ID NO: 112. Theo một phương án khác, kháng thể bao gồm trình tự VH của SEQ ID NO:109 và trình tự VL của SEQ ID NO: 113. Theo một phương án khác, kháng thể bao gồm trình tự VH của SEQ ID NO:110 và trình tự VL của SEQ ID NO: 113.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng C5 được cung cấp trong đó kháng thể bao gồm trình tự VH chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 54, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 74, và trình tự VL chứa (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 84; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 94; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 104.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 được cung cấp trong đó kháng thể bao gồm trình tự VH chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 117, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 118, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 121, và trình tự VL chứa (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 122; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 123; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 125.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 được cung cấp trong đó kháng thể bao gồm trình tự VH chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 117, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 119, và (c)

HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 121, và trình tự VL chứa (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 122; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 123; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 125.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 được cung cấp trong đó kháng thể bao gồm trình tự VH chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 117, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 118, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 121, và trình tự VL chứa (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 122; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 124; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 125.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 được cung cấp trong đó kháng thể bao gồm trình tự VH chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 117, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 120, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 121, và trình tự VL chứa (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 122; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 124; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 125.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế bao gồm VH như trong bất kỳ các phương án nào được cung cấp trên đây và vùng ổn định chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 33, 34, 35, 114, 115, và 116. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế bao gồm VL như trong bất kỳ các phương án nào được cung cấp trên đây và vùng ổn định chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của bất kỳ các SEQ ID NO: 36, 37, và 38.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cung cấp kháng thể gắn với cùng epitop như kháng thể kháng C5 được cung cấp ở đây. Ví dụ, theo các phương án nhất định, kháng thể được cung cấp gắn với cùng epitop là kháng thể mô tả trong bảng 2.

Như được minh họa trong các ví dụ dưới đây, tất cả các kháng thể kháng C5 mô tả trong bảng 2 được tập hợp thành nhóm vào cùng một thùng epitop của C5 và cho các đặc tính gắn kết phụ thuộc pH.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cung cấp kháng thể gắn với cùng epitop là kháng thể được cung cấp ở đây. Theo một khía cạnh khác, sáng chế cung cấp kháng thể gắn với cùng epitop là kháng thể được mô tả trong các bảng 7 hoặc 8. Theo các phương án nhất định, kháng thể được cung cấp gắn với epitop trong đoạn bao gồm các axit amin 33-124 của chuỗi beta của C5 (SEQ ID NO: 40). Theo các phương án nhất định, kháng thể được cung cấp gắn với epitop trong chuỗi beta của C5 (SEQ ID NO: 40) mà bao gồm ít nhất một đoạn được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin 47-57, 70-76, và 107-110, Theo các phương án nhất định, kháng thể được cung cấp gắn với epitop trong đoạn của chuỗi beta của C5 (SEQ ID NO: 40) mà bao gồm ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Thr47, Glu48, Ala49, Phe50, Asp51, Ala52, Thr53, Lys57, His70, Val71, His72, Ser74, Glu76, Val107, Ser108, Lys109, và His110, Theo một phương án khác, epitop của kháng thể kháng C5 theo sáng chế là epitop đối xứng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, kháng thể kháng C5 theo bất kỳ một trong các phương án trên đây là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể ở người, được làm tương thích với người hoặc dạng khảm. Theo một phương án, kháng thể kháng C5 là đoạn kháng thể, tức là, đoạn Fv, Fab, Fab', scFv, thể- dia, hoặc $F(ab')_2$. Theo một phương án khác, kháng thể là trình tự có độ dài đầy đủ, tức là, kháng thể IgG1 hoặc IgG4 nguyên vẹn hoặc lớp kháng thể khác hoặc isotyp như được định nghĩa ở đây.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 theo bất kỳ một trong các phương án trên đây có thể kết hợp với bất kỳ các đặc trưng nào, riêng rẽ hoặc kết hợp, như được mô tả trong các phần 1-7 dưới đây:

1. Ái lực kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được cung cấp ở đây có hằng số phân ly (Kd) là:

≤ 1 micro M, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, or ≤ 0.001 nM (tức là, 10^{-8} M hoặc ít hơn, tức là, từ 10^{-8} M tới 10^{-13} M, tức là, từ 10^{-9} M tới 10^{-13} M).

Theo một phương án, Kd được xác định bởi thử nghiệm gắn kết kháng nguyên được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ (RIA). Theo một phương án, RIA được thực hiện với phiên bản Fab của kháng thể và kháng nguyên của nó. Ví dụ, ái lực gắn kết dung dịch của các Fab đối với kháng nguyên được xác định bằng cách cân bằng Fab với nồng độ tối thiểu là (^{125}I)-kháng nguyên được dán nhãn với sự có mặt của một chuỗi chuẩn độ của kháng nguyên không được dán nhãn, sau đó giữ kháng nguyên được được gắn kết với đĩa được phủ kháng thể kháng-Fab (tham khảo, tức là, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Để tạo điều kiện thử nghiệm, MICROTITER (nhãn được đã đăng ký) các đĩa đa giếng (Thermo Scientific) được phủ qua đêm với 5 microgam/ml của kháng thể kháng Fab (Cappel Labs) trong 50 mM cacbonat natri (pH 9,6), và sau đó bị chặn bởi 2% (w/v) albumin huyết thanh bò trong PBS trong hai tới năm giờ ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 34 độ C). Trong đĩa không bút bám (Nunc #269620), 100 pM hoặc 26 pM [^{125}I]-kháng nguyên được trộn với chuỗi các dung dịch pha loãng của Fab (tức là, phù hợp với việc đánh giá kháng thể kháng VEGF, Fab-12, trong Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Fab được ủ qua đêm; tuy nhiên, sự ủ này có thể tiếp tục trong khoảng thời gian dài hơn (tức là, khoảng 65 giờ) để đảm bảo đạt được sự vân bằng. Do đó, các hỗn hợp này được chuyển vào tấm chụp để ủ ở nhiệt độ trong phòng (tức là, khoảng một giờ). Dung dịch sau đó được loại bỏ và đĩa được rửa tám lần với 0,1% polysorbat 20 (TWEEN-20 (nhãn được đã đăng ký)) trong PBS. Khi các đĩa này đã khô, 150 microlit/giếng của scintillant (MICROSCINT-20™; Packard) được bổ sung, và các đĩa được đếm trên bộ đếm gamma TOPCOUNT™ (Packard) trong mười

phút. Nồng độ của mỗi Fab ít hơn hoặc bằng 20% gắn kết tối đa được chọn để sử dụng trong các thử nghiệm gắn kết cạnh tranh.

Theo một phương án khác, Kd được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng gen nguyên sinh bề mặt BIACORE (nhãn được đã đăng ký). Ví dụ, thử nghiệm sử dụng BIACORE (nhãn được đã đăng ký)-2000 hoặc BIACORE (nhãn được đã đăng ký)-3000 (BIACORE (nhãn được đã đăng ký), Inc., Piscataway, NJ) được thực hiện ở 25 độ C với chip kháng nguyên cố định CM5 ở ~10 đơn vị đáp ứng (RU). Theo một phương án, các chip cảm biến sinh học dextran carboxymethylat hóa (CM5, BIACORE (nhãn được đã đăng ký), Inc.) được hoạt hóa với N-ethyl-N'- (3-dimetylaminopropyl)-carbodiimit hydroclorua (EDC) và N-hydroxysucxinimit (NHS) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Kháng nguyên được pha loãng với 10 mM natri axetat, pH 4,8, đến 5 microgam/ml (~0,2 micro M) trước khi tiêm với tốc độ dòng chảy là 5 microlit/phút để đạt được khoảng 10 đơn vị đáp ứng (RU) của protein được nối. Sau khi tiêm kháng nguyên, 1 M etanolamin để tiêm để ngăn chặn các nhóm không phản ứng. Đối với việc đo động lực học, hai dung dịch của Fab (0,78 nM tới 500 nM) được tiêm trong PBS với 0,05% polysorbat 20 (TWEEN-20™) có hoạt tính bề mặt (PBST) ở 25 độ C với tốc độ dòng chảy vào khoảng 25 microlit/phút. Tỷ lệ liên kết (k_{on}) và tỷ lệ phân ly (k_{off}) được tính toán sử dụng mẫu gắn kết Langmuir một với một đơn giản (BIACORE (nhãn được đã đăng ký) Phiên bản phần mềm đánh giá 3,2) bằng cách đồng thời điều chỉnh ký hiệu cảm biến liên kết và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (Kd) được tính toàn như là tỷ số k_{off}/k_{on}. Tham khảo, tức là, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Nếu tỷ lệ trên vượt quá 10^6 M^{-1} s^{-1} bởi thử nghiệm cộng hưởng gen nguyên sinh bề mặt trên đây, tỷl ệ này có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật tôi huỳnh quang để đo mức tăng hoặc giảm trong cường độ phát huỳnh quang (phát sinh từ trường = 295 nm; phát xạ = 340 nm, 16 nm band-pass) ở 25 độ C của 20 nM kháng thể kháng kháng nguyên (dạng Fab) trong PBS, pH=7,2, với sự có mặt của nồng độ kháng nguyên tăng lên như được đo trong quan phổ kế, như

thiết bị đo ảnh phổ được trang bị dòng ngưng (Dụng cụ Aviv) hoặc thiết bị đo ảnh phổ 8000-chuỗi SLM-AMINCO™ (ThermoSpectronic) với chậu thủy tinh được khuấy.

2. Các đoạn kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được cung cấp ở đây là đoạn kháng thể. Các đoạn kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, và các đoạn scFv, và các đoạn mô khác tả dưới đây. Để xem xét các đoạn kháng thể cụ thể, tham khảo Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003). Để xem xét các đoạn scFv, tham khảo, tức là, Pluckthun, trong pharmacology of of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg và Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); tham khảo thêm WO 93/16185; và ác US Patent No. 5,571,894 và 5,587,458. Để thảo luận về Fab và $F(ab')_2$ các đoạn bao gồm các gốc epitop gắn kết thụ thể thu hồi và gia tăng thời gian bán hủy trong cơ thể, tham khảo US Patent No. 5,869,046.

Các thể dia- là các đoạn kháng thể có hai kháng nguyên-vị trí gắn kết mà có thể có hóa trị hai hoặc đa đặc hiệu. Tham khảo, ví dụ, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); và Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993). Các thể Tria và các thể tetra còn được mô tả trong Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Các kháng thể miền đơn là các đoạn kháng thể bao gồm tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo các phương án nhất định, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn ở người (Domantis, Inc., Waltham, MA; tham khảo, tức là, US Patent No. 6,248,516).

Các đoạn kháng thể có thể được tạo bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn bởi sự phân cắt proteolytic của kháng thể nguyên vẹn cũng như việc sản xuất bởi các tế bào chủ tái tổ hợp (tức là, *E. coli* hoặc thể thực khuẩn), như mô tả ở đây.

3. Các kháng thể dạng khảm và được làm tương thích với người

Theo các phương án nhất định, kháng thể được cung cấp ở đây là kháng thể dạng khảm. Các kháng thể dạng khảm riêng biệt được mô tả, tức là ở, trong US Patent No. 4,816,567; và Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Trong một ví dụ, kháng thể dạng khảm bao gồm vùng biến đổi không phải ở người (tức là, vùng biến đổi có nguồn gốc từ chuột cống, chuột đồng, thỏ,, hoặc động vật linh trưởng không phải là người, như khỉ) và vùng ổn định ở người. Trong các ví dụ khác, kháng thể dạng khảm là kháng thể "lớp chuyển mạch" trong đó lớp hoặc phân lớp đã được thay đổi từ kháng thể gốc của nó. Các kháng thể dạng khảm bao gồm các đoạn gắn két kháng nguyên của nó.

Theo các phương án nhất định, kháng thể dạng khảm là kháng thể được làm tương thích với người. Thông thường, kháng thể không phải ở người được được làm tương thích với người để làm giảm khả năng miễn dịch đối với con người, đồng thời duy trì độ đặc hiệu và ái lực của kháng thể không phải ở người ban đầu. Nói chung, kháng thể được làm tương thích với người bao gồm một hoặc nhiều miền biến đổi trong đó các HVR, tức là, các CDR, (hoặc các phần của nó) có nguồn gốc từ kháng thể không phải ở người, và các FR (hoặc các phần của nó) có nguồn gốc từ các trình trự kháng thể ở người. Kháng thể được làm tương thích với người tùy ý sẽ còn bao gồm ít nhất một phần của vùng ổn định ở người. Theo một số phương án, một số các gốc FR trong kháng thể được làm tương thích với người được thế với các gốc tương ứng từ kháng thể không phải ở người (tức là, kháng thể trong đó các gốc HVR được sinh ra), tức là, để khôi phục hoặc cải thiện sự đặc hiệu hoặc ái lực của kháng thể.

Các kháng thể được làm tương thích với người và các phương pháp tạo các kháng thể này được xem xét, tức là ở, trong Almagro và Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008), và được mô tả hơn nữa ở, tức là ở, trong Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); Các US Patent No. 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, và 7,087,409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (mô tả sự ghép vùng quyết

định đặc hiệu (SDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (mô tả "sự tái lại bề mặt"); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (mô tả "thay thế FR "); và Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) và Klimka et al., Br. J. Cancer 83:252-260 (2000) (mô tả "hướng dẫn lựa trọn" tiếp cận để thay thế FR).

Các vùng khung ở người có thể được sử dụng để làm tương thích với người bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: các vùng khung được chọn sử dụng phương pháp "phù hợp nhất" (tham khảo, tức là, Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)); các vùng khung có nguồn gốc từ trình tự liên ứng của các kháng thể ở người của phân nhóm cụ thể của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng (tham khảo, tức là, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); và Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)); các vùng khung người trưởng thành (xôma được đột biến) hoặc các vùng khung tế bào mầm ở người (tham khảo, tức là, Almagro và Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)); và các vùng khung có nguồn gốc từ việc kiểm tra thư viện FR (tham khảo, tức là, Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) và Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).

4. Các kháng thể ở người

Theo các phương án nhất định, kháng thể được cung cấp ở đây là kháng thể ở người. Các kháng thể ở người có thể được sản xuất sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Các kháng thể ở người được mô tả trong van Dijk và van de Winkel, Curr. Opin. Pharma. 5:368-74 (2001) và Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008).

Các kháng thể ở người có thể được điều chế bằng cách tiêm chất kháng nguyên vào động vật biến đổi gen đã được cải biến để sản xuất các kháng thể còn nguyên vẹn ở người hoặc các kháng thể còn nguyên vẹn với các vùng biến đổi ở người để đáp ứng với các thách thức thuộc kháng nguyên. Các động vật này thường chứa tất cả hoặc một phần vị trí gen globulin miễn dịch ở người, mà thay thế vị trí gen globulin miễn dịch nội sinh, hoặc hiện diện không mang tình trạng di chuyển nhiễm sắc thể hoặc tích hợp một cách ngẫu nhiên vào các nhiễm

sắc thể của động vật. Ở trong chuột được biến đổi gen này, vị trí gen globulin miễn dịch nôi sinh thường bị vô hiệu hóa. Để xem xét các phương pháp thu được các kháng thể ở người từ các động vật biến đổi gen, tham khảo Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). Tham khảo thêm, tức là, các US Patent No. 6,075,181 và 6,150,584 mô tả kỹ thuật XENOMOUSE™; US Patent No. 5,770,429 mô tả kỹ thuật HUMAB(nhãn hiệu đã được đăn ký); US Patent No. 7,041,870 mô tả kỹ thuật K-M MOUSE (nhãn được đã đăng ký), và Đơn sáng chế cong bố số US No. US 2007/0061900, mô tả kỹ thuật VELOCIMOUSE(nhãn được đã đăng ký)). Các vùng biến đổi ở người từ các kháng thể còn nguyên vẹn được tạo bởi các động vật này có thể còn được cải biến, tức là, bằng cách kết hợp với vùng ổn định ở người khác nhau.

Các kháng thể ở người có thể còn được tạo bằng các phương pháp dựa trên việc lai tế bào. Các dòng tế bào tủy xương người và các dòng tế bào dị hợp tử chuột để sản xuất các kháng thể đơn dòng ở người have được mô tả. (Tham khảo, tức là, Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Kháng thể Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Dekker, Inc., New York, 1987); và Boerner et al., J. Immunol. 147:86 (1991).) Human antibodies generated via human B-cell hybridoma technology còn được mô tả trong Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-3562 (2006). Các phương pháp bổ sung bao gồm các mô tả, ví dụ, trong US Patent No. 7,189,826 (mô tả việc sản xuất các kháng thể đơn dòng ở người IgM từ các dòng tế bào lai) và Ni, Xiandai Mianyixue 26(4):265-268 (2006) (mô tả các tế bào lai ở người-người). Kỹ thuật lai tế bào ở người (kỹ thuật Trioma) còn được mô tả trong Vollmers, Histology và Histopathology 20(3):927-937 (2005) và Vollmers, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27(3):185-191 (2005).

Các kháng thể ở người còn có thể được tạo bằng cách phân lập các trình tự miền biến đổi nhân bản Fv được chọn từ các thư viện hiển thị thể thực khuẩn có nguồn gốc từ người. Các trình tự miền biến đổi này có thể còn được kết hợp với

miền ổn định ở người mong muốn. Các kỹ thuật để lựa chọn các kháng thể ở người từ cá thư việnkháng thể được mô tả sau đây.

5. Các kháng thể có nguồn gốc từ thư viện

Các kháng thể theo sáng chế có thể bị phan lập bằng cách kiểm tra các thư viện tổ hợp đối với các kháng thể có các hoạt tính mong muốn. Ví dụ, một loạt các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật để tạo các thư viện hiển thị thể thực khuẩn và kiểm tra các thư viện này đối với các kháng thể nắm giữ các đặc tính gắn kết mong muốn. Các phương pháp này đã được xem xét, tức là, trong Hoogenboom et al., Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) và mô tả khác, tức là, trong 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).

Trong phương pháp hiển thị thể thực khuẩn nhất định, các kho của các gen VH và VL được nhân bản riêng rẽ bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và được tái tổ hợp ngẫu nhiên trong thư viện thể thực khuẩn, sau đó có thể được kiểm tra đối với thể thực khuẩn gắn kết kháng nguyên như mô tả trong Winter et al., Ann. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994). Thể thực khuẩn thường hiển thị các đoạn kháng thể, hoặc như các đoạn Fv (scFv) hoặc như các đoạn Fab chuỗi đơn. Các thư viện từ các nguồn gây miễn dịch cung cấp các kháng thể ái lực cao so với chất kháng nguyên mà không cần tạo tế bào lai. Ngoài ra, có thể còn được nhân bản (tức là, từ người) để cung cấp nguồn duy nhất của các kháng thể cho nhiều kháng nguyên tự nó và không tự nó mà không có bất kỳ sự tự miễn dịch nào như mô tả bởi Griffiths et al., EMBO J, 12:725-734 (1993). Cuối cùng, các thư viện này còn có thể được tạo bàng cách nhân bản tổng hợp các đoạn gen không được sắp xếp lại hình V từ các tế bào gốc, và sử dụng các PCR Primer

chứa trình tự ngẫu nhiên để mã hóa các vùng biến đổi mức độ cao CDR3 và thực hiện việc sắp xếp lại trong ống nghiệm, như mô tả bởi Hoogenboom, J. Mol. Biol. 227:381-388 (1992). Các công bố sáng chế mô tả các thư viện thể thực khuẩn kháng thể ở người bao gồm, ví dụ: US Patent No. 5,750,373, và các US Publ.No. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, và 2009/0002360,

Các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể tách từ các thư viện kháng thể ở người được coi là các kháng thể ở người hoặc các đoạn kháng thể ở người ở đây.

6. Các kháng thể đa đặc hiệu

Theo các phương án nhất định, kháng thể được cung cấp ở đây là kháng thể nhiều đặc hiệu, tức là, kháng thể đa đặc hiệu. Các kháng thể đa đặc hiệu các kháng thể đơn dòng mà gắn kế đặc hiệu với ít nhất hai vị trí khác nhau. Theo các phương án nhất định, một trong số các các đặc gắn kết là dành cho C5 và còn lại là dành cho bất kỳ kháng nguyên nào. Theo các phương án nhất định, các kháng thể dạng khảm may gắn kết với hai epitop khác nhau của C5. Các kháng thể dạng khảm có thể còn được sử dụng để định vị các tác nhân gây độc tế bào tới các tế bào biểu hiện C5. Các kháng thể dạng khảm có thể được điều chế như các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể có độ dài đầy đủ.

Các kỹ thuật để tạo các kháng thể đa đặc hiệu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc đồng biểu hiện tái tổ hợp của hai cặp chuỗi nặng -chuỗi nhẹ globulin miễn dịch có các đa đặc hiệu khác nhau (tham khảo Milstein và Cuello, Nature 305:537 (1983)), WO 93/08829, và Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991)), và kỹ thuật "khóa trong lỗ" (tham khảo, tức là, US Patent No. 5,731,168). Các kháng thể đa đặc hiệu còn có thể được tạo bằng công nghệ hiệu ứng lái tĩnh điện để tạo các phân tử heterodime Fc kháng thể (WO 2009/089004A1); liên kết chéo hai hoặc nhiều kháng thể hoặc các đoạn (tham khảo, tức là, US Patent No. 4,676,980, và Brennan et al., Science 229:81 (1985)); sử dụng sự kéo khóa leuxin để sản xuất các kháng thể đặc hiệu kép (tham khảo, tức là, Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)); sử

dụng kỹ thuật "thể- dia" để tạo các đoạn kháng thể đặc hiệu kép (tham khảo, tức là, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)); và sử dụng các chất nhị trùng chuỗi đơn (scFv) (tham khảo, tức là, Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994)); và điều chế các kháng thể ba đặc hiệu như được mô tả, tức là, trong Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

Các kháng thể di truyền học có ba hoặc nhiều chức vị trí gắn kết kháng nguyên chức năng, bao gồm " các kháng thể bạch tuộc," còn được bao gồm ở đây (tham khảo, tức là, US 2006/0025576).

Kháng thể hoặc đoạn ở đây còn bao gồm " FAb hoạt động kép" hoặc "DAF" bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn với C5 cũng như các khác nguyên khác (tham khảo, ví dụ US 2008/0069820).

7. Các biến thể của kháng thể

Theo các phương án nhất định, các biến thể trình tự axit amin của các kháng thể được cung cấp ở đây được đưa ra. Ví dụ, các biến thể này có thể cải thiện ái lực gắn kết và/hoặc các đặc tính sinh học khác của kháng thể. Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể có thể được điều chế bằng cách bổ sung các sự cải biến thích hợp vào trình tự nucleotit mã hóa kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các cải biến này bao gồm, ví dụ, xóa bỏ, và/hoặc chèn vào và/hoặc thế các gốc trong các trình tự axit amin của kháng thể. Bất kỳ sự sự kết hợp của việc xóa, chèn, và thế có thể được thực hiện để đi đến kết cấu cuối cùng, với điều kiện cấu trúc cuối cùng này có các đặc tính mong muốn, tức là, gắn kết kháng nguyên.

a. Các biến thể của việc thế, chèn, và xóa

Theo các phương án nhất định, các biến thể kháng thể có một hoặc nhiều sự thế axit amin được cung cấp. Các vị trí đối với quy trình đột biến thay thế bao gồm các HVR và các FR. Các việc thế bảo toàn được chỉ ra trong bảng 1 dưới tiêu đề "các việc thế được ưu tiên." Nhiều thay đổi đáng kể được cung cấp trong bảng 1 dưới tiêu đề "các việc thế mẫu," và như được mô tả khác dưới đây liên

quan đến các lớp chuỗi bên axit amin. Việc thế Axit amin có thể được đưa vào kháng thể được quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc để hoạt hóa một cách mong muốn, tức là, gắn kết kháng nguyên được duy trì/cải thiện, khả năng miễn dịch giảm, hoặc cải thiện ADCC hoặc CDC.

Bảng 1

Gốc ban đầu	Các việc thế mẫu	Các việc thế được ưu tiên
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
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; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; 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; Norleucine	Leu

Các axit amin có thể được phân loại theo các đặc tính chuỗi bên thông thường: (1) tính kỵ nước: Norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) tính ưa nước: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) axit: Asp, Glu; (4) bazơ: His, Lys, Arg; (5) các gốc ảnh hưởng tới sự định hướng của chuỗi: Gly, Pro; và (6) chất thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các việc thế không bảo toàn sẽ gây ra sự trao đổi thành viên của một trong các lớp này với lớp khác.

Một dạng biến thể thế liên quan đến việc thay thế một hoặc nhiều gốc vùng siêu biến đổi của kháng thể gốc (tức là, kháng thể được làm tương thích với người hoặc ở người). Nói chung, (các) biến thể được chọn để nghiên cứu thêm sẽ có các cải biến (tức là, các việc cải thiện) đối với các đặc tính sinh học nhất định (tức là, tăng ái lực, giảm khả năng miễn dịch) liên quan đến kháng thể gốc và/hoặc sẽ duy trì các đặc tính sinh học nhất định của kháng thể gốc. Biến thể thay thế mẫu là kháng thể trưởng thành có ái lực, có thể được tạo ra một cách thuận tiện, tức là, sử dụng các kỹ thuật trưởng thành ái lực dựa trên sự hiện thị thể thực khuẩn như được mô tả ở đây. Tóm lại, một hoặc nhiều gốc HVR được biến đổi và các biến thể kháng thể hiển thị trên thể thực khuẩn và sàng lọc đối với hoạt tính sinh học cụ thể (tức là, ái lực gắn kết).

Các sự thay đổi (tức là, các sự thế) có thể được thực hiện trong các HVR, tức là, để cải thiện ái lực kháng thể. Các sự thay đổi này có thể được thực hiện trong "điểm nóng"HVR tức là, các gốc được mã hóa bởi các codon trải qua sự đột biến ở tần số cao trong suốt quá trình đột biến xôma (tham khảo, tức là, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)), và/hoặc các gốc tiếp xúc kháng nguyên, với biến thể VH hoặc VL được thử nghiệm đối với ái lực gắn kết. Ái lực phát triển bằng cách xây dựng và tái chọn lọc từ các thư viện thứ cấp đã được mô tả, tức là, trong Hoogenboom et al., Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) Theo một số phương án của ái lực phát triển, sự đa dạng được đưa vào các gen biến đổi được chọn để phát triển bằng bất kỳ phương pháp khác nhau (tức là, PCR dễ bị lỗi, xáo trộn chuỗi, hoặc đột biến theo hướng oligonucleotit). Thư viện thứ cấp sau đó được tạo ra. Thư viện này được sàng lọc để nhận dạng bất kỳ các biến thể kháng thể có ái lực mong muốn. Phương pháp khác để đưa tính đa dạng bao gồm phương pháp tiếp cận hướng HVR, trong đó một số gốc HVR (tức là, 4-6 gốc tại một thời điểm) được sắp xếp ngẫu nhiên. Các gốc HVR có liên quan đến việc gắn kết kháng nguyên có thể được xác định cụ thể, tức là, sử dụng quy trình

đột biến hoặc mô hình quét alanin. CDR-H3 và CDR-L3 thường được làm mục tiêu.

Theo các phương án nhất định, việc thế, chèn, hoặc xóa có thể xuất hiện trong một hoặc nhiều HVR miễn là các sự biến đổi này không làm giảm đáng kể khả năng của kháng thể gắn kết kháng nguyên. Ví dụ, các biến đổi bảo toàn (tức là, các việc thế bảo toàn như được cung cấp ở đây) không làm giảm ái lực gắn kết có thể được tạo trong các HVR. Các biến đổi này có thể, ví dụ, ở bên ngoài kháng nguyên tiếp xúc với các gốc trong các HVR. Theo các phương án nhất định của các trình tự biến thể VH và VL được cung cấp trên đây, mỗi HVR hoặc không thay đổi, hoặc chứa không nhiều hơn một, hai hoặc ba việc thế axit amin.

Phương pháp hữu ích để xác định các gốc hoặc các vùng kháng thể có thể được nhắm mục tiêu cho sự đột biến được gọi là " sự đột biến quét alanin " như mô tả bởi Cunningham, Science 244:1081-1085 (1989). Theo phương pháp này, gốc hoặc nhóm của các gốc đích (tức là, các gốc mang điện tích như arg, asp, his, lys, và glu) được xác định và được thay thế bởi axit amin mang điện tích trung tính hoặc âm tính (tức là, alanin hoặc polyalanin) để xác định liệu sự tương tác của kháng thể với kháng nguyên bị ảnh hưởng hay không. Các sự thế khác có thể được đưa vào ở các vị trí axit amin chứng minh độ nhạy của chức năng với các việc thế ban đầu. Ngoài ra hoặc hơn nữa, cấu trúc tinh thể của phức kháng nguyên-kháng thể để xác định các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc và các gốc lân cận này có thể được nhắm hoặc được loại bỏ như là các ứng cử viên để thế. Các biến thể có thể được sàng lọc để xác định liệu chúng có chứa các đặc tính mong muốn hay không.

Chèn trình tự axit amin bao gồm các hỗn hợp đầu amino và/hoặc carboxyl có chiều dài từ gốc đến các polypeptit chứa chứa hơn một trăm gốc, cũng như việc chèn nội trình tự của các gốc axit amin đơn hoặc đa. Các ví dụ của việc chèn đầu mút bao gồm kháng thể có gốc metionyl đầu N. Các biến thể chèn khác của phân tử kháng thể bao gồm sự kết hợp đầu N hoặc đầu C của kháng thể

với enzym (tức là, cho ADEPT) hoặc polypeptit làm tăng thời gian bán hủy huyết thanh của kháng thể.

b. Các biến thể glycosyl hóa

Theo các phương án nhất định, kháng thể được cung cấp ở đây được thay đổi để tăng hoặc giảm mức độ mà kháng thể được glycosylat hóa. Việc bổ sung hoặc xóa các vị trí glycosyl hóa với một kháng thể có thể được thực hiện một cách thuận tiện bằng cách thay đổi trình tự axit amin để một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa được tạo hoặc loại bỏ.

Khi kháng thể bao gồm vùng Fc, hydratcacbon gắn kết vào có thể được thay đổi. Các kháng thể tự nhiên được sản xuất bởi các tế bào động vật có vú thường bao gồm oligosaccharit hai anten mạch nhánh thườn được gắn kết bởi sự liên kết N-với Asn297 của miền CH2 của vùng Fc. Tham khảo, tức là, Wright et al., TIBTECH 15:26-32 (1997). Oligosaccharit có thể bao gồm các hydratcacbon khác nhau, tức là, mannoza, N-axetyl glucosamin (GlcNAc), galactoza, và axit sialic, cũng như fucoza được gắn tới GlcNAc trong “thân" của cấu trúc oligosaccharit hai anten. Theo một số phương án, các sự cải biến của oligosaccharit trong kháng thể theo sáng chế có thể được thực hiện để tạo các biến thể kháng thể có các đặc tính được cải thiện nhất định.

Theo một phương án, các biến thể kháng thể được cung cấp có hydratcacbon cấu trúc mà thiếu fucoza gắn kết (trực tiếp hoặc gián tiếp) tới vùng Fc. Ví dụ, lượng fucoza trong kháng thể có thể từ 1% đến 80%, từ 1% đến 65%, từ 5% đến 65% hoặc from 20% đến 40%. Lượng fucoza được xác định bằng cách tính toán lượng trung bình của fucoza trong chuỗi đường ở Asn297, liên quan đến tổng các cấu trúc glyco gắn kết với Asn 297 (ví dụ các cấu trúc phức, lai và mannoza cao) như được đo bởi quang phổ khối MALDI-TOF, như mô tả trong WO 2008/077546, ví dụ. Asn297 đề cập đến gốc asparagin được tìm thấy ở vị trí khoảng 297 trong vùng Fc (số Eu của các gốc vùng Fc); tuy nhiên, Asn297 có thể còn được tìm thấy khoảng +/- 3 các axit amin xuôi dòng hoặc ngược dòng của vị trí 297, tức là, giữa các vị trí 294 và 300, do các biến đổi

trình tự không đáng kể trong các kháng thể. Such các biến thể fucosyl hóa có thể có chức năng ADCC được cải thiện. Tham khảo, tức là, các US Patent Publication No. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Các ví dụ của các công bố liên quan đến "khử fucosylat hóa" hoặc "thiếu fucoza" các biến thể kháng thể bao gồm: 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). Các ví dụ của các dòng tế bào có khả năng sản xuất các kháng thể khử fucosylat hóa bao gồm các tế bào Lec13 CHO thiếu protein fucosyl hóa (Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); US 2003/0157108, Presta, L; và WO 2004/056312, Adams et al., cụ thể ở ví dụ 11), và các dòng tế bào gây mê, như alpha-1,6-fucosyltransferaza gen, FUT8, các tế bào CHO gây mê (tham khảo, tức là, Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87:614 (2004); Kanda et al., Biotechnol. Bioeng. 94(4):680-688 (2006); và WO2003/085107).

Các các biến thể kháng thể còn được cung cấp với các oligosaccharit cắt đôi, tức là, trong đó oligosaccharit hai anten được gắn kết với vùng Fc của kháng thể được cắt đôi bởi GlcNAc. Các biến thể kháng thể này có thể có chức năng fucosyl hóa giảm và/hoặc ADCC được cải thiện. Các ví dụ của các biến thể kháng thể này được mô tả, tức là, trong WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); US Patent No. 6,602,684 (Umana et al.); và US 2005/0123546 (Umana et al.). Các biến thể kháng thể có ít nhất một gốc galactoza trong oligosaccharit được gắn với vùng Fc còn được cung cấp. Các biến thể kháng thể có thể có chức năng CDC được cải thiện. Các biến thể kháng thể được mô tả, tức là, trong WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); và WO 1999/22764 (Raju, S.).

c. Các biến thể vùng Fc

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều sự cải biến axit amin có thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể được cung cấp ở đây, do đó tạo ra biến thể vùng Fc. Biến thể vùng Fc có thể bao gồm trình tự vùng Fc ở người (tức là, vùng IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 Fc ở người) bao gồm sự cải biến axit amin (tức là, sự thế) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể có một số nhưng không phải tất cả các chức năng hiệu quả, làm cho nó trở thành ứng cử viên mong muốn cho các ứng dụng trong đó thời gian bán hủy của kháng thể in vivo là quan trọng còn một số các chức năng hiệu quả (như bổ thể và ADCC) là không cần thiết hoặc có hại. Trong các thử nghiệm tính gây độc tế bào in vitro và/hoặc in vivo có thể được tiến hành băng để xác định việc giảm/xuy yếu các hoạt tính CDC và/hoặc ADCC. Ví dụ, thử nghiệm gắn kết thụ thể Fc (FcR) có thể được tiến hành để đảm bảo rằng kháng thể thiếu gắn kết Fc gamma R (do đó có thể thiếu hoạt tính ADCC), nhưng duy trì khả năng gắn kết FcRn. Các tế bào sơ cấp để làm trung gian ADCC, các tế bào NK, biểu hiện Fc gamma RIII, trong khi các bạch cầu đơn nhân biểu hiện Fc gamma RI, Fc gamma RII và Fc gamma RIII. Việc biểu hiện FcR trên các tế bào hematopoietic được tóm tắt trong bảng 3 ở trang 464 Ravetch và Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Các ví dụ của không có giới hạn của thử nghiệm in vitro để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử được mô tả trong US Patent No. 5,500,362 (tham khảo, tức là, Hellstrom et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) và Hellstrom et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); US Pat. No. 5,821,337 (tham khảo Bruggemann et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Ngoài ra các phương pháp thử nghiệm phi phóng xạ có thể được sử dụng (tham khảo, ví dụ, thử nghiệm tính gây độc tế bào phi phóng xạ CTI™ đối với dòng chảy cytometry (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); và CytoTox 96 (nhãn được đã đăng ký) thử nghiệm tính gây độc tế bào phi phóng xạ (Promega, Madison, WI)). Các tế bào phản ứng hiệu quả đối với các thử nghiệm bao gồm các tế bào đơn nhân huyết tương ngoại biên (PBMC) và

các tế bào giết tự nhiên (NK). Ngoài ra hoặc hơn nữa, hoạt tính ADCC của phân tử có thể được đánh giá in vivo, tức là, ở mẫu động vật như được bộc lộ trong Clynes et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Các thử nghiệm gắn kết C1q còn có thể được thực hiện để kháng thể không thể liên kết tới C1q và do dód thiếu hoạt tính CDC. Tham khảo, tức là, gắn kết C1q và C3c ELISA trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá hoạt tính bổ trợ, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện (tham khảo, hoặc ví dụ, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg et al., Blood 101:1045-1052 (2003); và Cragg et al., Blood 103:2738-2743 (2004)). Gắn kết FcRn và việc xác định độ trống/thời gian bán hủy in vivo can còn có thể được thực hiện sử dụng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật (tham khảo, tức là, Petkova et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Các kháng thể có các chức năng hiệu quả giảm bao gồm các kháng thể với các sự thế của một hoặc nhiều gốc vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (US Patent No. 6,737,056). Các đột biến Fc bao gồm các đột biến Fc với các sự thế ở hai hoặc nhiều vị trí của axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm đột biến Fc được gọi là "DANA" có các sự thế ở các gốc 265 và 297 tới alanin (US Patent No. 7,332,581).

Các biến thể kháng thể nhất định có sự gắn kết cải thiện hoặc giảm đi tới các FcR được mô tả. (tham khảo, tức là, US Patent No. 6,737,056; WO 2004/056312, và Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).)

Theo các phương án nhất định, biến thể kháng thể bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều việc thế axit amin mà cải thiện ADCC, tức là, các việc thế tại các vị trí 298, 333, và/hoặc 334 của vùng Fc (số EU của các gốc).

Theo một số phương án, sự biến đổi được thực hiện trong vùng Fc mà dẫn đến sự thay đổi (tức là, hoặc cải thiện hoặc giảm đi) C1q gắn kết và/hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ sung (CDC), tức là, như mô tả trong US Patent No.

6,194,551, WO 1999/51642, và Idusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184 (2000).

Các kháng thể có thời gian bán hủy tăng và cải thiện sự gắn kết với thụ thể Fc ở trẻ sơ sinh (FcRn), có trách nhiệm truyền của các IgG mẹ đến bào thai (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) và Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), được mô tả trong US2005/0014934 (Hinton et al.). Các kháng thể này bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều việc thế ở đây mà cải thiện sự gắn kết của vùng Fc tới FcRn. Các biến thể Fc này bao gồm các biến thể có các việc thế ở một hoặc nhiều gốcvùng Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434, tức là, việc thế của gốc vùng Fc 434 (US Patent No. 7,371,826).

Tham khảo thêm Duncan, Nature 322:738-40 (1988); US Patent No. 5,648,260; US Patent No. 5,624,821; và WO 1994/29351 liên quan đến các ví dụ của biến thể vùng Fc khác.

d. Các biến thể kháng thể thiết kế xystein

Theo các phương án nhất định, có thể tạo ra các kháng thể thiết kế xystein, tức là, "thioMAbs," trong đó một hoặc nhiều gốc của kháng thể được thế với các gốc xystein. Theo các phương án cụ thể, các gốc được thế xảy ra ở các vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể. Bằng cách thế các gốc này với xystein, các nhóm thiol phản ứng được định vị tại các vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể và có thể được sử dụng để tiếp hợp kháng thể tới các gốc khác, như gốc dược phẩm hoặc gốc dược phẩm liên kết, đê tạo ra tiếp hợp miễn dịch, như mô tả ở đây. Theo các phương án nhất định, bất kỳ một hoặc nhiều các gốc nào sau dây có thể được thế với xystein: V205 (số Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (số EU) của chuỗi nặng; và S400 (Số EU) của chuỗi nặng vùng Fc. Các kháng thể thiết kế xystein có thể được tạo như mô tả, tức là, trong US Patent No. 7,521,541.

e. Các dẫn xuất kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được cung cấp ở đây còn có thể được cải biến để chứa các gốc không có protein bổ sung đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và sẵn có. Các gốc thích hợp để làm dẫn xuất của kháng thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các polyme dung dịch nước. Các ví dụ không có giới hạn của các polyme dung dịch nước bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), các copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxeluloza, dextran, rượu polyvinyl, polyvinyl pyrrolidon, poly-1, 3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, etylen/maleic anhydrit copolyme, polyaminoaxit (hoặc các homopolyme hoặc các copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrrolidon)polyetylen glycol, các polypropylen glycol homopolyme, polypropylen oxit/các etylen oxit co-polyme, các polyoxyetylat hóa polyol (tức là, glxcerol), rượu polyvinyl, và các hỗn hợp của nó. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có lợi trong việc sản xuất do tính ổn định của nó trong nước. Polyme có thể ở bất kỳ trọng lượng phân tử nào, và có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Số lượng các polyme bắn với kháng thể có thể khác nhau, và nếu hơn một polyme được gắn vào, chúng có thể là các phân tử tương tự hoặc khác. Nói chung, số lượng và/hoặc dạng của các polyme được sử dụng để dẫn xuất có thể được xác định dựa trên các cân nhắc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đặc tính hoặc các chức năng cụ thể của kháng thể để được cải thiện, liệu dẫn xuất kháng thể sẽ được sử dụng ở liệu pháp dưới các điều kiện được xác định .v.v. .

Theo một phương án khác, các tiếp hợp của kháng thể và các gốc không có protein có thể gia nhiệt có chọn lọc bằng cách tiếp xúc với bức xạ được cung cấp. Theo một phương án, các gốc không có protein là ống nano cacbon (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605 (2005)). Bức xạ có thể là bất kỳ bước sóng nào, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bước sóng không gây hại cho các tế bào thông thường, nhưng làm nóng các gốc không có protein tới một nhiệt độ mà các tế bào ở gần với kháng thể-các gốc không có protein bị tiêu diệt.

B. Các phương pháp tái tổ hợp và các chế phẩm

Các kháng thể có thể được sản xuất sử dụng các phương pháp tái tổ hợp và các chế phẩm, tức là, như mô tả trong US Patent No. 4,816,567. Theo một phương án, axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể kháng C5 mô tả ở đây được cung cấp. Axit nucleic này có thể mã hóa trình tự axit amin chứa VL và/hoặc trình tự axit amin chứa VH của kháng thể (tức là, chuỗi nhẹ và/hoặc các chuỗi nặng của kháng thể). Theo một phương án khác nữa, một hoặc nhiều vectơ (tức là, cácvectơ biểu hiện) bao gồm axit nucleic này được cung cấp. Theo một phương án khác nữa, tế bào chủ bao gồm axit nucleic này được cung cấp. Theo một phương án, tế bào chủ bao gồm (tức là, đã được thay đổi với): (1) vectơ bao gồm axit nucleic mà mã hóa trình tự axit amin chứa VL của kháng thể và trình tự axit amin chứa VH của kháng thể, hoặc (2) vectơ đầu tiên bao gồm axit nucleic mà mã hóa trình tự axit amin chứa VL của kháng thể và vectơ thứ hai bao gồm axit nucleic mà mã hóa trình tự axit amin chứa VH của kháng thể. Theo một phương án, tế bào chủ là có nhân, tức là, tế bào buồng trứng chuột Trung Quốc (CHO) hoặc tế bào bạch huyết (tức là, tế bào Y0, NS0, Sp20). Theo một phương án, phương pháp tạo kháng thể kháng C5 được cung cấp, trong đó phương pháp bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ bao gồm axit nucleic mã hóa kháng thể, như được cung cấp trên đây, dưới các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể, và tùy ý hồi phục kháng thể từ tế bào chủ (hoặc thông qua nuôi cấy tế bào chủ).

Đối với việc sản xuất tái tổi hợp của kháng thể kháng C5, axit nucleic mã hóa kháng thể, tức là, như mô tả trên đây, là kháng thể được phân lập và được chèn vào một hoặc nhiều vectơ để nhân bản và/hoặc biểu hiện trong tế bào chủ. Axit nucleic này có thể được phân lập lập và được sắp xếp trình tự sử dụng các phương pháp thông thường (tức là, bằng cách sử dụng các đầu dò oligonucleotit mà có khả năng gắn kết đặc hiệu tới các gen mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể).

Các tế bào chủ thích hợp để nhân bản hoặc biểu hiện của các vectơ mã hóa kháng thể bao gồm các tế bào không nhân hoặc có nhân mô tả ở đây. Ví dụ, các kháng thể có thể được sản xuất trong vi khuẩn, cụ thể khi glycosyl hóa và chức năng kích thích Fc là không cần thiết. Đối với việc biểu hiện các đoạn kháng thể và các polypeptit trong vi khuẩn, tham khảo, tức là, các US Patent No. 5,648,237, 5,789,199, và 5,840,523. (tham khảo thêm Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, mô tả việc biểu hiện của các đoạn kháng thể trong *E. coli*.) Sau khi biểu hiện, kháng thể có thể được tách từ hỗn hợp tế bào vi khuẩn trong một phần hòa tan và có thể còn được tinh chế.

Ngoài các vi khuẩn không nhân, vi khuẩn có nhân như nấm dạng sợi hoặc nấm men là thíchh hợp để vật chủ nhân bản hoặc biểu hiện đối với các vectơ mã hóa kháng thể, bao gồm nấm và nấm men có các chuỗi phản ứng hóa sinh glycosyl hóa đã được "được làm tương thích với người," dẫn đến việc sản xuất của kháng thể với gốc glycosyl hóa đầy đủ hoặc một phần ở người. Tham khảo Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), và Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006).

Các tế bào chủ thích hợp đối với việc biểu hiện của kháng thể glycosylat hóa còn có nguồn gốc từ các sinh vật đa bảo (không xương sống hoặc có xương sống). Các ví dụ của các tế bào không xương sống bao gồm thực vật và các tế bào côn trùng. Rất nhiều chủng vi khuẩn đã được xác định để sử dụng trong việc tiếp hợp với các tế bào côn trùng, đặc biệt là việc truyền các tế bào Spodoptera frugiperda.

Các việc nuôi cấy tế bào thực vật có thể được sử dụng làm các vật chủ. Tham khảo, tức là, các US Patent No. 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, và 6,417,429 (mô tả kỹ thuật PLANTIBODIES^{TM} để sản xuất các kháng thể trong việc cấy ghép thực vật).

Các tế bào có xương sống có thể được sử dụng làm các vật chủ. Ví dụ, các dòng tế bào động vật có vú được điều chỉnh để tăng trưởng trong thể vẩn có thể có hữu ích. Các ví dụ khác của các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích như dòng thận khỉ CV1 được cải biến bởi SV40 (COS-7); dòng thận phôi thai ở người (các tế bào 293 hoặc 293 như mô tả, tức là, trong Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); các tế bào thận chuột sơ sinh (BHK); các tế bào sertoli chuột (các tế bào TM4 như mô tả, tức là, trong Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); các tế bào thận khỉ (CV1); các tế bào thận khỉ châu Phi (VERO-76); các tế bào ung thư cổ tử cung ở người (HELA); các tế bào gan chó (MDCK; các tế bào gan chuột trâu (BRL 3A); các tế bào phổi ở người (W138); các tế bào gan ở người (Hep G2); khối u vú chuột (MMT 060562); các tế bào TRI, như mô tả, tức là, trong Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982); các tế bào MRC 5; và các tế bào FS4. Other các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích bao gồm các tế bào buồng trứng chuột Trung Quốc (CHO), bao gồm $DHFR^-$ các tế bào CHO (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); và các dòng tế bào u tủy như Y0, NS0 và Sp2/0, Để xem xét lại các dòng tế bào chủ ở động vật có vú thích hợp để sản xuất kháng thể, tham khảo, tức là, Yazaki và Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

Các kháng thể đa dòng được nuôi cấy ở các động vật bằng cách tiêm dưới da (sc) hoặc trong màng bụng (ip) nhiềulần của kháng nguyên và tá dược có liên quan. Điều này có thể có ích để tiếp hợp kháng nguyên có liên quan tới protein mà gây miễn dịch tới các loài được gây miễn dịch, tức là, hemocyanin của con hà, albumin huyết thanh, thyroglobulin bò, hoặc chất ức chế trypsin đậu nành sử dụng tác nhân dẫn xuất hoặc hai chức năng, ví dụ, maleimidobenzoyl sulfosucxinimit este (tiếp hợp với các gốc xystein), N-hydroxysucxinimit (qua các gốc lysin), glutaraldehyt, sucxinic anhydrit, $SOCl_2$, hoặc $R^1N=C=NR$, khi R và R^1 là các nhóm alkyl khác nhau.

Các động vật (thường là động vật có vú không phải là người) được miễn dịch chống lại kháng nguyên, các tiếp hợp tạo miễn dịch, hoặc các dẫn xuất bằng cách kết hợp, tức là, 100 microgam hoặc 5 microgam của protein hoặc tiếp hợp (đối với thỏ hoặc chuột, tương ứng) với 3 khối lượng của Freund hoàn thiện tá dược và tiêm dung dịch trong da tại nhiều vị trí. Một tháng sau các động vật được tăng cường với 1/5 đến 1/10 lượng peptit ban đầu hoặc tiếp hợp trong Freund hoàn thiện tá dược bằng cách tiêm dưới da tại nhiều vị trí. Bảy đến 14 ngày sau đó các đồng vật này bị chảy máu và huyết thanh được thử nghiệm đối với độ chẩn kháng thể. Các động vật được tăng cường cho đến khi bình ổn chuẩn độ. Tốt hơn là, động vật được tăng cường với tiếp hợp của cùng một kháng nguyên, nhưng được tiếp hợp với protein khác và/hoặc qua tác nhân gắn kết chéo khác nhau. Các tiếp hợp có thể được tạo trong môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp như hỗn hợp protein. Ngoài ra, các tác nhân tổng hợp như phèn thích hợp được sử dụng để tăng cường phản ứng miễn dịch.

Các kháng thể đơn dòng thu được từ một quần thể của các kháng thể đồng nhất, tức là, các kháng thể riêng biệt chứa quần thể giống nhau ngoại trừ các đột biến có thể xuất hiện tự nhiên và/hoặc các biến đổi hậu tịnh tiến (tức là, các sự đồng phân hóa, amit hóa) có thể có trong các lượng nhỏ. Do đó, thuật ngữ "đơn dòng" cho thấy các đặc tính của kháng thể nhưng không phải là hỗn hợp của các kháng thể riêng rẽ.

Ví dụ, các kháng thể đơn dòng có thể được tạo sử dụng phương pháp lai tế bào đầu tiên được mô tả bởi Kohler et al. Nature 256(5517):495-497 (1975). Trong phương pháp lai tế bào, chuột hoặc động vật vật chủ thích hợp khác, như chuột nhắt, được miễn dịch như ở trên đây mô tả để gây phản ứng với tế bào bạch huyết mà sản xuất hoặc có khả năng sản xuất các kháng thể sẽ gắn kết đặc hiệu với protein được sử dụng để miễn dịch. Ngoài ra tế bào bạch huyết có thể được miễn dịch trong ống nghiệm.

Tác nhân miễn dịch sẽ thường bao gồm protein kháng nguyên hoặc biến thể hỗn hợp của nó. Thông thường hoặc các tế bào bạch huyết máu ngoại biên (các

PBL) được sử dụng nếu các tế bào ở người được yêu cầu, hoặc các tế bào lá lách hoặc các tế bào nút hạch bạch huyết được sử dụng nếu các nguồn động vật có vú không phải là người được yêu cầu. Tế bào bạch huyết sau đó được kết hợp với dòng tế bào bất hồi sử dụng tác nhân kết hợp thích hợp, như polyetylen glycol, để tạo tế bào lai (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles và Practice, Academic Press (1986), pp. 59-103).

Các dòng tế bào bất hồi thường biến đổi các tế bào của động vật có vú, cụ thể là tế bào u tủy của loài gặm nhấm, bò và người. Thông thường, các dòng tế bào u tủy của chuột hoặc chuột cống được sử dụng. Vác tế bào lai do đó được điều chế được nhân giống và nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy thích hợp mà ưu tiên hơn là chứa một hoặc nhiều các chất mà ức chế sự phát triển hoặc tồn tại của các tế bào u tủy gốc. Ví dụ, nếu các tế bào u tủy gốc thiếu enzym hypoxantin guanin phosphoribosyl transferaza (HGPRT hoặc HPRT), môi trường nuôi cấy đối với các tế bào lai sẽ thường bao gồm hypoxantin, aminopterin, và thymidin (trung gian HAT), là những chất mà ngăn ngừa sự phát triển của các tế bào thiếu HGPRT.

Các tế bào u tủy bất hồi được ưu tiên hơn là các chế bào nối mà hiệu quả, việc hỗ trợ sản xuất mức độ cao của kháng thể bởi các tế bào sản xuất kháng thể được chọn lọc, và nhạy cảm với môi trường như môi trường HAT. Trong số chúng, được ưu tiên hơn là các dòng tế bào u tủy thuộc bộ gặm nhấm, như các dòng tế bào có nguồn gốc từ khối u chuột MOPC-21 và MPC-11 sẵn có từ Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, và các tế bào SP-2 (và các dẫn xuất của nó, tức là, X63-Ag8-653) sẵn có từ American Type Culture Collection, Manassas, Virginia USA. Các dòng tế bào dị u tủy ở người-chuột và u tủy người còn được mô tả để sản xuất các kháng thể đơn dòng ở người (Kozbor et al., J Immunol. 133(6):3001-3005 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Kháng thể Production Techniques và Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), pp. 51-63).

Môi trường nuôi cấy trong đó các tế bào lai tăng lên được thử nghiệm để sản xuất các kháng thể đơn dòng trực tiếp chống lại kháng nguyên. Tốt hơn là, gắn kết đặc hiệu của các kháng thể đơn dòng được sản xuất bởi các tế bào lai được xác định bởi thử nghiệm gắn kết kết tủa miễn dịch hoặc bởi thử nghiệm gắn kết in vitro, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc thử nghiệm hấp thụ miễn dịch gắn kết enzym (ELISA). Các kỹ thuật và thử nghiệm này được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, ái lực gắn kết có thể được xác định bởi phân tích Scatchard của Munson, Anal Biochem. 107(1):220-239 (1980).

Sau khi các tế bào lai được nhận rằng rằng sản xuất các kháng thể có sự đặc hiệu, ái lực, và/hoặc hoạt tính mong muốn, các bản sao có thể được nhân bản phụ bằng các quy trình pha loãng có giới hạn và được phát triển theo các phương pháp chuẩn (Goding, nêu trên). Các môi trường nuôi cấy thích hợp bao gồm, ví dụ, môi trường D-MEM hoặc RPMI-1640. Ngoài ra, các tế bào lai có thể được phát triển in vivo như là các khối u ở động vật có vú.

Các kháng thể đơn dòng được sản ra bởi các nhân bản phụ được tách riêng khỏi môi trường nuôi cấy, dịch cổ trướng, hoặc huyết thanh bằng các quy trình tinh chế globulin miễn dịch thông thường như, ví dụ, protein A-Sepharoza, sắc ký hydroxyapatit, điện di gel, sự tiêu thể dia, hoặc sắc ký ái lực.

Các kháng thể có thể được sản xuất bằng cách miễn dịch động vật vật chủ thích hợp chống lại kháng nguyên. Theo một phương án, kháng nguyên là polypeptit bao gồm C5 có độ dài đầy đủ. Theo một phương án, kháng nguyên là polypeptit chứa chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5. Theo một phương án, kháng nguyên là polypeptit chứa miền MG1-MG2 (SEQ ID NO: 43) của chuỗi beta của C5. Theo một phương án, kháng nguyên là polypeptit chứa miền MG1 (SEQ ID NO: 41) của chuỗi beta của C5. Theo một phương án, kháng nguyên là polypeptit chứa vùng tương ứng với các axit amin tại các vị trí 19 đến 180 của chuỗi beta của C5. Theo một phương án, kháng nguyên là polypeptit chứa vùng tương ứng với các axit amin tại các vị trí 33 đến 124 của chuỗi beta của C5. Theo một phương án, kháng nguyên là polypeptit bao gồm ít nhất một đoạn

được chọn từ các axit amin 47-57, 70-76, và 107-110 của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5. Theo một phương án, kháng nguyên là polypeptit bao gồm đoạn của chuỗi beta của C5 mà bao gồm ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Thr47, Glu48, Ala49, Phe50, Asp51, Ala52, Thr53, Lys57, His70, Val71, His72, Ser74, Glu76, Val107, Ser108, Lys109, và His110, Theo một phương án, kháng nguyên là polypeptit bao gồm đoạn của chuỗi beta của C5 mà bao gồm ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109, và His110, còn được bao gồm trong sáng chế là các kháng thể được sản xuất bằng cách miễn dịch động vật chống lại kháng nguyên. Các kháng thể có thể kết hợp với bất kỳ các đặc trưng nào, riêng rẽ hoặc kết hợp, như mô tả trong " các kháng thể kháng C5 mẫu" trên đây.

C. Các thử nghiệm

Các kháng thể kháng C5 được cung cấp ở đây có thể được nhận dạng, sàng lọc, hoặc đặc trưng cho các đặc tính vật lý/hóa học và/hoặc các hoạt tính sinh học bởi các thử nghiệm khác nhau đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật.

1. Các thử nghiệm gắn kết và các thử nghiệm khác

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm đối với hoạt tính gắn kết kháng nguyên của nó, tức là, bằng cách phương pháp đã được biết đến như ELISA, thẩm tách Western, BIACORE (nhãn được đã đăng ký), .v.v..

Theo khía cạnh khác, các thử nghiệm cạnh tranh có thể được sử dụng để xác định kháng thể mà cạnh tranh để gắn kết với C5 với kháng thể kháng C5 mô tả ở đây. Theo các phương án nhất định, khi kháng thể cạnh tranh này có mặt vượt trội, sẽ ngăn chặn (tức là, làm giảm) sự gắn kết của kháng thể liên quan tới C5 bởi ít nhất 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, hoặc nhiều hơn. Theo một số trường hợp, việc gắn két bị ức chế bởi ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc nhiều hơn. Theo các phương án nhất định, kháng thể cạnh tranh này gắn kết với cùng một epitop (tức là, hoặc epitop đối xứng mạch thẳng) mà được gắn kết bởi bởi kháng thể kháng C5 mô tả ở đây

(tức là, kháng thể kháng C5 mô tả trong bảng 2). Các phương pháp mẫu điển hiền để tạo bản đồ epitop có liên kết kháng thể được cung cấp trong Morris, "Epitop Mapping Protocols," trong Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ) (1996).

Trong thử nghiệm cạnh tranh mẫu, C5 cố định được ủ trong dung dịch bao gồm kháng thể đầu tiên được dán nhãn (tham khảo) gắn với C5 và kháng thể thứ hai không được dán nhãn được thử nghiệm về khả năng cạnh tranh của nó với kháng thể đầu tiên để gắn kết với C5. Kháng thể thứ hai có thể có mặt ở sự nổi trên mặt tế bào lai. Như là một đối chứng, C5 cố định được ủ trong dung dịch chứa kháng thể đầu tiên được dán nhãn không phải là kháng thể thứ hai không được dán nhãn. Sau khi ủ dưới các điều kiện cho phép để gắn kết kháng thể đầu tiên tới C5, kháng thể không được gắn kết dư thừa được loại bỏ, và lượng dán nhãn liên quan đến C5 cố định được đo. Nếu lượng dán nhãn liên quan đến C5 cố định bị giảm đáng kể trong mẫu thử nghiệm so với mẫu đối chứng, thì điều đó cho thấy rằng kháng thể thứ hai đang cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để gắn kết với C5. Tham khảo, Harlow và Lane, các kháng thể: A Laboratory Manual ch,14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) (1988).

Trong thử nghiệm cạnh tranh mẫu khác, sự phân tích BIACORE (nhãn được đã đăng ký) được sử dụng để xác định khả năng của kháng thể kháng C5 thử nghiệm cạnh tranh với việc gắn kết với C5 bởi (tham khảo) kháng thể kháng C5 thứ hai. Theo một khía cạnh khác trong đó công cụ BIACORE (nhãn được đã đăng ký) (ví dụ, BIACORE (nhãn được đã đăng ký) 3000) được vận hành theo các khuyến nghị của nhà sản xuất, protein C5 được ghi lại trên một chip CM5 BIACORE (nhãn được đã đăng ký) sử dụng kỹ thuật chuẩn đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật để tạo bề mặt được phủ C5. 200-800 Đơn vị cộng hưởng của C5 sẽ được nối vào chip (một lượng mà cho mức độ có thể dễ dàng xác định việc gắn kết nhưng có thể bão hòa bởi các nồng độ của kháng thể thử nghiệm được sử dụng). Hai kháng thể (tức là, kháng thể thử nghiệm và tham khảo) được đánh giá về khả năng cạnh tranh của chúng với nhau được trộn ở tỷ

lệ mol 1:1 của các vị trí gắn kết trong chất đệm thích hợp để tạo hỗn hợp thử nghiệm. Khi tính toán các nồng độ trên các vị trí gắn kết dựa trên trọng lượng phân tử của kháng thể thử nghiệm hoặc kháng thể tham khảo được coi là tổng trọng lượng phân tử của kháng thể tương ứng chia cho số lượng vị trí gắn kết C5 trên kháng thể. Nồng độ của mỗi kháng thể (tức là, kháng thể thử nghiệm và tham khảo) trong hỗn hợp thử nghiệm nên đủ cao để dễ dàng làm bão hòa các vịtrí gắn kết đối với kháng thể trên các phân tử C5 được ghi trên chip BIACORE (nhãn được đã đăng ký). Các kháng thể thử nghiệm và tham khảo trong hỗn hợp có cùng nồng độ mol (trên cơ sở gắn kết), giữa 1,00 và 1,5 micromol (trên cơ sở vị trí gắn kết). Các dung dịch riêng biệt chứa kháng thể thử nghiệm riêng rẽ và kháng thể kham khảo riêng rẽ còn được điều chế. Kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham khảo trong các dung dịch này nên trong cùng một chất đệm và ở cùng một nồng độ và điều kiện như trong hỗn hợp thử nghiệm. Hỗn hợp thử nghiệm chứa kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham khảo được đưa qua chip BIACORE được phủ C5 (nhãn được đã đăng ký) và tổng lượng gắn kết được ghi. Chip này sau đó được xử lý để loại bỏ thử nghiệm gắn kết hoặc kháng thể tham khảo mà không làm hỏng chip gắn kết C5. Thông thường, điều này được thực hiện bằng cách xử lý chip với 30 mM HC1 trong 60 giây. Dung dịch của kháng thể thử nghiệm riêng rẽ được đưa qua bề mặt được phủ C5 và lượng gắn kết được ghi. Chip này được xử lý một lần nữa để loại bỏ toàn bộ kháng thể được gắn kết mà không làm hỏng chip gắn kết C5. Dung dịch của kháng thể tham khảo riêng rẽ được đưa qua bề mặt được phủ C5 và lượng gắn kết được ghi. Sự gắn kết tối đa theo lý thuyết của hỗn hợp kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham khảo sau đó được tính toán, và là tổng của sự gắn kết của mỗi kháng thể (tức là thử nghiệm và tham khảo) khi được đưa qua bề mặt C5 một cách riêng rẽ. Nếu sự gắn kết của hỗn hợp là nhỏ hơn so với lượng tối đa theo lý thuyết thì kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham khảo đang cạnh tranh với nhau để gắn kết C5. Do đó, kháng thể kháng C5 thử nghiệm cạnh tranh là kháng thể sẽ gắn kết với C5 trong thử nghiệm ngăn chặn BIACORE trên đây (nhãn được đã đăng

ký) sao cho trong suốt quá trình thử nghiệm và với sự có mặt của kháng thể kháng C5 tham khảo, sự gắn kết được ghi giữa 80% và 0,1% (tức là, 80% > tới 4%) của gắn kết tối đa theo lý thuyết, cụ thể hơn là giữa 75% và 0,1 % (tức là, 75% đến 4%) của gắn kết tối đa theo lý thuyết, và cụ thể hơn nữa là giữa 70% và 0,1% (tức là, 70% đến 4%) của gắn kết tối đa theo lý thuyết (như được xác định trên đây) của kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham khảo một cách kết hợp.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm một cặp VH và VL được chọn từ kháng thể CFA0341 và CFA0330, Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể được chọn từ: CFA0538, CFA0501, CFA0599, CFA0307, CFA0366, CFA0675, và CFA0672. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể CFA0329. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể CFA0666.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm một cặp VH và VL của kháng thể CFA0305 hoặc 305LO5.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 có ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm một cặp VH và VL được chọn từ: CFA0538, CFA0501, CFA0599, CFA0307, CFA0366, CFA0675, và CFA0672. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể CFA0666. Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 có ái lực cao hơn ở pH=7,4 so với ở pH=5,8.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 có ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể

bao gồm một cặp VH và VL của kháng thể CFA0305 hoặc 305LO5. Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 có ái lực cao hơn ở pH=7,4 so với ở pH=5,8.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm một cặp VH và VL được chọn từ VH của SEQ ID NO:22 và VL của SEQ ID NO:26, hoặc VH của SEQ ID NO:21 và VL của SEQ ID NO:25. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm một cặp VH và VL được chọn từ: (a) VH của SEQ ID NO: 5 và VL của SEQ ID NO: 15; (b) VH của SEQ ID NO: 4 và VL của SEQ ID NO: 14; (c) VH của SEQ ID NO:6 và VL của SEQ ID NO:16; (d) aVH của SEQ ID NO:2 và VL của SEQ ID NO:12; (e) VH của SEQ ID NO: 3 và VL của SEQ ID NO: 13; (f) VH của SEQ ID NO: 1 và VL của SEQ ID NO: 11; (g) VH của SEQ ID NO:9 và VL của SEQ ID NO:19; (h) aVH của SEQ ID NO:7 và VL của SEQ ID NO:17; và (i) aVH của SEQ ID NO:8 và VL của SEQ ID NO:18. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm VH của SEQ ID NO:23 và VL của SEQ ID NO:27. Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm VH của SEQ ID NO:7 và VL của SEQ ID NO:17.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm một cặp VH và VL được chọn từ: (a) VH của SEQ ID NO:1 và VL của SEQ ID NO:11; (b) VH của SEQ ID NO: 22 và VL của SEQ ID NO:26; (c) VH của SEQ ID NO:21 và VL của SEQ ID NO:25; (d) VH của SEQ ID NO: 5 và VL của SEQ ID NO:15; (e) VH của SEQ ID NO:4 và VL của SEQ ID NO:14; (f) VH của SEQ ID NO: 6 và VL của SEQ ID NO: 16; (g) VH của SEQ ID NO:2 và VL của SEQ ID NO:12; (h) VH của SEQ ID NO: 3 và VL của SEQ ID NO: 13; (i) VH của SEQ ID NO:9 và VL của SEQ ID NO:19; (j) VH của SEQ ID NO:7 và VL của SEQ ID NO: 17; (k) aVH của SEQ ID NO:8 và VL của SEQ ID NO:18; (l) VH của SEQ ID NO: 23 và VL của SEQ ID NO:27; và (m) VH của SEQ ID NO:10 và VL của SEQ ID NO:20,

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm một cặp VH và VL được chọn từ: (a) VH của SEQ ID NO: 22 và VL của SEQ ID NO:26; (b) VH của SEQ ID NO:21 và VL của SEQ ID NO:25; (c) VH của SEQ ID NO: 5 và VL của SEQ ID NO:15; (d) VH của SEQ ID NO:4 và VL của SEQ ID NO:14; (e) VH của SEQ ID NO: 6 và VL của SEQ ID NO: 16; (f) VH của SEQ ID NO:2 và VL của SEQ ID NO:12; (g) VH của SEQ ID NO: 3 và VL của SEQ ID NO: 13; (h) VH của SEQ ID NO:9 và VL của SEQ ID NO:19; (i) VH của SEQ ID NO:7 và VL của SEQ ID NO: 17; (j) aVH của SEQ ID NO:8 và VL của SEQ ID NO:18; (k) VH của SEQ ID NO: 23 và VL của SEQ ID NO:27.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 theo sáng chế cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm một cặp VH và VL được chọn từ VH của SEQ ID NO:1 và VL của SEQ ID NO:11, hoặc VH của SEQ ID NO:10 và VL của SEQ ID NO:20,

Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 có ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 có ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit và cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm một cặp VH và VL được chọn từ: (a) VH của SEQ ID NO:1 và VL của SEQ ID NO:11; (b) VH của SEQ ID NO: 5 và VL của SEQ ID NO:15; (c) VH của SEQ ID NO:4 và VL của SEQ ID NO:14; (d) VH của SEQ ID NO: 6 và VL của SEQ ID NO: 16; (e) VH của SEQ ID NO:2 và VL của SEQ ID NO:12; (f) VH của SEQ ID NO: 3 và VL của SEQ ID NO: 13; (g) VH của SEQ ID NO:9 và VL của SEQ ID NO:19; (h) VH của SEQ ID NO:7 và VL của SEQ ID NO: 17; (i) aVH của SEQ ID NO:8 và VL của SEQ ID NO:18; và (j) VH của SEQ ID NO:10 và VL của SEQ ID NO:20, Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 có ái lực cao hơn ở pH=7,4 so với ở pH=5,8.

Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 có ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit và cạnh tranh để gắn kết C5 với

kháng thể bao gồm một cặp VH và VL được chọn từ: (a) VH của SEQ ID NO: 5 và VL của SEQ ID NO: 15; (b) VH của SEQ ID NO: 4 và VL của SEQ ID NO: 14; (c) VH của SEQ ID NO:6 và VL của SEQ ID NO:16; (d) aVH của SEQ ID NO:2 và VL của SEQ ID NO:12; (e) VH của SEQ ID NO: 3 và VL của SEQ ID NO: 13; (f) VH của SEQ ID NO: 1 và VL của SEQ ID NO: 11; (g) VH của SEQ ID NO:9 và VL của SEQ ID NO:19; (h) aVH của SEQ ID NO:7 và VL của SEQ ID NO:17; và (i) aVH của SEQ ID NO:8 và VL của SEQ ID NO:18. Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 có ái lực cao hơn ở pH=7,4 so với ở pH=5,8.

Theo một số phương án, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 có ái lực cao hơn tại pH trung hòa so với pH có tính axit và cạnh tranh để gắn kết C5 với kháng thể bao gồm một cặp VH và VL được chọn từ VH của SEQ ID NO:1 và VL của SEQ ID NO:11, hoặc VH của SEQ ID NO:10 và VL của SEQ ID NO:20, Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng C5 gắn kết với C5 có ái lực cao hơn ở pH=7,4 so với ở pH=5,8.

Theo các phương án nhất định, liệu kháng thể kháng C5 theo sáng chế gắn kết với epitop nào đó có thể được xác định như sau: Các đột biến điểm C5 trong đó axit amin (ngoài trừ alanin) trên C5 được thế với alanin được biểu hiện trong các tế bào 293, và việc gắn kết của kháng thể kháng C5 tới các đột biến C5 được thử nghiệm qua ELISA, thẩm tách Western hoặc BIACORE (nhãn được đã đăng ký); trong đó việc giảm đáng kể hoặc loại bỏ việc gắn kết của kháng thể kháng C5 đến đột biến C5 liên quan đến việc gắn kết của nó tới C5 dạng tự nhiên cho thấy rằng kháng thể kháng C5 gắn kết với epitop bao gồm axit amin trên C5. Theo các phương án nhất định, axit amin trên C5 được thế với alanin được chọn từ nhóm bao gồm Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109, và His110 của chuỗi beta của C5 (SEQ ID NO:40). Theo một phương án khác nữa, axit amin trên C5 được thế với alanin là Asp51 hoặc Lys109 của chuỗi beta của C5 (SEQ ID NO:40).

Theo một phương án khác, liệu kháng thể kháng C5 có các đặc tính gắn kết phụ thuộc pH gắn kết với epitop nào đó có thể được xác định như sau: Các đột biến điểm C5 trong đó gốc histidin trên C5 được thế với axit amin khác (tức là, tyrosin) được biểu hiện trong các tế bào 293, và việc gắn kết của kháng thể kháng C5 đến các đột biến C5 được thử nghiệm qua ELISA, thẩm tách Western hoặc BIACORE (nhãn được đã đăng ký); trong đó việc giảm một cách đáng kể việc gắn kết của kháng thể kháng C5 đến C5 dạng tự nhiên ở pH có tính axit liên quan đến việc gắn kết của nó tới đột biến C5 ở pH có tính axit, cho thấy rằng kháng thể kháng C5 gắn kết với epitop bao gồm gốc histidin trên C5. Theo một phương án khác nữa, việc gắn kết của kháng thể kháng C5 đến C5 dạng tự nhiên tại pH trung hòa không bị giảm nhiều liên quan đến gắn kết của nó tới đột biến C5 tại pH trung hòa. Theo các phương án nhất định, gốc histidin trên C5 được thế với axit amin khác được chọn từ nhóm bao gồm His70, His72, và His110 của chuỗi beta của C5 (SEQ ID NO:40). Theo một phương án khác nữa, gốc histidin His70 được thế với tyrosin.

2. Các thử nghiệm hoạt tính

Theo một khía cạnh, các thử nghiệm được cung cấp để xác định các kháng thể kháng C5 có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học may bao gồm, tức là, ức chế sự hoạt hóa của C5, ngăn ngừa sự phân tách của C5 để hình hành C5a và C5b, ngăn chặn sự truy cập của convertaza C5 tới vị trí phân tách trên C5, ngăn ngừa hoạt tính thiếu máu do tan huyết gây ra bởi sự hoạt hóa của C5, .v.v.. Các kháng thể có hoạt tính sinh học in vivo và/hoặc in vitro còn được cung cấp.

Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm đối với hoạt tính sinh học này.

Theo các phương án nhất định, liệu kháng thể thử nghiệm ức chế sự phân tách của C5 thành C5a và C5b, được xác định bằng các phương pháp mô tả trong, tức là, Isenman et al., J Immunol. 124(1):326-331 (1980). Theo một phương án khác, còn được xác định bằng các phương pháp để dò một cách cụ

thể các protein C5a và/hoặc C5b được phân cắt, tức là, các ELISA hoặc các thẩm tách Western. Khi một lượng giảm của sản phẩm phân tách của C5 (tức là, C5a và/hoặc C5b) được dò với sự có mặt của (hoặc tiếp xúc với) kháng thể thử nghiệm, kháng thể thử nghiệm được xác định là kháng thể mà có thể ức chế sự phân tách của C5. Theo các phương án nhất định, nồng độ và/hoặc hoạt tính sinh lý học của C5a có thể được xác định bằng các phương pháp, tức là, các thử nghiệm tính theo hóa chất, các RIA, hoặc các ELISA (tham khảo, tức là, Ward và Zvaifler J. Clin. Invest. 50(3):606-616 (1971)).

Theo các phương án nhất định, liệu kháng thể thử nghiệm ngăn chặn sự truy cập của convertaza C5 tới C5 được xác định bằng các phương pháp để dò các sự tương tác protein giữa convertaza C5 và C5, tức là, các ELISA hoặc BIACORE (nhãn được đã đăng ký). Khi các sự tương tác bị giảm với sự có mặt của (hoặc tiếp xúc với) kháng thể thử nghiệm, kháng thể thử nghiệm được xác định là kháng thể mà có thể ngăn chặn sự truy cập của convertaza C5 tới C5.

Theo các phương án nhất định, hoạt tính C5 có thể được xác định như là một chức năng có khả năng dung giải tế bào của nó trong các chất lỏng cơ thể người. Khả năng dung giải tế bào, hoặc làm giảm, của C5 có thể được xác định bằng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, thử nghiệm thiếu máu do tan huyết thông thường, như thử nghiệm phân hủy được mô tả bởi Kabat và Mayer (eds), Experimental Immunochemistry, 2nd Edition, 135-240, Springfield, IL, CC Thomas (1961), trang 135-139, hoặc các thử nghiệm thông thường khác, như phương pháp phân hủy hồng cầu gà như mô tả trong, tức là, Hillmen et al., N. Engl. J. Med. 350(6): 552-559 (2004). Theo các phương án nhất định, hoạt tính C5, hoặc sự ức chế của nó, được định lượng sử dụng thử nghiệm CH50eq. Thử nghiệm CH50eq là phương pháp để xác định tổng hoạt tính bổ trợ trong huyết thanh. Thử nghiệm này là thử nghiệm lytic, sử dụng hồng cầu nhạy cảm với kháng thể làm chất hoạt hóa của chuỗi các phản ứng hóa sinh bổ trợ, và các sự pha loãng khác nhau của huyết thanh thử nghiệm để xác định sốl ượng cần thiết để cho 50% sự tiêu (CH50). Phần trăm phân hủy

có thể được xác định, ví dụ, sử dụng quang phổ kế. Thử nghiệm CH50eq cung cấp một biện pháp gián tiếp của sự hình thành phức bổ trợ đầu mút (TCC), vì TCC tự chịu trách nhiệm cho việc đo sự phân hủy. Sự ức chế hoạt tính C5 có thể còn được dò và/hoặc đo bằng cách sử dụng các phương pháp được nêu tra và được minh họa trong các ví dụ thử nghiệm. Sử dụng các thử nghiệm này hoặc các thử nghiệm thích hợp khác, các kháng thể ứng viên có khả năng ức chế sự hoạt hóa của C5 có thể được sàng lọc. Theo các phương án nhất định, sự ức chế của sự hoạt hóa C5 bao gồm ít nhất 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, hoặc 40% hoặc lớn hơn việc giảm ở sự hoạt hóa C5 trong thử nghiệm so với hiệu quả kiểm soát âm tính dưới các điều kiện tương tự. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến sự ức chế của sự hoạt hóa C5 bởi ít nhất 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95% hoặc lớn hơn.

D. Các tiếp hợp miễn dịch

Sáng chế còn đề cập đến các tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể kháng C5 ở đây tiếp hợp với một hoặc nhiều tác nhân gây độc tế bào, như các tác được làm tương thích với người liệu pháp hoặc các dược phẩm, các tác nhân ức chế tăng trưởng, các toxin (tức là, protein các toxin, các độc tố hoạt hóa enzym của vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc các đoạn của nó), hoặc các chất đồng vị phóng xạ.

Theo một phương án, tiếp hợp miễn dịch là tiếp hợp dược phẩm kháng thể (ADC) trong đó kháng thể được tiếp hợp với một hoặc nhiều dược phẩm, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở maytansinoit (tham khảo, các US Patent No. 5,208,020, 5,416,064 và Patent châu Âu EP 0 425 235 B1); auristatin như gốc dược phẩm monomethylauristatin DE và DF (MMAE và MMAF) (tham khảo, các US Patent No. 5,635,483 và 5,780,588, và 7,498,298); dolastatin; calicheamixin hoặc dẫn xuất của nó (tham khảo, các US Patent No. 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, và 5,877,296; Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); và Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)); anthracyxlin như daunomyxin hoặc

doxorubixin (tham khảo 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); và US Patent No. 6,630,579); metotrexat; vindesin; a taxan như doxetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, và ortataxel; a trichothexen; và CC1065.

Theo một phương án khác, tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như mô tả ở đây tiếp hợp tới độc tố hoạt hóa enzym hoặc đoạn của nó, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chuỗi bạch hầu A, các đoạn không có hoạt tính gắn kết của độc tố bạch hầu, chuỗi ngoại độc tố A (từ Pseudomonas aeruginosa), chuỗi rixin A, chuỗi abrin A, chuỗi modecxin A, alpha-sarcin, các Aleurites fordii protein, các protein diantin, các protein Phytolaca americana (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curxin, crotin, chất ức chế sapaonaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và các tricothexen.

Theo một phương án khác, tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như mô tả ở đây tiếp hợp tới nguyên tử phóng xạ để tạo tiếp hợp phóng xạ. Các chất đồng vị phóng xạ khác nhau là sẵn có để sản xuất các tiếp hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} và các chất đồng vị phóng xạ của Lu. Khi tiếp hợp phóng xạ được sử dụng để dò, tiếp hợp này có thể bao gồm nguyên tử phóng xạ đối với các thử nghiệm quét hai chiều, ví dụ tc99m hoặc I123, hoặc một nhãn quay cho hình ảnh cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (còn được biết đến như hình ảnh cộng hưởng từ, mri), như iodin-123, iodin-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Các tiếp hợp của kháng thể và tác nhân gây độc tế bào có thể được tạo sử dụng các tác nhân nối protein hai chức khác nhau như N-sucxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), sucxinimidyl-4-(N-maleimidometyl)

cyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminotiolan (IT), các dẫn xuất hai chức của các imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), các este hoạt tính (như disucxinimidyl suberat), các aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexanediamin), các dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), các diisocyanat (như toluen 2,6-diisocyanat), và các hợp chất flo có hoạt tính bis (như 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được điều chế như mô tả trong Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Cacbon-14-dán nhãn 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldietylen triaminepentaacetic axit (MX-DTPA) là tác nhân tạo chelat mẫu để tiếp hợp radionucleotit tới kháng thể. Tham khảo WO94/11026. Chất gắn kết có thể là "chất gắn kết có thể tách rời" tạo điều kiện để giải phóng dược phẩm gây độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, chất gắn kết không bền axit, chất gắn kết nhạy cảm với peptidaza, chất gắn kêt không ổn định hình, chất gắn kết dimetyl hoặc chất gắn kết chứa disulfua (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); US Patent No. 5,208,020) có thể được sử dụng.

Các tiếp hợp miễn dịch hoặc các ADC ở đây được thể hiện rõ ràng, nhưng không chỉ giới hạn ở các tiếp hợp được điều chế với các thuốc thử gắn kết chéo bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (sucxinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) sẵn có trên thị trường (tức là, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

E. Các phương pháp và các chế phẩm để chẩn đoán hoặc dò

Theo các phương án nhất định, bất kỳ các kháng thể kháng C5 nào được cung cấp ở đây đề hữu ích để dò sự hiện diện của C5 trong mẫu sinh học. Thuật ngữ "dò" theo sáng chế bao gồm việc dò theo số lượng hoặc chất lượng. Theo các phương án nhất định, mẫu sinh học bao gồm tế bào hoặc mô, như huyết thanh, toàn bộ máu, huyết tương, mẫu sinh thiết, mẫu mô, thể vẩn tế bào, nước bọt, dãi, dịch ở miệng, dịch não tủy, dịch màng ối, dịch cổ trướng, sữa, sữa non,

sự tiết tuyến vú, bạch huyết, nước tiểu, mồ hôi, dịch tuyến lệ, dịch dạ dày, hoạt dịch, dịch màng bụng, dịch thủy tinh thể và nước nhầy.

Theo một phương án, kháng thể kháng C5 để dùng trong phương pháp chẩn đoán hoặc dò được cung cấp. Theo một khía cạnh khác, phương pháp để dò sự có mặt của của C5 trong mẫu sinh học được cung cấp. Theo các phương án nhất định, phương pháp bao gồm việc tiếp xúc mẫu sinh học với kháng thể kháng C5 như mô tả ở đây dưới cá điều kiện cho phép đối với việc gắn kết của kháng thể kháng C5 tới C5, và dò liệu một phức có thể được hình thành giữa kháng thể kháng C5 và C5. Phương pháp này có thể là phương pháp in vitro hoặc in vivo. Theo một phương án, kháng thể kháng C5 được sử dụng để chọn đối tượng thích hợp để điều trị với kháng thể kháng C5, tức là, khi C5 là chất chỉ điểm sinh học để chọn lựa bệnh nhân.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng C5 được dán nhãn được cung cấp. Các nhãn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhãn hoặc các gốc được dò trực tiếp (như các nhãn huỳnh quang, mang màu, electron dày đặc, hóa học phát xạ, và phóng xạ), cũng như các gốc, như các enzym hoặc các phối tử, được dò gián tiếp, tức là, qua phản ứng thuộc enzym hoặc sự tương tác phân tử. Các nhãn mẫu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đồng vị phóng xạ ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, và ^{131}I, các fluorophor như các chelat đất hiêm hoặc fluoresxein và các dẫn xuất của nó, rhodamin và các dẫn xuất của nó, dansyl, umbelliferon, các luceriferaza, tức là, luciferaza dom đóm và luciferaza vi khuẩn (US Patent No. 4,737,456), luciferin, 2,3-dihydrophthalazinedion, peroxidaza rau họ cải (HRP), kiềm phosphataza, beta-galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, saccharit oxidaza, tức là, glucose oxidaza, các galactoza oxidaza, và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, các oxidaza khác vòng như uricaza và xantin oxidaza, được nối với enzym sử dụng hydro peroxit để oxi hóa chất tiền nhuộm như HRP, lactoperoxidaza, hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, nhãn quay, nhãn thực khuẩn, gốc không ổn định, và các chất tương tự.

F. Các dược phẩm

Các dược phẩm của kháng thể kháng C5 như mô tả ở đây đuọc điều chế bằng cách trộn kháng thể có mức độ tinh chế mong muốn với một hoặc nhiều chất mang dược dụng tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), dưới dạng tạo công thức động khô hoặc các dung dịch chứa nước. Các chất mang dược dụng thường không độc hại tới người sử dụng với các liều lượng nồng độ được sử dụng, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: các chất đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và metionin; chất bảo quản (như octadecyldimetylbenzyl ammoni clorua; hexametonium clorua; benzalkonium clorua; benzethonium clorua; phenol, butyl hoặc rượu benzyl; các alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit trọng lượng phân tử thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); các protein, như huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; các polyme hút nước như polyvinylpyrrolidon; các axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; các monosaccharit, các disaccharit, và các hydratcacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc các dextrin; các tác nhân chelat như EDTA; các đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion phản ứng tạo muối như natri; các phức kim loại (tức là, các phức protein Zn); và/hoặc các chất có hoạt tính bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Các chất mang dược dụng mẫu ở đây còn bao gồm các tác nhân phân tán dược phẩm trong kẽ như các soluble hyaluronidaza glycoprotein hoạt động trung tính (sHASEGP), ví dụ, các PH-20 hyaluronidaza glycoprotein hòa tan ở người, như rHuPH20 (HYLENEX (nhãn được đã đăng ký), Baxter International, Inc.). Các sHASEGP mẫu và các phương pháp sử dụng, bao gồm rHuPH20, được mô tả trong US Publ. No. 2005/0260186 và 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được gắn kết với một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza như chondroitinaza bổ sung.

Các việc tạo công thức kháng thể mẫu đông khô được mô tả trong US Patent No. 6,267,958. Các việc tạo công thức kháng thể chứa nước bao gồm

trong mô tả trong US Patent No. 6,171,586 và WO 2006/044908, các việc tạo công thức gần nhất bao gồm chất đệm histidin-axetat.

Việc tạo công thức ở đây còn bao gồm một hoặc nhiều thành phần hoạt hóa khi cần thiết đối với các chỉ định cụ thể được điều trị, tốt hơn là với các hoạt tính bổ trợ mà không làm ảnh hưởng đến nhau. Các thành phần hoạt hóa thường có mặt trong sự kết hợp với một lượng hiệu quả đối với mục đích đã dự định.

Các thành phần hoạt hóa có thể được chứa trong các vi nang được điều chế, ví dụ, bằng các kỹ thuật tụ giọt hoặc bởi sự polyme hóa bề mặt chung, ví dụ, hydroxymetylxeluloza hoặc các vi nang gelatin và các vi nang poly-(metylmetacylat), tương ứng, trong hệ thống phân phối chất keo (ví dụ, các thể mỡ, các albumin vi cầu, nhũ tương vi mô, các hạt nano và nang nano) hoặc trong nhũ tương vĩ mô. Các kỹ thuật này này được bộc lộ trong Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Các chế phẩm giải phóng duy trì liên tục có thể dượcd điều chế. Các ví dụ thích hợp của các chế phẩm giải phóng duy trì liên tục bao gồm ma trận bán thấm của các polyme kỵ nước thể rắn chứa kháng thể, là các ma trận dưới dạng các hạt có hình thù, tức là, màng, hoặc vi nang.

Các việc tạo công thức được sử dụng đối với việc cung cấp in vivo thường được vô trùng. Sự vô trùng có thể được thực hiện, tức là, bằng cách lọc qua các màng lọc vô trùng.

G. Các phương pháp điều trị và các chế phẩm

Bất kỳ các kháng thể kháng C5 nào được cung cấp ở đây có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng C5 được dùng như dược phẩm được cung cấp. Xét theo các khía cạnh khác, kháng thể kháng C5 được dùng để điều trị bệnh được cung cấp. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng C5 được sử dụng trong phương pháp điều trị được cung cấp. Theo các phương án nhất định, sáng chế cung cấp kháng thể kháng C5 được sử dụng trong phương

pháp điều trị các thể mắ bệnh bao gồm việc cung cấp cho cá thể với một lượng hữu hiệu của kháng thể kháng C5. Theo một phương án, phương pháp còn bao gồm việc cung cấp cho cá thể với một lượng hữu hiệu có ít nhất một tác nhân điều trị bổ sung. "Cá thể" theo bất kỳ một trong các phương án trên đây được ưu tiên hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế cung cấp việc sử dụng kháng thể kháng C5 trong việc sản xuất hoặc điều chế dược phẩm. Theo một phương án, dược phẩm này được dùng để điều trị bệnh. Theo một phương án khác nữa, dược phẩm được sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh bao gồm việc cung cấp cho cá thể mắc bệnh một lượng hữu hiệu của dược phẩm. Theo một phương án, phương pháp còn bao gồm việc cung cấp cho cá thể với một lượng hữu hiệu có ít nhất một tác nhân điều trị bổ sung. "Cá thể" theo bất kỳ một trong các phương án trên đây được ưu tiên hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế cung cấp phương pháp để điều trị bệnh. Theo một phương án, phương pháp bao gồm việc cung cấp cho cá thể mắc bệnh một lượng hữu hiệu của kháng thể kháng C5. Theo một phương án, phương pháp còn bao gồm việc cung cấp cho cá thể với một lượng hữu hiệu có ít nhất một tác nhân điều trị bổ sung. "Cá thể" theo bất kỳ một trong các phương án trên đây có thể là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế cung cấp các dược phẩm bao gồm bất kỳ các kháng thể kháng C5 nào được cung cấp ở đây, tức là, để dùng trong bất kỳ các phương pháp điều trị nào trên đây. Theo một phương án, việc tạo công thức bao gồm bất kỳ các kháng thể kháng C5 nào được cung cấp ở đây và chất mang dược dụng. Theo một phương án khác, việc tạo công thức bao gồm bất kỳ các kháng thể kháng C5 nào được cung cấp ở đây và ít nhất một tác nhân điều trị bổ sung.

Theo một khía cạnh khác, dược phẩm để điều trị bệnh. Theo một phương án, dược phẩm được cung cấp cho cá thể mắc bệnh. "Cá thể" theo bất kỳ một trong các phương án trên đây tốt hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế cung cấp các phương pháp để điều chế thuốc hoặc dược phẩm, bao gồm trộn bất kỳ các kháng thể kháng C5 nào được cung cấp ở đây với chất mang dược dụng, tức là, để dùng trong bất kỳ các phương pháp điều trị nào trên đây. Theo một phương án, các phương pháp để điều chế dược phẩm hoặc việc tạo công thức còn bao gồm việc bổ sung ít nhất một tác nhân điều trị bổ sung vào thuốc hoặc dược phẩm.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng hoặc riêng rẽ hoặc kết hợp với các tác nhân khác trong việc điều trị. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể được đồng cung cấp với nhất một tác nhân điều trị bổ sung.

Các liệu pháp kết hợp này được đưa ra trên đây còn bao gồm việc cung cấp kết hợp (khi hai hoặc nhiều tác nhân chữa bệnh được bao gồm trong cùng các việc tạo công thức hoặc riêng biệt), và việc cung cấp riêng biệt, trong trường hợp, việc cung cấp của kháng thể theo sáng chế có thể xảy ra trước đó, đồng thời, và/hoặc tiếp theo, việc cung cấp của tác nhân điều trị bổ sung hoặc các tác nhân khác. Theo một phương án, việc cung cấp kháng thể kháng C5 và việc cung cấp tác nhân điều trị bổ sung xảy ra trong khoảng một tháng, hoặc trong khoảng, hai hoặc ba tuần, hoặc trong khoảng một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu ngày với nhau.

Kháng thể theo sáng chế (và bất kỳ tác nhân điều trị bổ sung nào) có thể được cung cấp bằng bất kỳ phương pháp thích hợp nào, bao gồm ngoài đường tiêu hóa, nội khí quản, và trong mũi, và, nếu cần điều trị tại chỗ, cung cấp qua việc truyền. Việc truyền ngoài ngoài đường tiêu hóa bao gồm việc cung cấp trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong màng bụng, hoặc dưới da. Liệu lượng có thể bởi bất kỳ tuyến thích hợp nào, tức là, bằng cách tiêm, như trong tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, phụ thuộc một phần vào việc liệu việc cung cấp trong thời gian ngắn hoặc mãn tính. Lịch liều lượng khác nhau bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các việc cung cấp một hoặc nhiều lần qua các thời điểm khác nhau, việc cung cấp viên thuốc to, và truyền mạch được xem xét ở đây.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được tạo công thức, cho liều, và cung cấp theo cách phù hợp với các phòng khám y học tốt. Các yếu tố cần xem xét

theo sáng chế bao gồm rối loạn cụ thể được điều trị, động vật có vú cụ thể được điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân gây rối loạn, vị trí phân phối tác nhân, phương pháp cung cấp, the thời gian cung cấp, và các yếu tố khác được biết đến đối với người có trình độ trong lĩnh vực y học. Kháng thể không cần, nhưng được tùy ý tạo công thức với một hoặc nhiều tác nhân thường được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn đang được nghi ngờ. Lượng hữu hiệu của các tác nhân khác tùy thuộc vào lượng kháng thể có mặt trong việc tạo công thức, các dạng rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác được đề cập dưới đây. Chúng thường được sử dụng với cùng một liều lượng và với các tuyến cung cấp như mô tả ở đây, hoặc khoảng từ 1 đến 99% liều lượng mô tả ở đây, hoặc với bất kỳ liệu lượng và bất kỳ tuyến nào được xác định theo kinh nghiệm/lâm sàng thích hợp.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của kháng thể theo sáng chế (khi được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợ với một hoặc nhiều tác nhân điều trị bổ sung khác) sẽ tùy thuộc vào dạng bệnh để được điều trị, dạng của kháng thể, mức độ nghiệm trọng và giai đoạn của bệnh, kháng thể được cung cấp với mục đích ngăn ngừa hoặc điều trị, liệu pháp trước đây, lịch sử lâm sàng bệnh nhân và phản ứng tới kháng thể, và tùy theo quyết định của bác sỹ chăm sóc. Kháng thể được cung cấp một cách thích hợp tới bệnh nhân với một hoặc nhiều việc điều trị. Tùy thuộc vào mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng 1 microgam/kg đến 15 mg/kg (tức là, 0,1mg/kg-10mg/kg) của kháng thể có thể là liều lượng ban đầu cho việc cung cấp tới bệnh nhân, ví dụ, bởi một hoặc nhiều việc cung cấp riêng rẽ, hoặc bằng cách truyền liên tục. Liều lượng hằng ngày có thể nằm trong khoảng từ 1 microgam/kg đến 100 mg/kg hoặc nhiều hơn, tùy thuộc vào các yếu tố được đề cập trên đây. Đối với việc cung cấp liên tiếp trong vài ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào điều kiện, việc điều trị sẽ được duy trì liên tục cho đến khi việc giảm triệu chứng bệnh xuất hiện. Liều lượng mẫu của kháng thể có thể nằm trong khoảng từ 0,05 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg. Do đó, một hoặc nhiều liệu khoảng 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg hoặc 10 mg/kg (hoặc bất kỳ sự kế hợp nào của nó) có thể được cung cấp cho bệnh nhân. Các lượng này có thể được cung cấp không liên tục, tức là, mỗi tuần hoặc mỗi ba

tuần (tức là, bệnh nhân nhận được từ khoảng từ hai tới khoảng hai mươi, hoặc tức là, khoảng sáu liều của kháng thể). Liều ban đầu được nạp cao hơn, tiếp theo bởi một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được cung cấp. Tiến hành liệu pháp này dễ dàng được theo dõi bởi các thử nghiệm và kỹ thuật thông thường.

Cũng được hiểu rằng bất kỳ các việc tạo công thức hoặc các phương pháp điều trị trên đây có thể được thực hiện sử dụng tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế thay cho kháng thể kháng C5.

H. Các điều kiện sản xuất

Theo khía cạnh khác theo sáng chế, điều kiện sản xuất chứa các chất hữu ích đối với việc điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn mô tả trên đây được cung cấp. Điều kiện sản xuất bao gồm một vật chứa và một nhãn hoặc sản phẩm đóng gói hoặc có liên quan đến vật chứa. Các vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, ống tiêm, túi dung dịch IV, .v.v.. Các vật chứa có thể được tạo từ các vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc nhựa. Vật chứa chứa chế phẩm bởi nó hoặc được kết hợp với chế phẩm khác hữu ích trong việc điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng và có thể có cổng truy cập vô trùng (ví dụ vật chứa có thể là túi dung dịch trong tĩnh mạch hoặc một lọ có một nút có thể đâm thủng bởi kim tiêm dưới da). Ít nhất một tác nhân hoạt tính trong chế phẩm là kháng thể theo sáng chế. Nhãn hoặc sản phẩm đóng gói cho thấy rằng chế phẩm được sử dụng để điều trị các điều kiện đã được lựa trọn. Ngoài ra, điều kiện sản xuất có thể bao gồm (a) một vật chứa đầu tiên với chế phẩm được chứa ở đây, trong đó chế phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế; và (b) vật chứa thứ hai với chế phẩm được chứa ở đây, trong đó chế phẩm bao gồm tác nhân gây độc tế bào hoặc tác nhân điều trị khác. Điều kiện sản xuất theo khía cạnh theo sáng chế còn có thể chứa sản phẩm đóng gói cho thấy rằng các chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị rối loạn cụ thể. Ngoài ra hoặc hơn nữa, điều kiện sản xuất có thể còn chứa vật chứa thứ hai (hoặc thứ ba) bao gồm chất đệm dược dụng, như nước kìm hãm vi khuẩn để tiêm (BWFI), salin được đệm phosphate, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Có thể còn bao gồm các nguyên liệu khác thích hợp từ thương mại và lập trường người sử dụng, bao gồm các chất đêm, chất pha loãng, chất lọc, kim tiêm, và ống tiêm khác.

Cũng được hiểu rằng bất kỳ điều kiện sản xuất nào trên đây có thể bao gồm một tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế thay cho hoặc bổ sung vào kháng thể kháng C5.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây là các ví dụ của các phương pháp và các chế phẩm theo sáng chế. Cũng được hiểu rằng nhiều phương án khác có thể thực hiện, với sự mô tả chung được cung cấp trên đây.

Ví dụ 1

Điều chế C5

1.1. Việc biểu hiện và tinh chế tái tổ hợp ở người và khỉ cynomolgus C5

Tái tổ hợp ở người C5 (số gia nhập NCBI GenBank: NP_001726,2, SEQ ID NO: 39) được biểu hiện thoáng qua sử dụng dòng tế bào FreeStyle293-F (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA). Môi trường điều kiện biểu hiện C5 ở người được pha loãng với cùng khối lượng của nước milliQ, sau đó ap dụng lên cột trao đổi anion Q-sepharoza FF hoặc Q-sepharoza HP (GE healthcare, Uppsala, Thụy Điển), tiếp theo được tách với NaCl gradient. Các phân tử chứa C5 người được were tổng hợp, sau đó nồng độ muối và pH được điều chỉnh tới 80mM NaCl và pH6,4, tương ứng. Mẫu thu được được áp dụng lên cột trao đổi cation SP-sepharoza HP (GE healthcare, Uppsala, Thụy Điển) và được tách rửa với NaCl gradient. Các phân tử chứa C5 người được tổng hợp và trải qua cột CHT xeramic Hydroxyapatit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Nước giải hấp C5 người sau đó được áp dụng lên cột lọc gel Superdex 200 (GE healthcare, Uppsala, Thụy Điển). Các phân tử chứa C5 người được tổng hợp và được bảo quản ở -150 độ C.

Việc biểu hiện và tinh chế tái tổ hợp khỉ cynomolgus C5 (số gia nhập NCBI GenBank: XP_005580972, SEQ ID NO: 44) được thực hiện tương tự như đối chứng ở người.

1.2. Tinh chế khỉ cynomolgus C5 (cynoC5) từ huyết tương

Mẫu huyết tương từ khỉ cynomolgus được áp dụng vào SSL7-agaroza (Invivogen, San Diego, CA, USA) tiếp theo bởi sự tách rửa với 100mM

NaAxetate, pH3,5. Các phân tử chứa cynoC5 ngay lập tức được trung hòa và được đưa qua cột Protein A HP (GE healthcare, Uppsala, Thụy Điển) song song với Peptide M agaroza (Invivogen, San Diego, CA, USA). Dòng chảy qua các phân tử sau đó được áp dụng lên cột lọc gel Superdex 200 (GE healthcare, Uppsala, Thụy Điển). Các phân tử chứa cynoC5 được tổng hợp và bảo quản ở -80 độ C.

Ví dụ 2

Tạo các kháng thể kháng C5

2.1. Kiểm tra kháng thể

Các kháng thể kháng C5 được điều chế, chọn lọc và thử nghiệm như sau:

Thỏ mười hai tới mười sáu tuần tuổi NZW được miễn dịch trong da với C5 người và/hoặc C5 khỉ (50-100 microgam/liều/thỏ). Liều này được lặp lại 4-lần trong 2 tháng. Một tuần sau sự miễn dịch cuối cùng, lá lạch và máu được thu thấp từ thỏ đã được miễn dịch. Các tế bào B đặc hiệu kháng nguyên được nhuộm với kháng nguyên được dán nhãn, được sắp xếp với máy phân loại FCM (FACS aria III, BD), và được mạ trong các đĩa 96-giếng ở mật độ tế bào/giếng cùng với 25,000 tế bào/giếng của tế bào EL4 (bộ sưu tập nuôi cấy tế bào châu Âu) và môi trường điều kiện tế bào T hoạt hóa của thỏ được pha loãng 20 lần, và được nuôi cấy trong 7-12 ngày. Các tế bào EL4 được xử lý với mitomyxin C (Sigma, Cat No. M4287) trong 2 giờ và được rửa trước 3 lần. Môi trường điều kiện tế bào T hoạt hóa của thỏ được điều chế bằng cách nuôi cấy ức bào của thỏ trong RPMI-1640 chứa Phytohemagglutinin-M (Roche, Cat No. 1 1082132-001), phorbol 12-myristat 13-axetat (Sigma, Cat No. P1585) và 2% FBS. Sau khi nuôi cấy, sự nổi trên mặt nuôi cấy tế bào B được thu gom để phân tích thêm và các viên được bảo quản lạnh.

Thử nghiệm ELISA được sử dụng để thử nghiệm tính đặc hiệu của các kháng thể trong sự nổi trên mặt nuôi cấy tế bào B. Streptavidin (GeneScript, Cat No. Z02043) được phủ vào 384-giếng MAXISorp (Nunc, Cat No. 164688) ở 50nM trong PBS trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa sau đó được chặn với thiết bị chặn (Nacalai Tesque, Cat No. 03953-95) đuọc pha loãng 5 lần. C5 khỉ hoặc người được dán nhãn với NHS-PEG4-Biotin (PIERCE, Cat No. 21329)

và được bổ sung vào các đĩa ELISA đã được chặn, được ủ trong 1 giờ và được rửa. Sự nổi trên mặt nuôi cấy tế bào B được bổ sung vào các đĩa ELISA, được ủ trong 1 giờ và được rửa. Việc gắn kết được dò bởi kháng- IgG-rau họ cải peroxidaza thỏ dê (BETHYL, Cat No. A120-111P) tiếp theo là bổ sung ABTS (KPL, Cat No. 50-66-06).

Thử nghiệm ELISA được sử dụng để đánh giá gắn kết phụ thuộc pH của các kháng thể chống lại C5. Khánh IgG-Fc thỏ dê (BETHYL, Cat No. A120-111A) được pha loãng tới 1 microgam/ml với PBS(-) được bổ sung vào 384-giếng MAXISorp (Nunc, Cat No. 164688), được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và chặn với thiết bị chặn (Nacalai Tesque, Cat No. 03953-95) pha loãng 5 lần. Sau khi ủ, các đĩa được rửa và sự nổi trên mặt nuôi cấy tế bào B được bổ sung. Các đĩa được ủ trong 1 giờ, được rửa, và 500pM của C5 biotinylat hóa khỉ hoặc người được bổ sung và được ủ trong 1 giờ. Sau khi ủ, các đĩa được rửa và được ủ với hoặc pH=7,4 đệm MES (20 mM MES, 150 mM NaCl và 1,2 mM $CaCl_2$) hoặc pH=5,8 đệm MES (20 mM MES, 150 mM NaCl và 1 mM EDTA) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi ủ, việc gắn kết C5 biotinylat hóa được dò bởi tiếp hợp Streptavidin- peroxidaza rau họ cải (Thermo Scientific, Cat No. 21132) tiếp theo là bổ sung ABTS (KPL, Cat No. 50-66-06).

Hệ Octet RED384 (Pall Life Sciences) được sử dụng để đánh giá ái lực và gắn kết phụ thuộc pH của các kháng thể chống lại C5. Các kháng thể được sinh ra trong sự nổi trên mặt nuôi cấy tế bào B được nạp vào đầu thiết bị cảm biến sinh học Protein A (Pall Life Sciences) và được ngâm vào 50 nM của C5 khỉ hoặc người trong pH=7,4 đệm MES để phân tích động lực học kết hợp. Động lực học kết hợp được phân tích trong cả hai pH=7,4 đệm MES và pH=5,8 đệm MES.

Tổng các dòng tế bào B 41,439 được sàng lọc đối với ái lực và gắn kết phụ thuộc pH tới C5 khỉ hoặc người và các dòng 677 được chọn lọc và chỉ định CFA0001-0677. RNA của các dòng đã được chọn được tinh chế từ viên nén bảo quản lạnh sử dụng các kit ZR-96 Quick-RNA (ZYMO RESEARCH, Cat No. R1053). Các vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể mã hóa DNA trong các dòng đã được chọn được khuếch đại bằng cách sao chép ngược PCR và được tái tổ

hợp với vùng ổn định chuỗi nặng F760G4 (SEQ ID NO: 33) hoặc F939G4 (SEQ ID NO: 34) mã hóa DNA. Các vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể mã hóa DNA được khuếch đại bằng cách sao chép ngược PCR và được tái tổ hợp với vùng ổn định chuỗi nhẹ k0MTC mã hóa DNA (SEQ ID NO: 36). Ngoài ra, các gen chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể kháng C5 được làm tương thích với người hiện có, eculizumab (EcuH-G2G4, SEQ ID NO: 29 và EcuL-k0, SEQ ID NO: 30), được tổng hợp. DNA mã hóa VH (EcuH, SEQ ID NO: 31) được nối trong khung tới DNA mã hóa IgG4 được cải biến ở người CH (F760G4, SEQ ID NO: 33), và DNA mã hóa VL (EcuL, SEQ ID NO: 32) được nối trong khung tới DNA mã hóa vùng ổn định chuỗi nhẹ k0 (SEQ ID NO: 37). Mỗi trong các trình tự mã hóa được nối được nhân bản vào vectơ biểu hiện. Các kháng thể được biểu hiện trong các tế bào FreeStyle™ 293-F (Invitrogen) và được tinh chế từ sự nổi trên mặt nuôi cấy để đánh giá hoạt chức. Các hoạt tính trung hòa của các kháng thể được đánh giá bằng cách thử nghiệm hoạt tính ức chế bổ trợ sử dụng thử nghiệm tiêu thể mỡ như mô tả trong ví dụ 5,1.

2.2. Tạo thùng epitop bằng cách kẹp giữa ELISA

Các kháng thể kháng C5 có ái lực cao, hoạt tính trung hòa hoặc phụ thuộc vào pH được chọn để phân tích. Thử nghiệm kẹp giữa ELISA được sử dụng để phân loại các kháng thể được chọn vào các thùng epitop khác nhau gắn két tới các epitop cùng hoặc chồng chéo của protein C5. Các kháng thể chụp không được dán nhãn được pha loãng 1 microgam/ml với PBS (-) và được bổ sung vào các đĩa 384-giếng MAXISorp (Nunc, Cat No. 164688). Các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và chặn với thiết bị chặn (Nacalai Tesque, Cat No. 03953-95) pha loãng 5 lần. Các đĩa được ủ trong 1 giờ, được rửa, và 2 nM của C5 người được bổ sung và được ủ trong 1 giờ. Sau khi ủ, các đĩa được rửa và các kháng thể dò được dán nhãn (1microgam/mL, biotinylat hóa bởi NHS-PEG4-Biotin) được bổ sung. Sau 1 giờ ủ, gắn kết của kháng thể biotinylat hóa được dò bởi tiếp hợp Streptavidin- peroxidaza rau họ cải (Thermo Scientific, Cat No. 21132) tiếp theo là bổ sung ABTS (KPL, Cat No. 50-66-06).

Tất cả các kháng thể kháng C5 được sử dụng như là cả hai kháng thể chụp và kháng thể dò, và được nối toàn diện. Như được chỉ ra trong Fig. 1, các kháng

thể cạnh tranh lẫn nhau được tập hợp thành nhóm vào 7 thùng epitop: CFA0668, CFA0334 và CFA0319 được tập hợp thành nhóm vào epitop A, CFA0647, CFA0589, CFA0341, CFA0639, CFA0635, CFA0330 và CFA0318 được tập hợp thành nhóm vào epitop B, CFA0538, CFA0501, CFA0599, CFA0307, CFA0366, CFA0305, CFA0675, CFA0666 và CFA0672 được tập hợp thành nhóm vào epitop C, eculizumab và CFA0322 được tập hợp thành nhóm vào epitop D, CFA0329 được tập hợp thành nhóm vào epitop E, CFA0359 và CFA0217 được tập hợp thành nhóm vào epitop F, và CFA0579, CFA0328 và CFA0272 được tập hợp thành nhóm vào epitop G. Fig. 1 chỉ ra việc gắn kết epitop của một số các kháng thể dạng khảm kháng C5. Các trình tự của các kháng thể VH và VL kháng C5 được tập hợp thành nhóm vào epitop C được liệt kê trong bảng 2.

Bảng 2

Các kháng thể kháng C5 được nhóm vào epitop C

	SEQ ID NO:							
Các kháng thể	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. Làm tương thích với người và tối ưu hóa

Việc làm tương thích với người của vùng biến đổi của một số các kháng thể kháng C5 được thực hiện để làm giảm khả năng miễn dịch của các kháng thể. Các vùng xác định tính bổ trợ (các CDR) của kháng thể kháng C5 thỏ được ghép vào các khung tương ứng kháng thể ở người (các FR) sử dụng cách tiếp cận ghép CDR thông thường (Nature 321:522-525 (1986)). Các gen mã hóa VH và VL được làm tương thích với người được tổng hợp và được kết hợp với IgG4 được cải biến ở người CH (SG402, SEQ ID NO: 35) và CL ở người (SK1, SEQ ID NO: 38), tương ứng, và mỗi trong các trình tự được kết hợp được nhân bản vào vectơ biểu hiện.

Một số đột biến và các kết hợp đột biến đã được kiểm tra xác định các đột biến và các kết hợp đột biến cải thiện các đặc tính gắn kết của một số kháng thể dẫn đầu. Nhiều đột biến sau đó được đưa vào các vùng biến đổi được được làm tương thích với người để tăng cường ái lực gắn kết với C5 ở pH trung hòa hoặc làm giảm ái lực gắn kết với C5 ở pH có tính axit. Một trong những biến thể tối ưu hóa, 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; và HVR-L3, SEQ ID NO: 104), do được được tạo từ CFA0305.

Các kháng thể được biểu hiện trong các tế bào HEK293 đồng truyền nhiễm với hỗn hợp của các vectơ biểu hiện chuỗi nặng và nhẹ và được tinh chế bởi protein A.

Ví dụ 3

Đặc tính gắn kết của các kháng thể kháng C5

3.1. Việc biểu hiện và tinh chế của các kháng thể tái tổ hợp

Các kháng thể tái tổ hợp được biểu hiện tạm thời sử dụng dòng tế bào FreeStyle293-F (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA). Việc tinh chế từ các kháng thể biểu hiện môi trường nuôi cấy được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thông thường sử dụng protein A. Việc lọc gel còn được tiến hành thêm nếu cần.

3.2. Đánh giá sự phụ thuộc pH

Các thông số động lực của các kháng thể kháng C5 chống lại tái tổ hợp C5 ở người được đánh giá ở pH=7,4 và pH=5,8, ở 37 độ C sử dụng BIACORE (nhãn được đã đăng ký) công cụ T200 (GE Healthcare). ProA/G (Pierce) được giữ cố định vào bộ cảm biến CM4 sử dụng kit nối amin (GE Healthcare) theo các thiết lập được đề nghị bởi GE Healthcare. Các kháng thể và các phân tích được pha loãng vào các chất đệm hoạt động tương ứng, ACES pH=7,4 và pH=5,8 (20 mM ACES, 150 mM NaCl, 1,2 mM $CaCl_2$, 0,05% Tween 20, 0,005% NaN_3). Mỗi kháng thể được chụp lên bề mặt cảm biến bằng ProA/G. Mức độ chụp kháng thể thường là 60-90 đơn vị cộng hưởng (RU). Sau đó, tái tổ

hợp ở người C5 được tiêm ở nồng độ là 10 và 20 nM hoặc 20 và 40 nM sau đó phân ly. Bề mặt được tái sinh sử dụng 25 mM NaOH. Các tham số động lực ở cả hai điều kiện pH được xác định bằng cách điều chỉnh ký hiệu cảm biến với 1:1 mẫu gắn kết sử dụng BIACORE (nhãn được đã đăng ký) phần mềm đánh giá T200, phiên bản 2,0 (GE Healthcare). Ký hiệu cảm biến của tất cả các kháng thể được chỉ ra trong các Fig. 2A và 2B. Tỷ lệ gắn kết (ka), tỷ lệ phân ly (kd), và ái lực gắn kết (KD) của các kháng thể được liệt kê trong bảng 3. Tất cả các kháng thể ngoại trừ CFA0330 (VH, SEQ ID NO: 21 và VL, SEQ ID NO: 25) và CFA0341 (VH, SEQ ID NO: 22 và VL, SEQ ID NO: 26) cho thấy tỷ lệ phân ly tương đối nhanh hơn ở pH=5,8 so với pH=7,4.

Bảng 3

Thông số động lực học của các kháng thể kháng C5 dưới các điều kiện pH 7,4 và pH 5,8

Tên kháng thể	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	3.91E-09	1.22E+05	3.01E-02	2.46E-07
CFA0599	4.74E+05	2.81E-03	5.93E-09	4.54E+05	3.73E-02	8.21E-08
CFA0666	3.65E+05	6.26E-04	1.71E-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	6.61E-03	1.70E-08
305-LO5	4.48E+05	2.11E-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. Kiểm tra phản ứng chéo

Để quan sát phản ứng chéo của các kháng thể kháng C5 chống lại C5 người (hC5) và C5 khỉ cynomolgus (cynoC5), phân tích động lực học BIACORE (nhãn được đã đăng ký) được thực hiện. Sự bố trí thử nghiệm là tương tự như được mô tả trong ví dụ 3,2, tái tổ hợp cynoC5 được tiêm ở nồng độ là 2, 10, và 50 nM. Các tham số động lực được xác định bởi cùng một dữ liệu như mô tả trong ví dụ 3,2. Động lực học gắn kết và ái lực ở pH=7,4 được liệt kê trong bảng 4. Các tham số động lực chống lại hC5 được đưa ra trong bảng 4 là các kết quả của ví dụ 3,2. Tất cả các kháng thể kháng C5 ngoại trừ CFA0672 cho thấy KD

tương đồng đối với hC5 và cynoC5. KD của CFA0672 đối với cynoC5 là 8 lần thấp hơn so với hC5.

Bảng 4

Động lực học và ái lực gắn kết của các kháng thể kháng C5 chống lại hC5 và cynoC5 ở pH 7,4

Tên kháng thể	Kháng thể chống lại hC5			Ái lực chống lại cynoC5		
	ka	kd	KD	ka	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	3.91E-09	3.05E+05	1.66E-03	5.44E-09
CFA0599	4.74E+05	2.81E-03	5.93E-09	5.42E+05	2.35E-03	4.33E-09
CFA0666	3.65E+05	6.26E-04	1.71E-09	3.14E+05	4.93E-04	1.57E-09
CFA0672	5.23E+05	1.83E-04	3.51E-10	6.41E+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

Ví dụ 4

Tạo bản đồ epitop của các kháng thể kháng C5

4.1. Gắn kết các MAb kháng-C5 tới các peptit có nguồn gốc từ chuỗi C5 beta

Các kháng thể đơn dòng kháng C5 (MAbs) được thử nghiệm để gắn kết với các peptit có nguồn gốc từ chuỗi C5 beta trong phân tích thẩm tách Western. Các peptit C5: 19-180, 161-340, 321-500, và 481-660, được nối với nhãn GST (pGEX-4T-1, GE Healthcare Life Sciences, 28-9545-49) được biểu hiện trong *E. coli* (DH5alpha, TOYOBO, DNA-903). Các mẫu *E. coli* được thu hoạch sau khi ủ với 1 mM Isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) trong 5 giờ ở 37 độ C, và được ly tâm ở 20000 x g trong 1 phút để thu được các viên. Các viên được huyền phù với dung dịch chất đệm mẫu (2ME+) (Wako, 191-13272), và được sử dụng để phân tích thẩm tách Western. Việc biểu hiện của peptit được xác định bằng kháng thể kháng GST (Abcam, ab9085) (Fig. 3). Mũi tên cho thấy các peptit C5 nối GST (46-49kDa). Các MAb kháng-C5: CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672, và CFA0675, được nối với 19-180 của C5 (Fig. 3).

4.2. Việc biểu hiện và tinh chế miền MG1-MG2 (1-225) ở C5 người

Miền tái tổ hợp MG1-MG2 (SEQ ID NO: 43) của chuỗi C5 beta ở người được biểu hiện tạm thời sử dụng dòng tế bào FreeStyle293-F (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA). Môi trường được nuôi cấy biểu hiện miền MG1-MG2 được pha loãng với 1/2 thể tích của nước milliQ, sau đó áp dụng vào cột trao đổi anion Q-sepharoza FF (GE healthcare, Uppsala, Thụy Điển). Dòng chảy qua phân số từ cột trao đổi anion được điều chỉnh tới pH=5,0 và được áp dụng vào cột trao đổi cation SP-sepharoza HP (GE healthcare, Uppsala, Thụy Điển) và được pha loãng với NaCl gradient. Các phân tử chứa miền MG1-MG2 được thu gom từ chất tách và sau đó được đưa vào cột lọc gel Superdex 75 (GE healthcare, Uppsala, Thụy Điển) được cân bằng với 1x PBS. Các phân tử chứa miền MG1-MG2 sau đó được tổng hợp và lưu trữ ở -80 độ C.

4.3. Khả năng gắn kết với miền MG1-MG2

Khả năng gắn kết của các kháng thể kháng C5 về phía miền MG1-MG2 được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm tương tự như mô tả trong ví dụ 3,2, ngoại trừ các phép đo chỉ được thực hiện dưới điều kiện pH=7,4. Miền MG1-MG2 được tiêm ở nồng độ là 20 nM và 40 nM. Như được chỉ ra trong Fig. 4, tất cả các kháng thể ngoại trừ eculizumab-F760G4 cho thấy sự gia tăng của đáp ứng gắn kết, cho thấy các kháng thể này là chất gắn kết MG1-MG2. Eculizumab-F760G4, là chất gắn kết chuỗi alpha đã biết, không cho thấy gắn kết với miền MG1-MG2.

4.4. Gắn kết của các MAb kháng C5 tới các peptit có nguồn gố từ miền MG1-MG2 C5

Các MAb kháng C5 được thử nghiệm đối với việc gắn kết với các peptit có nguồn gố từ miền MG1-MG2 trong phân tích thẩm tách Western. Các peptit C5: 33-124, 45-124, 52-124, 33-111, 33-108, và 45-111 (SEQ ID NO:40), được nối với nhãn GST, được biểu hiện trong *E. coli*. Các mẫu *E. coli* được thu hoạch sau khi ủ với 1 mM IPTG trong 5 giờ ở 37 độ C, và được ly tâm ở 20000 x g trong 1 phút để thu được các viên. Các viên này được huyền phù với dung dịch chất đệm mẫu (2ME+), và được sử dụng để phân tích thẩm tách Western. Việc biểu

hiện của các peptit có nguồn gốc C5 được xác định bằng kháng thể kháng GST (Fig. 5A). CFA0305 chỉ được gắn kết với peptit của 33-124 (Fig. 5B). CFA0305 được gắn kết với chuỗi beta của tái tổ hợp ở người C5 (rhC5) (khoảng70kDa), được sử dụng như là một đối chứng. Fig. 5C tóm tắt phản ứng của các MAb kháng-C5 tới các peptit có nguồn gốc C5.

4.5. Gắn kết của các MAb kháng C5 tới các đột biến C5

Do ba gốc axit amin trong chuỗi C5 beta: E48, D51, và K109, được dự đoán là có liên quan đến việc gắn kết giữa C5 và các MAb kháng C5 bởi phân tích cấu trúc tinh thể, các MAb kháng C5 được thử nghiệm đối với việc gắn kết với các đột biến điểm C5 ở người trong phân tích thẩm tách Western. Các đột biến điểm C5, trong đó bất kỳ E48, D51, và K109 nào được thế với alanin, được biểu hiện trong các tế bào FS293 bằng cách chuyển nạp. Môi trường nuôi cấy được thu hoạch 5 ngày sau khi chuyển nạp, và sau đó được sử dụng cho thẩm tách Western. SDS-PAGE được thực hiện dưới các điều kiện giảm. Các kết quả được chỉ ra trong Fig. 6. Eculizumab được gắn kết với chuỗi alpha C5 dạng tự nhiên (WT) và ba đột biến điểm C5, trong khi CFA0305 được gắn kết mạnh mẽ tới chuỗi beta của WT C5, gắn kết yếu ớt tới đột biến C5 E48A, và không gắn kết với chuỗi beta của các đột biến C5D51A và K109A, cho thấy rằng 3 gốc axit amin này có liên quan đến kháng thể/các sự tương tác kháng nguyên. Bảng 5 đề cập sơ lược về phép phân tích thẩm tách Western của các MAb kháng C5 (CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672, và CFA0675). Các MAb kháng C5 được tập hợp thành nhóm vào cùng một epitop C, nhưng các mẫu gắn kết là hơi khác nhau giữa các kháng thể, cho thấy rằng các vùng gắn kết của C5 tới các MAb kháng C5 gần nhau nhưng không giống nhau.

Bảng 5

Tóm tắt phản ứng các Mab kháng C5 tới các đột biến C5

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

4.6. Phân tích gắn kết BIACORE (nhãn được đã đăng ký) của các kháng thể kháng C5 với các đột biến C5

Để thử nghiệm nếu gốc E48, G51, và K109 có liên quan trong kháng thể/các sự tương tác kháng nguyên, phân tích gắn kết BIACORE (nhãn được đã đăng ký) được thực hiện. Ba đột biến C5 được điều chế: E48A, G51A, và K109A, như mô tả trong ví dụ 4,5. Các mẫu nổi trên mặt nuôi cấy chứa đột biến C5 được biểu hiện quá mức trong các tế bào FS293 được điều chế ở 40 microgam/ml của đột biến C5. Đối với việc phân tích gắn kết BIACORE (nhãn được đã đăng ký), mẫu này được pha loãng 10x với chất đệm hoạt động BIACORE (nhãn được đã đăng ký) (ACES pH=7,4, 10 mg/ml BSA, 1 mg/ml carboxymetyl dextran) tới nồng độ mẫu cuối cùng là 4 microgam/ml của đột biến C5.

Các sự tương tác của ba đột biến C5 với các kháng thể kháng C5 được đánh giá ở 37 độ C với BIACORE (nhãn được đã đăng ký) công cụ T200 (GE Healthcare), sử dụng điều kiện thử nghiệm mô tả trong ví dụ 3,2. Chất đệm ACES pH=7,4 chứa 10 mg/ml BSA, 1 mg/ml carboxymethyl dextran được sử dụng như chất đệm hoạt động. Eculizumab-F760G4 và 305LO5 được chụp trên

các tế bào dòng chảy khác nhau bởi IgG đơn dòng kháng người chuột, kháng đoạn đặc hiệu thể Fc (GE Healthcare). Tế bào dòng 1 được sử dụng như bề mặt tham khảo. Các protein dạng tự nhiên và đột biến C5 được tiếm trên bề mặt cảm biến ở nông độ 4 microgam/ml để tương tác với các kháng thể đã chụp. Vào cuối mỗi chu kỳ phân tích, bề mặt cảm biến được tái sinh với 3M $MgCl_2$. Các kết quả được phân tích với phần mềm đánh giá Bia, phiên bản 2,0 (GE Healthcare). Các đường cong của tế bào dòng tham chiếu (tế bào dòng 1) và các việc tiêm trống của chất đệm hoạt động được trừ từ các đường cong của tế bào dòng với các kháng thể đã chụp.

Như được chỉ ra trong Fig. 7, tất cả ba đột biến C5 có thể gắn kết với eculizumab với tình chất gắn kết tương tự so với C5 dạng tự nhiên. Đối với 305LO5, tất cả ba đột biến cho thấy đáp ứng gắn kết với 305LO5 thấp hơn so với C5 dạng tự nhiên. Các đột biến D51A và K109A giảmm gắn kết của của C5 bởi 305LO5 tới mức chuẩn.

4.7. Xác định các gốc His trên C5 góp phần tương tác phụ thuộc vào pH giữa kháng thể kháng C5 và C5

Sự phân tích cấu trúc tinh thể bộc lộ rằng 3 gốc histidin trên C5 người được đặt tại giao diện kháng thể/kháng nguyên. Gốc histidin với pKa điển hình vào khoảng 6,0 được biết là góp phần vào các sự tương tác protein-protein phụ thuộc vào pH (Igawa et al., Biochim Biophys Acta 1844(11):1943-1950 (2014)). Để nghiên cứu gốc His trên giao diện kháng thể/kháng nguyên góp phần tương tác phụ thuộc vào pH giữa kháng thể kháng C5 và C5, phân tích gắn kết BIACORE (nhãn được đã đăng ký) được thực hiện. Ba đột biến C5 ở người với đột biến đơn của His (H70Y, H72Y, và H110Y) và đột biến với đột biến His đôi (H70Y + H110Y) được điều chế như sau: các đột biến His đơn trong đó bất kỳ H70, H72, và H110 được thế với tyrosin, và đột biến His đôi trong đó cả hai H70 và H110 được thế với tyrosin, được biểu hiện trong các tế bào FS293 bằng cách chuyển nạp. Các đặc tính gắn kết kháng nguyên của các đột biến His C5 tới 305LO5, kháng thể phụ thuộc vào pH kháng C5, được xác định bởi thử nghiệm

BIACORE đã được cải biến(nhãn được đã đăng ký) như mô tả trong ví dụ 4,6. Tóm lại, pha phân ly bổ sung ở pH=5,8 được tích hợp vào thử nghiệm BIACORE (nhãn được đã đăng ký) ngay lập tức sau pha phân ly ở pH=7,4 để đánh giá sự phân ly phụ thuộc vào pH giữa kháng thể và kháng nguyên từ các phức được tạo thành ở pH=7,4. Tỷ lệ phân ly ở pH=5,8 được xác định bằng cách xử lý và điều chỉnh dữ liệu sử dụng phần mềm điều chỉnh đường cong Scrubber 2,0 (phần mềm BioLogic).

Như được chỉ ra trong Fig. 8, Đột biến His đơn C5 ở H70 hoặc H110 và đột biến His đôi (H70 + H110) không ảnh hưởng đến việc gắn kết của C5 tới 305LO5 tại pH trung hòa. Trong khi đó, đột biến His đơn ở H72 cho thấy sự suy yếu đáng kể của việc gắn kết của C5 tới 305LO5. Tỷ lệ phân ly ở pH=5,8 đối với các đột biến His C5và C5-wt protein được chỉ ra trong bảng 6. Như được chỉ ra trong bảng 6, C5-wt cho thấy sự phân ly nhanh nhất từ 305LO5 ở pH=5,8 trong số C5 các kháng nguyên được thử nghiệm. Đột biến His đơn ở H70 có tỷ lệ phân ly chậm hơn gấp hai lần ở pH=5,8 và đột biến His đơn ở H110 dẫn đến tỷ lệ phân ly chậm hơn ở pH=5,8 so với C5-wt. Đột biến His đôi ở cả H70 và H110 dẫn đến hiệu quả hơn đối với sự gắn kết phụ thuộc pH với tỷ lệ phân ly ở pH=5,8 chậm hơn gần gấp ba lần so với C5-wt.

Bảng 6

Giá trị tỷ lệ phân ly pH 5,8 đối với các đột biến His C5 gắn kết

Các kháng nguyên	kd (1/s)
C5-wt	1.1E-2
C5-H70Y	5.3E-3
C5-H110Y	9.3E-3
C5-H70Y, H110Y	3.9E-3

Ví dụ 5

Hoạt tính ức chế của các kháng thể kháng C5 trên sự hoạt hóa C5

5.1. Sự ức chế bổ trợ-sự tiêu thể mỡ hoạt tính bởi các MAb kháng C5

Các MAb kháng C5 được thử nghiệm đối với sự ức chế hoạt tính bổ trợ bởi thử nghiệm tiêu thể mỡ. Ba mươi microlit của huyết thanh người bình thường

(6,7%) (Biopredic, SER018) được trộn với 20 microlit của MAb được pha loãng trong đĩa 96-giếng và được ủ trên máy lắc trong 30 phút ở 25 độ C. Các thể mỡ làm cho nhạy cảm với các kháng thể chống lại dinitrophenyl (kit tự động CH50, Wako, 995-40801) được đưa vào mỗi giếng và đĩa được đặt trên máy lắc trong 2 phút ở 25 độ C. Năm mươi microlit của dung dịch chất nền (Kit tự động CH50) được bổ sung vào mỗi giếng và được trộn bằng cách lắc trong 2 phút ở 25 độ C. Hỗn hợp cuối cùng được ủ ở 37 độ C trong 40 phút, và sau đó OD ở 340 nm của hỗn hợp được đo. Phần trăm của sự tiêu thể mỡ được xác định như 100 x [(OD $_{MAb}$ - OD $_{huyết\ thanh\ và\ nền\ thể\ mỡ}$)]/ [(OD $_{không\ có\ MAb}$ - OD $_{huyết\ thanh\ và\ nền\ thể\ mỡ}$)]. Fig. 9A chỉ ra rằng các MAb kháng C5: CFA0305, 0307, 0366, 0501, 0538, 0599, 0666, 0672, và 0675, ức chế sự tiêu thể mỡ. hai các kháng thể không phụ thuộc vào pH: CFA0330 và 0341, cũng ức chế sự tiêu này (Fig. 9B).

5.2. Ức chế sự tạo ra C5a bởi các MAb kháng C5

Các MAb kháng C5 được thử nghiệm đối với việc tạo C5a trong suốt quá trình tiêu thể mỡ để xác nhận rằng các MAb kháng C5 ức chế sự phân tách của C5 thành C5a và C5b. Mức độ C5a trong ở các sự nổi trên mặt từ thử nghiệm tiêu thể mỡ được xác định sử dụng kit C5a ELISA (các hệ R&D, DY2037). Tất cả các MAb ức sự sự tạo C5a trong sự phụ thuộc liều nổi trên bề mặt (các Fig. 10A và 10B).

5.3. Sự ức chế bổ trợ-phân hủy hoạt hóa bởi các MAb kháng C5

Các MAb kháng C5 được thử nghiệm để ức chế hoạt tính bổ trợ chính thống trong thử nghiệm thiếu máu do tan huyết. Các tế bào hồng cầu gà (các cRBC) (Innovative research, IC05-0810) được rửa với salin được đệm với gelatin/verona chứa 0,5 mM $MgCl_2$ và 0,15 mM $CaCl_2$ (GVB++) (Boston BioProducts, IBB-300X), và sau đó làm cho nhạy cảm với kháng thể kháng RBC của gà (Rockland 103-4139) ở 1 microgam/ml trong 15 phút ở 4 độ C. Các tế bào sau đó được rửa với GVB++ và được huyền phù trong cùng chất đệm ở 5 x 10^7 tế bào/ml. Trong đĩa microtest đáy tròn 96-giếng riêng biệt, 50 microlit của huyết thanh người bình thường (20%) (Biopredic, SER019) được trộn với

50 microlit của Mab được pha loãng và được ủ trên máy lắc ở 37 độ C trong 30 phút. Sau đó, sáu mươi microlit của sự huyền phù của các cRBC làm cho nhạy cảm được bổ sung vào các giếng chứa huyết thanh, và hỗn hợp kháng thể được ủ ở 37 độ C trong 30 phút. Sau khi ủ, đĩa này được ly tâm ở 1000 x g trong 2 phút ở 4 độ C. Các sự nổi trên mặt (100 microlit) được đưa vào các giếng trên đĩa microtest 96-giếng đáy phẳng để xác định OD ở 415 nm với bước sóng tham chiếu ở 630 nm. Phần trăm của sự tan huyết được xác định như 100 x [(OD_{MAb} - $OD_{huyết\ thanh\ và\ các\ cRBC}$)]/ [($OD_{không\ có\ MAb}$ - $OD_{huyết\ thanh\ và\ nền\ các\ cRBC}$)]. Fig. 11 chỉ ra rằng các MAb kháng C5: CFA0305 và 305LO5, ức chế sự phân hủy của các cRBC.

5.4. Ức chế chuỗi các phản ứng hóa sinh bổ trợ thay thế bởi các MAb kháng C5

Thử nghiệm thiếu máu do tan huyết đối với chuỗi các phản ứng hóa sinh thay thế được thực hiện tương tự như thử nghiệm tan huyết chuỗi các phản ứng hóa sinh cổ điển. Máu được thu thập từ thỏ trắng New Zealand (InVivos) được trộn với cùng thể tích dung dịch của Alsever (Sigma, A3551), và hỗn hợp được sử dụng như RBCs chuột (rRBCs). rRBCs được rửa với GVB được bổ sung với 2 mM $MgCl_2$ và 10 mM EGTA và được huyền phù trong cùng chất đệm ở 7 x 10^8 tế bào/ml. Trong đĩa microtest đáy tròn 96 giếng, 40 microlit của huyết thanh người bình thường (25%) (Biopredic, SER019) được trộn với 40 microlit của Mab được pha loãng và được ủ trên máy lắc ở 37 độ C trong 30 phút. Hai mươi microlit của huyền phù rRBCs được bổ sung vào các giếng chứa huyết thanh, và hỗn hợp kháng thể được ủ ở 37 độ C trong 60 phút. Sau khi ủ, đĩa được ly tâm ở 1000 x g trong 2 phút ở 4 độ C. Các dịch nổi bề mặt (70 microllit) được đưa vào các giếng trên đĩa microtest đáy phẳng 96 giếng để xác định OD ở 415 nm với bước sóng tham chiếu ở 630 nm. Fig. 12 chỉ ra rằng các MAb kháng C5: CFA0305 và CFA0672, ức chế phân hủy của rRBCs, cho thấy rằng các kháng thể này ức chế chuỗi các phản ứng hóa sinh bổ trợ thay thế.

Ví dụ 6

Tối ưu hóa các kháng thể đơn dòng kháng C5 (các biến thể 305)

Số lượng đột biến được đưa vào vùng biến đổi được tối ưu hóa của kháng thể kháng C5 305LO5 để cải thiện hơn nữa các đặc tính của nó, và the các vùng biến đổi được tối ưu hóa 305LO15, 305LO16, 305LO18, 305LO19, 305LO20, 305LO22, và 305LO23 được tạo ra. Các trình tự axit amin của VH và VL của các biến thể 305 được liệt kê trong các bảng 7 và 8, tương ứng. Các gen mã hóa VH được làm tương thích với người được kết hợp với biến thể IgG1 CH SG115 được cải biến ở người (SEQ ID NO: 114), và biến thể IgG4 CH SG422 được cải biến ở người (SEQ ID NO: 115) hoặc SG429 (SEQ ID NO: 116). Các gen mã hóa được làm tương thích với người VL được kết hợp với CL ở người (SK1, SEQ ID NO: 38). Tách biệt nhau, các gen chuỗi nạng và nhẹ mã hóa kháng thể kháng C5 được làm tương thích với người, BNJ441 (BNJ441H, SEQ ID NO: 149; BNJ441L, SEQ ID NO: 150), được tổng hợp và được nhân bản vào một vectơ biểu hiện.

Các kháng thể được biểu hiện trong các tế bào HEK293 đồng truyền nhiễm với sự kếthợp của các vectơ biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ , và được tinh chế bởi protein A.

Bảng 7

Các trình tự axit amin VH của các đột biến 305

Kháng thể	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

Bảng 8

Các trình tự axit amin VL của các đột biến 305

kháng thể	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

Ví dụ 7

Đặc tính gắn kết của của các kháng thể kháng C5 (các biến thể 305)

Các tham số động lực của các kháng thể kháng C5 chống lại tái tổ hợp C5 ở người được đánh giá ở 37 độ C sử dụng BIACORE (nhãn được đã đăng ký) công cụ T200 (GE Healthcare) ở ba điều kiện khác nhau; (1) cả sự liên kết và phân ly ở pH=7,4, (2) cả sự liên kết và phân ly ở pH=5,8, và (3) sự liên kết ở pH=7,4 nhưng sự phân ly ở pH=5,8. ProA/G (Pierce) được giữ cố định vào bộ cảm biến CM1sử dụng kit nối amin (GE Healthcare) theo các thiết lập được đề nghị bởi GE Healthcare. Các kháng thể và các phân tích đối với điều kiện (1) và (3) được pha loãng trong chất đệm ACES pH=7,4 (20 mM ACES, 150 mM NaCl, 1,2 mM $CaCl_2$, 0,05% Tween 20, 0,005% NaN_3) và đối với điều kiện (2) chúng được pha loãng trong chất đệm ACES pH=5,8 (20 mM ACES, 150 mM NaCl, 1,2 mM $CaCl_2$, 0,05% Tween 20, 0,005% NaN_3). Mỗi kháng thể được chụp lên bề mặt cảm biến bằng ProA/G. Mức chụp kháng thể thường là 60-90 đơn vị cộng hưởng (RU). Sau đó, tái tổ hợp C5 ở người được tiêm ở 3 đến 27 nM hoặc 13,3 đến 120 nM được điều chế bằng chuỗi pha loãng ba lần, sau đó phân ly. Bề mặt được tái sinh sử dụng 25 mM NaOH. Các tham số động lực ở điều kiện (1) và (2) được xác định bằng cách điều chỉnh ký hiệu cảm biến với 1:1 mẫu gắn kết và tỷ lệ phân ly ở điều kiện (3) được xác định bằng cách điều

chỉnh ký hiệu cảm biến với 1:1 sự phân ly đối với mẫu MCK sử dụng BIACORE (nhãn được đã đăng ký) phần mềm đánh giá T200, phiên bản 2,0 (GE Healthcare). Sự phụ thuộc pH của tất cả các kháng thể được chỉ ra như là tỷ lệ phân ly của điều kiện (2) và (1).

Tỷ lệ gắn kết (ka), tỷ lệ phân ly (kd), ái lực gắn kết (KD), và sự phụ thuộc pH được liệt kê trong bảng 9. Tất cả các kháng thể cho thấy tỷ lệ phân ly ở pH=5,8 nhanh hơn so với pH=7,4 và sự phụ thuộc pH của nó khoảng 20 lần.

Bảng 9

Tham số động lực học của các biến thể kháng thể kháng C5 dưới các điều kiện pH 7,4 và pH 5,8

	7.4_7.4			5.8_5.8			7.4_5.8	Phụ thuộc pH
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	kd (1/s)	
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

Ái lực gắn kết của các kháng thể kháng C5 (BNJ441, eculizumab, và biến thể 305) tới tái tổ hợp ở người C5 ở pH=7,4 và pH=5,8 được xác định ở 37 độ C sử dụng BIACORE (nhãn được đã đăng ký) công cụ T200 (GE Healthcare) để đánh giá hiệu quả của pH khi gắn kết kháng nguyên. Kháng thể nhiều bản sao IgG (Fc) kháng người dê (KPL #01-10-20) được giữ cố định vào bộ cảm biến CM4 sử dụng kit nối amin (GE Healthcare) theo các thiết lập được đề nghị bởi nhà sản xuất. Các kháng thể và các phân tích được pha loãng hoặc trong chất đệm ACES pH=7,4 hoặc chất đệm ACES pH=5,8 chứa 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 1,2 mM $CaCl_2$, 0,05% Tween 20, và 0,005% NaN_3. Các kháng thể được chụp trên bề mặt cảm biến sử dụng phương pháp kháng Fc, các mức chụp thông thường ở 50-80 đơn vị cộng hưởng (RU). Tái tổ hợp C5 ở người được điều chế bằng cách pha loãng ba lần bắt đầu từ 27 nM đối với các điều kiện thử nghiệm pH=7,4, hoặc 135 nM đối với các thử nghiệm pH=5,8. Bề mặt được tái sinh sử

dụng 20 mM HCl, 0,01% Tween 20, Dữ liệu được xử lý và phù hợp với 1:1 mẫu gắn kết sử dụng phần mềm đánh giá Bia 2,0 (GE Healthcare).

Ái lực gắn kết (KD) của BNJ441, eculizumab, và biến thể 305 tới tái tổ hợp C5 ở người ở pH=7,4 và pH=5,8 được chỉ ra trong bảng 10, biến thể 305 cho thấy tỷ lệ của (KD ở pH=5,8)/(KD ở pH=7,4) là gàn 800, 8 lần cao hơn so với BNJ441 chỉ cho thấy tỷ lệ của (KD ở pH=5,8)/(KD ở pH=7,4) là 93.

Bảng 10

kháng thể	KD (M)		tỷ lệ của KD ở pH 5,8/pH 7,4
	pH 7,4	pH 5,8	
Đột biến 305LO5	1.66E-10	1.32E-07	795
Eculizumab	1.42E-10	2.64E-09	19
BNJ441	1.38E-09	1.28E-07	93

Ví dụ 8

Hoạt tính ức chế của các kháng thể kháng C5 (các biến thể 305) trên sự hoạt hóa C5

8.1. Sự ức chế bổ trợ-sự tiêu thể mỡ hoạt tính bởi các MAb kháng C5

Các MAb kháng C5 được thử nghiệm đối với sự ức chế hoạt tính bổ trợ bởi thử nghiệm tiêu thể mỡ. Ba mươi microlit của huyết thanh người bình thường (6,7%) (Biopredic, SER019) được trộn với 20 microlit của Mab được pha loãng trong đĩa 96-giếng và được ủ trên máy lắc trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch thể mỡ được làm cho nhạy cảm với các kháng thể chống lại dinitrophenyl (Kit tự động CH50, Wako, 995-40801) được đưa vào mỗi giếng và được đặt lên máy lắc trong 2 phút ở 37 độ C. Năm mươi microlit của dung dịch chất nền (Kit tự động CH50) được bổ sung vào mỗi giếng và được trộn bởi máy lắc trong 2 phút ở 37 độ C. Hỗn hợp cuối cùng được ủ ở 37 độ C trong 40 phút, và sau đó OD ở 340 nm được xác định. Phần trăm của sự tiêu thể mỡ được xác định như 100 x [(OD $_{MAb}$ - OD $_{huyết\ thanh\ và\ nền\ thể\ mỡ}$)]/ [(OD $_{không\ có\ MAb}$ - OD $_{huyết\ thanh\ và\ nền\ thể\ mỡ}$)]. Fig. 13 chỉ ra rằng các MAb kháng C5: 305LO15-SG422, 305LO16-SG422, 305LO18-SG422, 305LO19-SG422, 305LO20-SG422, và 305LO20-SG115, ức chế sự tiêu thể mỡ. Hai kháng thể với các biến thể Fc: 305LO15-SG115 và 305LO23-SG429, còn ức chế sự tiêu thể mỡ (Fig. 14).

Các MAb kháng C5 được thử nghiệm để ức chế tái tổ hợp C5 ở người (SEQ ID NO: 39). Mười microlit của huyết thanh người thiếu C5(Sigma, C1163) được trộn với 20 microlit của Mab được pha loãng và 20 microlit của tái tổ hợp C5 (0,1 microgam/mL) trong đĩa 96-giếng và được ủ trên máy lắc trong 1 giờ ở 37 độ C. Các thể mỡ (Kit tự động CH50) được đưa vào mỗi giếng và được đặt lên máy lắc trong 2 phút ở 37 độ C. Năm mươi microlit dung dịch chất nền (Kit tự động CH50) được bổ sung vào mỗi giếng và được trộn bởi máy lắc trong 2 phút ở 37 độ C. Hỗn hợp cuối cùng được ủ ở 37 độ C trong 180 phút, và sau đó OD ở 340 nm được xác định. Phần trăm của sự tiêu thể mỡ được xác định như trên. Fig. 15 chỉ ra rằng các MAb kháng C5: 305LO22-SG115, 305LO22-SG422, 305LO23-SG115, và 305LO23-SG422, ức chế sự tiêu thể mỡ.

8.2. Ức chế sự tạo ra C5a bởi các MAb kháng C5

Các MAb kháng C5 được thử nghiệm đối với việc tạo C5a trong suốt quá trình sự tiêu thể mỡ để xác nhận rằng các MAb kháng C5 ức chế sự phân tách của C5 thành C5a và C5b. Các mức C5a trong các dịch nổi bề mặt từ thử nghiệm tiêu thể mỡ được xác định sử dụng kit ELISA C5a (hệ R&D, DY2037). Tất cả các MAb ức chế sự tạo C5a trong các dịch nổi bề mặt theo cách phụ thuộc vào liều (các Fig. 16 và 17).

8.3. Xác định hoạt tính bổ trợ ở huyết tương khỉ cynomolgus

Các MAb kháng C5 được thử nghiệm đối với sự ức chế hoạt tính bổ trợ ở huyết tương khỉ cynomolgus. Các MAb kháng C5 được cung cấp bên trong khỉ (20mg/kg), và các mẫu huyết tương được thu gom định kỳ cho đến ngày 56. Các tế bào hồng cầu gà (cRBCs) (Innovative research, IC05-0810) được rửa với salin được đệm gelatin/veronal chứa 0,5 mM $MgCl_2$ và 0,15 mM $CaCl_2$ (GVB++) (Boston BioProducts, IBB-300X), và sau đó làm cho nhạy cảm với kháng thể kháng RBC của gà (Rockland 103-4139) ở 1 microgam/ml trong 15 phút ở 4 độ C. Các tế bào sau đó được rửa với GVB++ và được huyền phù trong cùng chất đệm ở 1 x 10^8 tế bào/ml. Trong đĩa microtest đáy tròn 96 giếng riêng biệt, huyết tương khỉ được ủ với cRBCs được làm cho nhạy cảm ở 37 độ C trong 20 phút.

Sau khi ủ, đĩa được ly tâm ở 1000 x g trong 2 phút ở 4 độ C. Các dịch nổi bề mặt được đưa vào các giếng trên các đĩa microtest đáy phẳng 96 giếng để xác định OD ở 415 nm với bước sóng tham chiếu ở 630 nm. Phần trăm của sự tan huyết được xác định như 100 x [(OD $_{\text{Hậu cung cấp}}$ - OD $_{\text{huyết tương và nền cRBCs}}$)]/ [(OD $_{\text{Tiền cung cấp}}$ - OD $_{\text{huyết tương và nền cRBCs}}$)]. Fig. 18 chỉ ra rằng các MAb kháng C5: 305LO15-SG422, 305LO15-SG115, 305LO16-SG422, 305LO18-SG422, 305LO19-SG422, 305LO20-SG422, 305LO20-SG115, và 305LO23-SG115, ức chế hoạt tính bổ trợ trong huyết tương.

8.4. Sự ức chế hoạt tính sinh học của các biến thể C5 bởi các MAb kháng C5

Các MAb kháng C5 được thử nghiệm để ức chế các biến thể tái tổ hợp C5 ở người: V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N, và E1437D. Còn được báo cáo rằng các bệnh nhân mắc PNH có đột biến R885H trong C5 cho thấy phản ứng kém với eculizumab (tham khảo, tức là, Nishimura et al., New Engl. J. Med. 370:632-639 (2014)). Mỗi của các biến thể C5 ở người được biểu hiện trong các tế bào FS293, và các dịch nổi bề mặt được sử dụng cho nghiên cứu sau đây. Mười microlit của huyết thanh người thiếu C5(Sigma, C1163) được trộn với 20 microlit của Mab được pha loãng và 20 microlit của môi trường nuôi cấy tế bào chứa biến thể tái tổ hợp C5 (2-3 microgam/mL) trong đĩa 96-giếng và được ủ trên máy lắc trong 0,5 giờ ở 37 độ C. Các thể mỡ (Kit tự động CH50) được đưa vào mỗi giếng và được đặt lên máy lắc trong 2 phút ở 37 độ C. Năm mươi microlit dung dịch chất nền (Kit tự động CH50) được bổ sung vào mỗi giếng và được trộn bởi máy lắc trong 2 phút ở 37 độ C. Hỗn hợp cuối cùng được ủ ở 37 độ C trong 90 phút, và sau đó OD ở 340 nm được xác định. Phần trăm của sự tiêu thể mỡ được xác định như trên. Fig. 19 chỉ ra rằng kháng C5 MAb (eculizumab) không ức chế biến thể R885H C5, nhưng ức chế các biến thể được thử nghiệm khác. Fig. 20 chỉ ra rằng kháng C5 MAb (biến thể 305) ức chế tất cả các biến thể của C5 được thử nghiệm.

8.5. Sự ức chế bổ trợ-sự tiêu thể mỡ hoạt tính bởi các MAb kháng C5

Các MAb kháng C5 được thử nghiệm đối với sự ức chế hoạt tính bổ trợ bởi thử nghiệm tiêu thể mỡ. Ba mươi microlit huyết thanh người bình thường (6,7%) (Biopredic, SER019) được trộn với 20 microlit của Mab được pha loãng trong đĩa 96-giếng và được ủ trên máy lắc trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch thể mỡ làm cho nhạy cảm với các kháng thể chống lại dinitrophenyl (Kit tự động CH50, Wako, 995-40801) được đưa vào mỗi giếng và được đặt lên máy lắc trong 2 phút ở 25 độ C. Năm mươi microlit dung dịch chất nền (Kit tự động CH50) được bổ sung vào mỗi giếng và được trộn bằng cách lắc trong 2 phút ở 25 độ C. Hỗn hợp cuối cùng được ủ ở 37 độ C trong 45 phút, và sau đó OD ở 340 nm được xác định. Phần trăm ước chế của sự tiêu thể mỡ được xác định như 100 x [(OD $_{MAb}$ - OD $_{huyết\ thanh\ và\ nền\ thể\ mỡ}$)]/ [(OD $_{không\ có\ MAb}$ - OD $_{huyết\ thanh\ và\ nền\ thể\ mỡ}$)]. Fig. 21 chỉ ra rằng các MAb kháng C5, BNJ441 và biến thể 305 ức chế sự tiêu thể mỡ, và biến thể 305 có hoạt tính ức chế mạnh hơn so với BNJ441.

Ví dụ 9

Phân tích cấu trúc tinh thể X-ray của biến thể 305 Fab và phức hợp miền C5-MG1 ở người

9.1. Việc biểu hiện và tinh chế miền MG1 (20-124) của C5 ở người

Miền MG1 (các gốc axit amin 20-124 của SEQ ID NO:39) được nối với nhãn GST qua chất liên kết có thể phân tách trombin (GST-MG1) được biểu hiện trong *E. coli* căng BL21 DE3 pLysS (Promega) sử dụng vectơ pGEX-4T-1 (GE healthcare). Việc biểu hiện protein được kích thích bằng 0,1 mM Isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) ở 25 độ C trong 5 giờ. Việc thuốc tế bào vi khuẩn được dung giải với Bugbuster (Merck) được bổ sung với lysonaza (Merck) và cocktail ức chế proteaza hoàn toàn (Roche), sau đó tinh chế GST-MG1 từ phần hòa tan sử dụng cột GSTrap (GE healthcare) theo chỉ định của nhà sản xuất. Nhãn GST được chia tách với trombin (Sigma), và miền MG1 thu được còn được tinh chế với cột lọc gel Superdex 75 (GE healthcare). Các phân tử chứa miền MG1 được tổng hợp và bảo quản ở -80 độ C.

9.2. Điều chế đoạn Fab của biến thể 305

Các đoạn Fab của mộ trong những biến thể tối ưu hóa từ 305 được điều chế bằng cách phương pháp thông thường sử dụng khả năng tiêu hóa có giới hạn với papain (Roche Diagnostics, Cat No,1047825), sau đó được tải lên cột protein A (MabSlect SuRe, GE Healthcare) để loại bỏ các đoạn Fc, cột trao đổi cation (HiTrap SP HP, GE Healthcare), và cột lọc gel (Superdex200 16/60, GE Healthcare). Các phân tử chứa đoạn Fab được tổng hợp và bảo quản ở -80 độ C.

9.3. Điều chế biến thể 305 Fab và phức hợp miền C5-MG1 ở người

Miền tái tổ hợp tinh khiết C5-MG1 ở người được trộn với đoạn Fab thể biến tinh khiết 305a với tỷ lệ mol 1:1. Phức hợp được tinh chế bằng phép sắc ký lọc gel (Superdex200 10/300 tăng, GE Healthcare) sử dụng cột được cân bằng với 25 mM HEPES pH=7,5, 100 mM NaCl.

9.4. Sự kết tinh

Các phức hợp tinh khiết được cô đặc đến khoảng 10 mg/mL, và việc kết tinh được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán hơi nước từng giọt với sự kết hợp với phương pháp tạo hạt ở 4 độ C. Dung dịch hồ chứa bao gồm 0,2 M magie format dehydrat, 15,0% w/v polyetylen glycol 3350. Điều này đã thành công trong việc tạo ra tinh thể giống như đĩa trong vài ngày. Tinh thể được ngâm trong dung dịch 0,2 M magie format dehydrat, 25,0% w/v polyetylen glycol 3350, và 20% glxcerol.

9.5. Thu thập dữ liệu và xác định cấu trúc

Dữ liệu nhiễu xạ X-ray được đo bằng BL32XU tại SPring-8. Trong suốt quá trình đo, tinh thể luôn luôn được đặc trong dòng nitơ ở -178 độ C để duy trì trạng thái đông lạnh, và tổng cộng 180 hình nhiễu xạ X-ray được thu gom sử dụng thiết bị dò MX-225HS CCD (RAYONIX) được gắn với dòng bức xạ, trong khi xoay tinh thể 1,0 độ tại một thời điểm. Việc xác định các tham số tế bào, liệt kê các điểm nhiễu xạ, và xử lý dữ liệu nhiễu xạ thu được từ các hình nhiễu xạ được thực hiện sử dụng chương trình Xia2 (J. Appl. Cryst. 43:186-190 (2010), gói XDS (Acta. Cryst. D66:125-132 (2010)), và Scala (Acta. Cryst. D62:72-82 (2006)), và cuối cùng thu được dữ liệu cường độ nhiễu xạ lên đến

2,11 độ phân giải angstrom. Các số liệu dữ liệu tinh thể học được chỉ ra trong bảng 11.

Bảng 11

Thống kê dữ liệu tia X và thống kê tinh chế

Thống kê dữ liệu	
Nhóm trống	P1
Tế bào đơn vị	
a,b,c (Å)	39,79, 55,10, 127,76
α, β,γ (°)	89,18, 86,24, 78,20
Phân giải (Å)	49,49-2,11
Tổng phản xạ	112,102
Phản xạ duy nhất	56,154
Sự hoàn chỉnh (độ phân giải cao nhất) (%)	92,1 (95,8)
R_{merge} [a] (độ phân giải cao nhất) (%)	7,2 (31,7)
Tinh chế	
Phân giải (Å)	25,00-2,11
Phản xạ	53,398
R thừa số [b] ($R_{tự\ do}$ [C]) (%)	20,42 (26,44)
Sai lệch rms theo lý thuyết	
Độ dài liên kết (Å)	0,0088
Góc liên kết (°)	1,3441

a; $R_{merge} = \sum hkl \sum j |Ij\ (hkl) - <I\ (hkl)>| \sum hkl \sum j |Ij\ (hkl)|$, khi *Ij (hkl)* và *<I (hkl)>* là cường độ đo lường *j* và cường độ phản xạ trung bình với chỉ số *hkl*, tương ứng.

b; *R* thừa số= $\sum hkl |F_{calc}(hkl)| - |F_{obs}(hkl)| / \sum hkl ||F_{obs}(hkl)|$, khi F_{obs} và F_{calc} được quan sát và tính toán biên độ của thừa số cấu trúc, tương ứng.

c; $R_{tự\ do}$ được tính toán với 5% phản xạ dành riêng ngẫu nhiên

Cấu trúc được xác định bằng cách thay thế phân tử với chương trình Phaser (J. Appl. Cryst. 40:658-674 (2007)). Mẫu tìm kiếm của miền Fab có nguồn gốc từ cấu trúc tinh thể IgG4 Fab ở người đã được công bố (PDB code:1BBJ), và mẫu tìm kiếm của miền MG1 có nguồn gốc từ cấu trúc tinh thể C5 ở người đã

được công bố (PDB code: 3CU7, Nat.Immunol. 9:753-760 (2008)). Mẫu được xây dựng bằng chương trình Coot (Acta Cryst. D66:486-501 (2010)) và được tính chế với chương trình Refmac5 (Acta Cryst. D67:355-367 (2011)). Hệ số độ tin cậy tinh thể học (R) đối với dữ liệu cường độ nhiễu xạ từ 25-2,11 angstrom là 20,42%, với giá trị R miễn phí là 26,44%. Các số liệu tinh chế cấu trúc được chỉ ra trong bảng 11.

9.6. Cấu trúc tổng thể của biến thể 305 Fab và phức hợp miền C5-MG1

Đoạn Fab của biến thể được tối ưu hóa từ 305 ("305 Fab") được gắn với miền C5-MG1 ở người ("MG1") với tỷ lệ 1:1, và đơn vị không đối xứng của cấu trúc tinh thể chứa hai phức hợp, các phân tử 1 và 2, như được mô tả trongg Fig. 22A. Phân tửs 1 và 2 có thể được sắp hàng tốt hở 0,717 angstrom RMSD với vị trí nguyên tử C-alpha trong tất cả các gốc, như được chỉ ra trong Fig. 22B. Các hình được đưa ra dưới đây được điều chế sử dụng phân tử 1.

Trong các Fig. 23A và 23B, epitop của vùng tiếp xúc 305 Fab được tạo bản đồ trong trình tự axit amin MG1 và trong cấu trúc tinh thể, tương ứng. Epitop bao gồm các gốc axit amin của MG1 mà bao gồm một hoặc nhiều nguyên tử được đặt vị trí ở khoảng cách 4,5 angstrom từ bất kỳ phần nào của 305 Fab trong cấu trúc tinh thể. Ngoài ra, epitop ở 3,0 angstrom được đánh dấu trong Fig. 23A.

9.7. Các sự tương tác của E48, D51, và K109

Như mô tả trong các ví dụ 4,5 và 4,6, các MAb kháng C5 mà bao gồm các chuỗi kháng thể 305 được thử nghiệm đối với việc gắn kết với ba ột biến điểm C5 ở người, E48A, D51A, và K109A, bởi các sự phân tích gắn kết thẩm tách Western và BIACORE (nhãn được đã đăng ký). Trong khi các biến thể 305 gắn kết một cách mạnh mẽ với WT C5, các biến thể này chỉ gắn kết yếu tới đột biến E48A C5 và không gắn kết với các đột biến D51A và K109A. Cấu trúc tinh thể của 305 Fab và phức hợp MG1 cho thấy rằng ba axit amin E48, D51, và K109, đều nằm trong khoảng 3,0 angstrom từ 305 Fab, tạo thành một số liên kết hydro với Fab, như được chỉ ra trong Fig. 24A. Ở phương án khác, gốc K109 của MG1 được chôn trong rãnh được hình thành tại giao diện của chuỗi nặng của Fab và

tương tác chặt chẽ với Fab bởi ba liên kết hydro với H-CDR3_G97, H-CDR3_Y100, và H-CDR3_T100b, và bởi cầu muối với H-CDR3_D95 (Fig. 24D). D51 được đặt vị trí giữa MG1 và chuỗi nặng của 305 Fab và tạo hai liên kết hydro với H-CDR1_Ser32 và H-CDR2_Ser54 để lấp đầy không gian (Fig. 24C). Điều này cho thấy rằng K109 và D51 của C5 đều là gốc quan trọng để gắn kết các chuỗi kháng thể 305. Mặt khác, E48 được đặt vị trí gần hơn với bề mặt và tạo chỉ một liên kết hydro với Fab, cho thấy rằng sự đóng góp của nó tới việc gắn kết kháng thể sẽ thấp hơn so với K109 và E51 (Fig. 24B). Các mối quan hệ này phù hợp với các kết quả của các sự phân tích gắn kết thẩm tách Western và BIACORE (nhãn được đã đăng ký) của các đột biến C5 ở người (các ví dụ 4,5 và 4,6). Lưu ý hơn nữa là: số lượng gốc đối với các axit amin Fab dựa trên sơ đồ số Kabat. (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)

9.8. Các sự tương tác của H70, H72, và H110 của các chuỗi kháng thể C5 và 305 ở người

Sự phân tích cấu trúc tinh thể cho thấy rằng ba gốc histidin trên C5 ở người, cụ thể là, H70, H72, và H110, được bao gồm trong epitop của Fab biến thể 305, như được chỉ ra trong Fig. 23A và Fig. 25A. Phân tích gắn kết BIACORE (nhãn được đã đăng ký) được thực hiện để khảo sát sự đóng góp của các gốc histidin tới sự tương tác protein-protein phụ thuộc vào pH giữa C5 ở người và Fab biến thể 305 sử dụng các đột biến ở người C5 H70Y, H72Y, H110Y, và H70Y+H110Y (ví dụ 4,7). H72Y dẫn đến sự mất hoàn toàn việc gắn kết của Fab biến thể 305 tới C5. Gốc của C5 được đặt vị trí trong túi được hình thành bởi vòng lặp CDR2 của chuỗi nặng của 305 Fab và vòng lặp của MG1 (L73, S74, và E76) và làm đầy khoảng trống này, như được chỉ ra trong Fig. 25C. Ngoài ra, gốc H72 của C5 tạo một liên kết hydro với H-CDR2_Y58. Đột biến H72Y sẽ không được dung nạp vì không có đủ không gian để chứa vùng bên to lớn của tyrosin. Ngoài ra không được duy trì một liên kết hydro với H-CDR2_Y58. Liên quan đến sự đóng góp của H70 và H110 tới sự phụ thuộc pH, các đột biến H70Y

và H110Y dẫn đến sự phân ly chậm hơn của Fab biến thể 305 từ C5 ở pH=5,8. H70 tạo một liên kết hydro nội phân tử với T53 của MG1, được cho là bị phá vỡ ở ở pH=5,8 khi sự proton hóa của H70 của C5 gây ra sự thay đổi đối xứng trong một phần tương ứng của giao diện tương tác của MG1 (Fig. 25B). Đối với H110, sự proton hóa của gốc C5 này sẽ gây ra lực đẩy tích diện tới 305 Fab, có thể được tăng âm bởi sự proton hóa của gốc histidin lân cận, H-CDR3_H100c (Fig. 25D).

Mặc dù sáng chế đã từng được mô tả trên đây ở một vài chi tiết bằng cách mô tả và ví dụ nhằm mục đích làm rõ việc lý giải thông tin nhận được, các nội dung mô tả và các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi theo sáng chế. Sự bộc lộ tất cả các patent và tài liệu khoa học được dẫn chứng ở đây được thể hiện bằng cách viện dẫn toàn bộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập gắn kết với C5, trong đó kháng thể này gắn kết với epitop trong đoạn bao gồm các axit amin 33-124 của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5 có ái lực ở pH=7,4 cao hơn ái lực ở pH=5,8, và trong đó epitop bao gồm ít nhất một đoạn được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin 47-57, 70-76, và 107-110.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này gắn kết với epitop trong đoạn của chuỗi beta (SEQ ID NO: 40) của C5 bao gồm ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 và His110.

3. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này ức chế sự hoạt hóa của C5.

4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này ức chế sự hoạt hóa của R885H biến thể C5.

5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể này là kháng thể người, được làm tương thích với người hoặc dạng khảm.

6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể này là đoạn kháng thể gắn với C5.

7. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể này là kháng thể IgG1 hoặc IgG4 có chiều dài đầy đủ.

8. Dược phẩm bao gồm kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 và chất mang dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Kháng thể được phân lập gắn kết với C5 và dược phẩm chứa kháng thể này
<130> C1-A1412P

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

<160> 150

<170> Phiên bản sáng chế 3.5

<210> 1
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 45

Ser Ser Tyr Tyr Met Cys
1 5

<210> 46
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 46

Asn Phe Tyr Tyr Ile Cys
1 5

<210> 47
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 47

Ser Ser Tyr Tyr Met Cys
1 5

<210> 48
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 48

Ser Ser Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 49

Ser Ser Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 50

Asp Asn Thr Met Thr
1 5

<210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 51

Thr Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 52

Gly Asn Ala Ile Asn
1 5

<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 53

Thr Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 54

Ser Ser Tyr Tyr Val Ala
1 5

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 66

Asp Leu His Ala Gly Ile Thr Asn Leu
1 5

<210> 67
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 68

Gln Ile Tyr Ser Gly Asp Asn Asn Asp Asn Phe
1 5 10

<210> 69
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 69

Gln Ile Tyr Ser Gly Asp Asn Asn Asp Asn Phe
1 5 10

<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 70

Val Gly Ala Gly Asn Ile Phe Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 71

Asn Asp Gly Ser Val Tyr Asn Leu Phe Asn Leu
1 5 10

<210> 72
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 72

Gly Ser Gly Leu
1

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 73

Asn Asp Gly Ser Val Tyr Asn Leu Phe Asn Leu
1 5 10

<210> 74
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 75

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Gly Ser Asp Leu Ala
1 5 10

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 76

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 77
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 78

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 79
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 79

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 80
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 80

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 81

Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Ala Leu Ser
1 5 10

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 82

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Leu Leu Ala
1 5 10

<210> 83
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 83

Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Ala Leu Ser
1 5 10

<210> 84
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 84

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Gly Ser Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 85

Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 86

Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 87

Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 88
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 88

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 89

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 90

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 91

Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 92

His Thr Ser Asp Leu Ala Ser
1 5

<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 93

Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 94

Gly Ala Ser Lys Thr His Ser
1 5

<210> 95
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 95

Gln Cys Thr Phe Val Gly Ser Ser Tyr Gly Asn Ala
1 5 10

<210> 96
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 96

Leu Gln Gly Tyr Ser Tyr Ser Asn Val Asp Asp Ala
1 5 10

<210> 97
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 97

Gln Gly Thr Tyr Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Phe Ala
1 5 10

<210> 98
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 98

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Ser Asn Val Asp Asn Thr
1 5 10

<210> 99
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 99

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Ser Asn Val Asp Asn Thr
1 5 10

<210> 100
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 100

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Thr Asn Val His Asn Ser
1 5 10

<210> 101
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 101

Gln Gln Tyr Tyr Asp Ile Asn Ser Val Asp Asn Thr
1 5 10

<210> 102
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 103

Gln Gln Tyr Tyr Asp Ile Asn Ser Val Asp Asn Thr
1 5 10

<210> 104
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 117

Ser Ser Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 118
<211> 17
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 122

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 123

Gly Ala Ser Glu Thr Glu Ser
1 5

<210> 124
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 124

Gly Ala Ser Thr Thr Gln Ser
1 5

<210> 125
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 125

Gln Asn Thr Lys Val Gly Ser Ser Tyr Gly Asn Thr
1 5 10

<210> 126
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa là Met hoặc Val

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa là Cys hoặc Ala

<400> 126

Ser Ser Tyr Tyr Xaa Xaa
1 5

<210> 127
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa là Cys, Ala hoặc Gly

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa là Tyr hoặc Phe

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa là Thr, Asp hoặc Glu

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa là Tyr, Lys hoặc Gln

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Xaa là Ser, Asp hoặc Glu

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> Xaa là Ala hoặc 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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa là Gly hoặc Ala

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa là Val, Gln hoặc Asp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa là Thr hoặc Tyr

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Xaa là Tyr hoặc His

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Xaa là Leu hoặc 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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa là Gln hoặc Arg

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)

<223> Xaa là Asn, Gln hoặc Gly

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa là Gly hoặc Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa là Asp, Lys hoặc Ser

<400> 129

Xaa Ala Ser Gln Xaa Ile Xaa Ser Xaa Leu Ala
1 5 10

<210> 130
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa là Lys, Glu hoặc Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa là Leu hoặc Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa là Ala, His, Glu hoặc Gln

<400> 130

Gly Ala Ser Xaa Xaa Xaa Ser
1 5

<210> 131
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa là Ser, Cys, Asn hoặc Thr

<220>

<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa là Phe hoặc Lys

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Xaa là Ala, Thr hoặc 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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 140

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 141
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 141

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 142
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 148

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 149
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<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

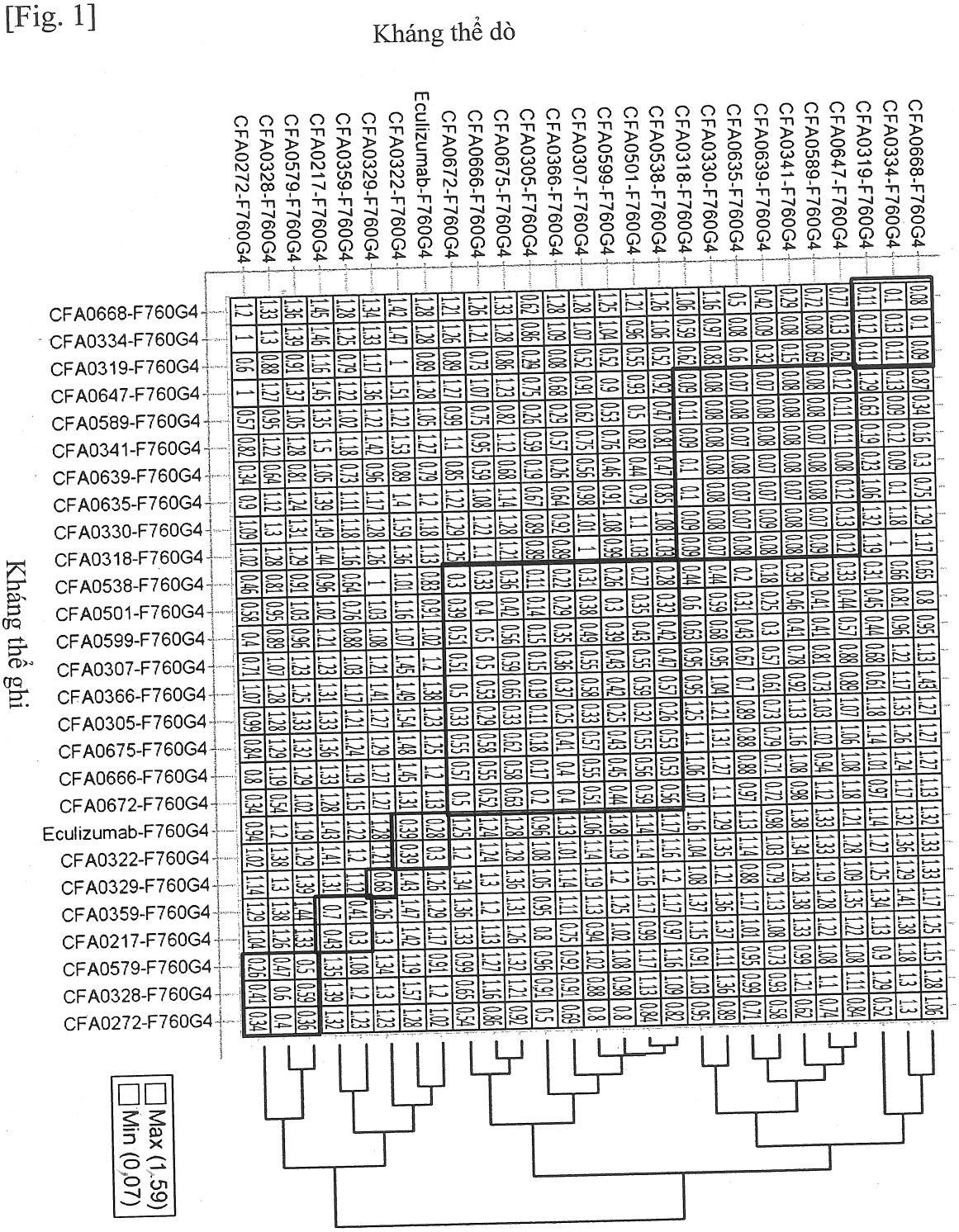
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

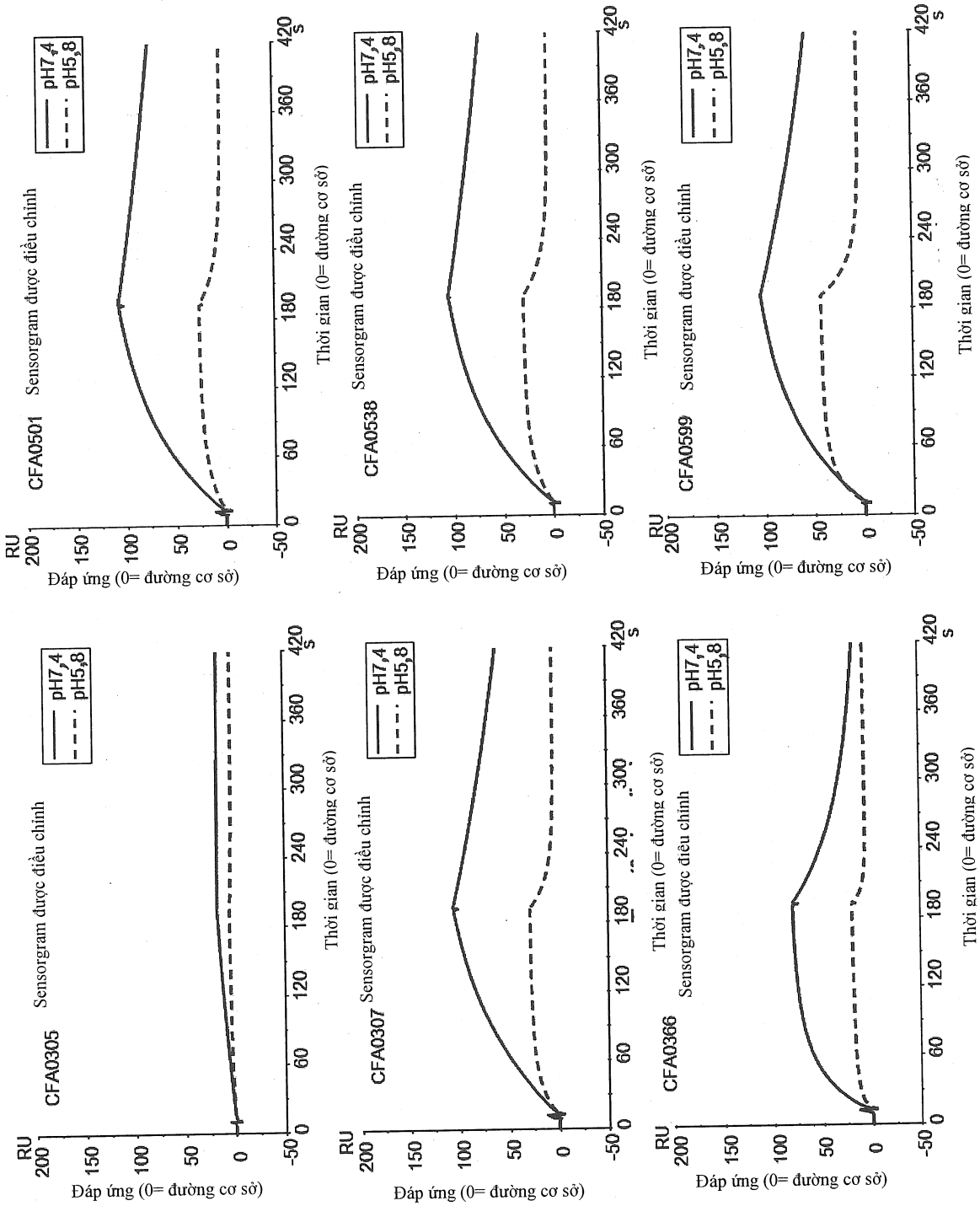
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

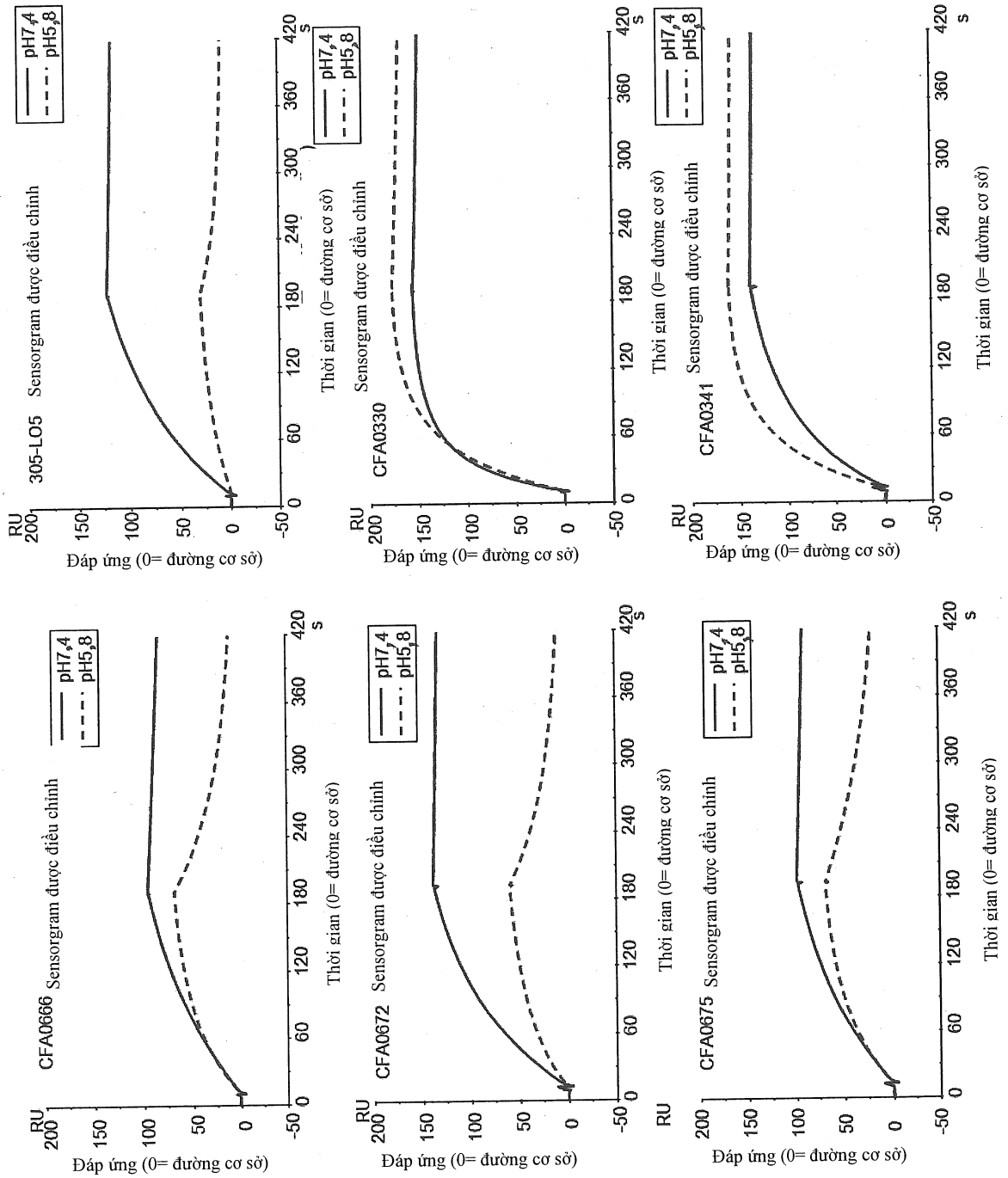
[Fig. 1]


Kháng thể dò
Kháng thể ghi
CFA0668-F760G4
CFA0334-F760G4
CFA0319-F760G4
CFA0647-F760G4
CFA0589-F760G4
CFA0341-F760G4
CFA0639-F760G4
CFA0635-F760G4
CFA0330-F760G4
CFA0318-F760G4
CFA0538-F760G4
CFA0501-F760G4
CFA0599-F760G4
CFA0307-F760G4
CFA0366-F760G4
CFA0305-F760G4
CFA0675-F760G4
CFA0666-F760G4
CFA0672-F760G4
Eculizumab-F760G4
CFA0322-F760G4
CFA0329-F760G4
CFA0359-F760G4
CFA0217-F760G4
CFA0579-F760G4
CFA0328-F760G4
CFA0272-F760G4
Max (1.59)
Min (0.07)

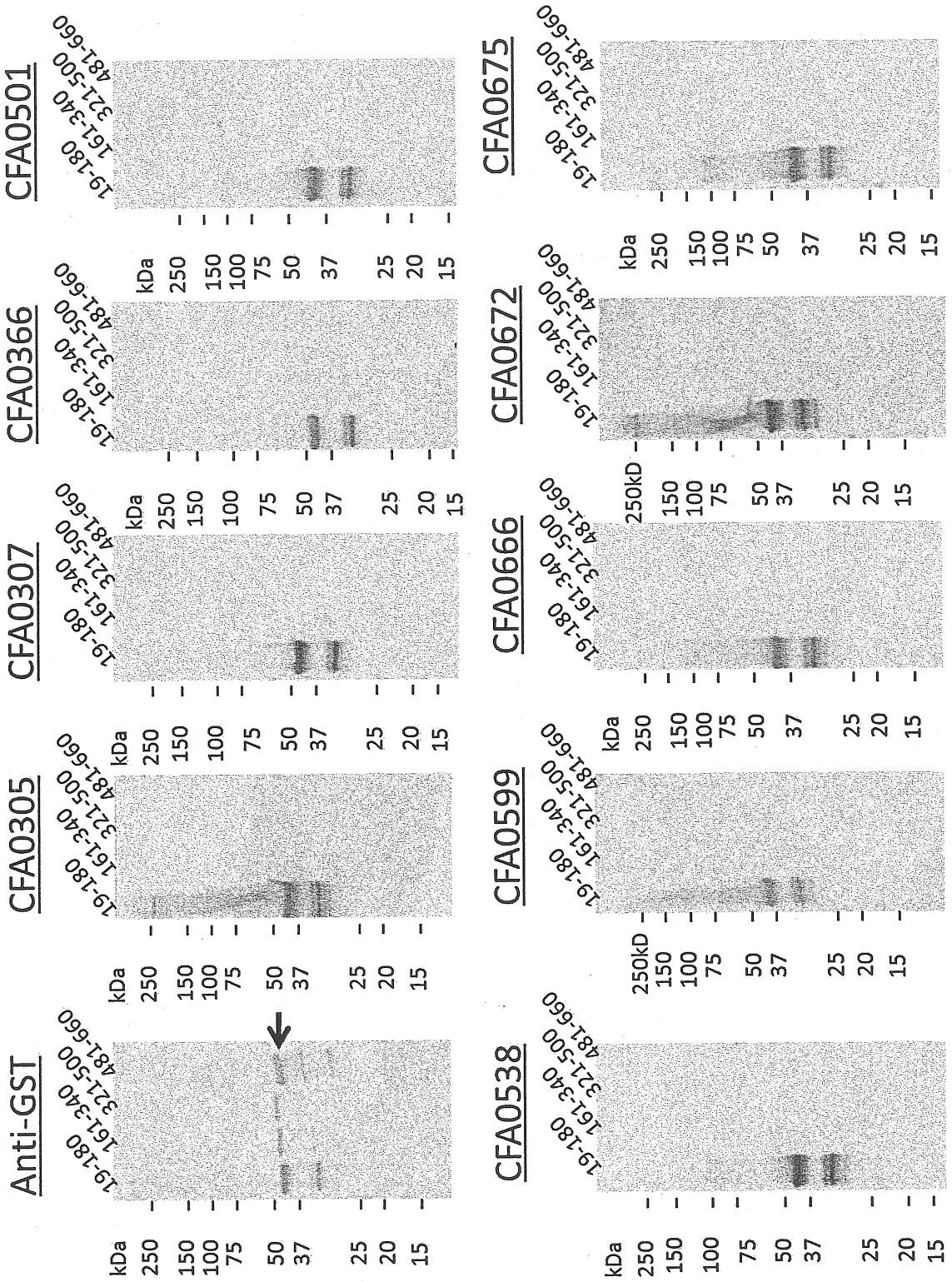
[Fig. 2A]


CFA0305
CFA0307
CFA0366
CFA0501
CFA0538
CFA0599
Sensorgram được điều chỉnh
pH7,4
pH5,8
RU
200
150
100
50
0
-50
0
60
120
180
240
300
360
420
s
Thời gian (0= đường cơ sở)
Đáp ứng (0= đường cơ sở)

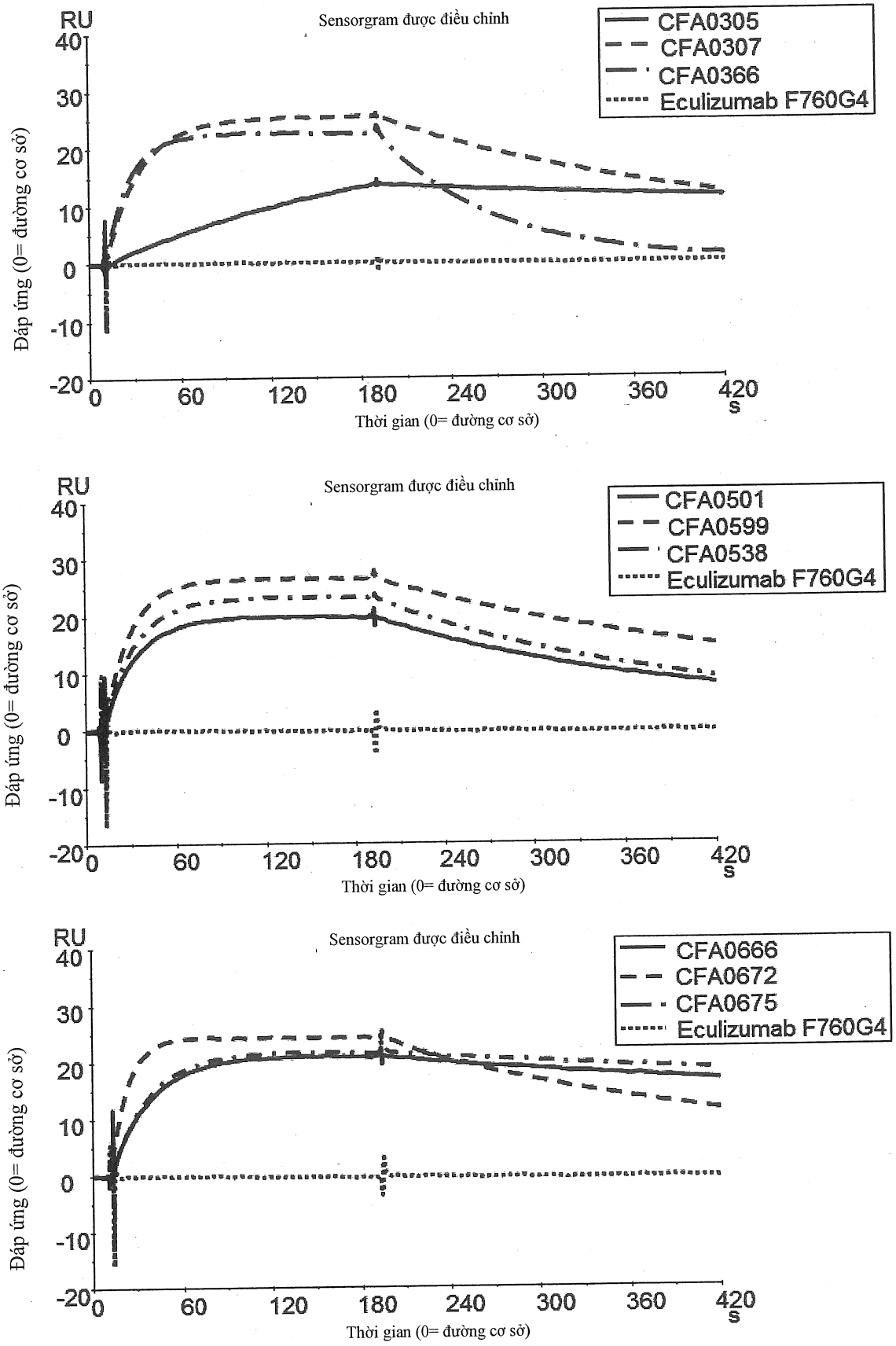
[Fig. 2B]


305-LO5
CFA0330
CFA0341
CFA0666
CFA0672
CFA0675
Sensorgram được điều chỉnh
pH7,4
pH5,8
RU
Đáp ứng (0= đường cơ sở)
Thời gian (0= đường cơ sở)
s

[Fig. 3]

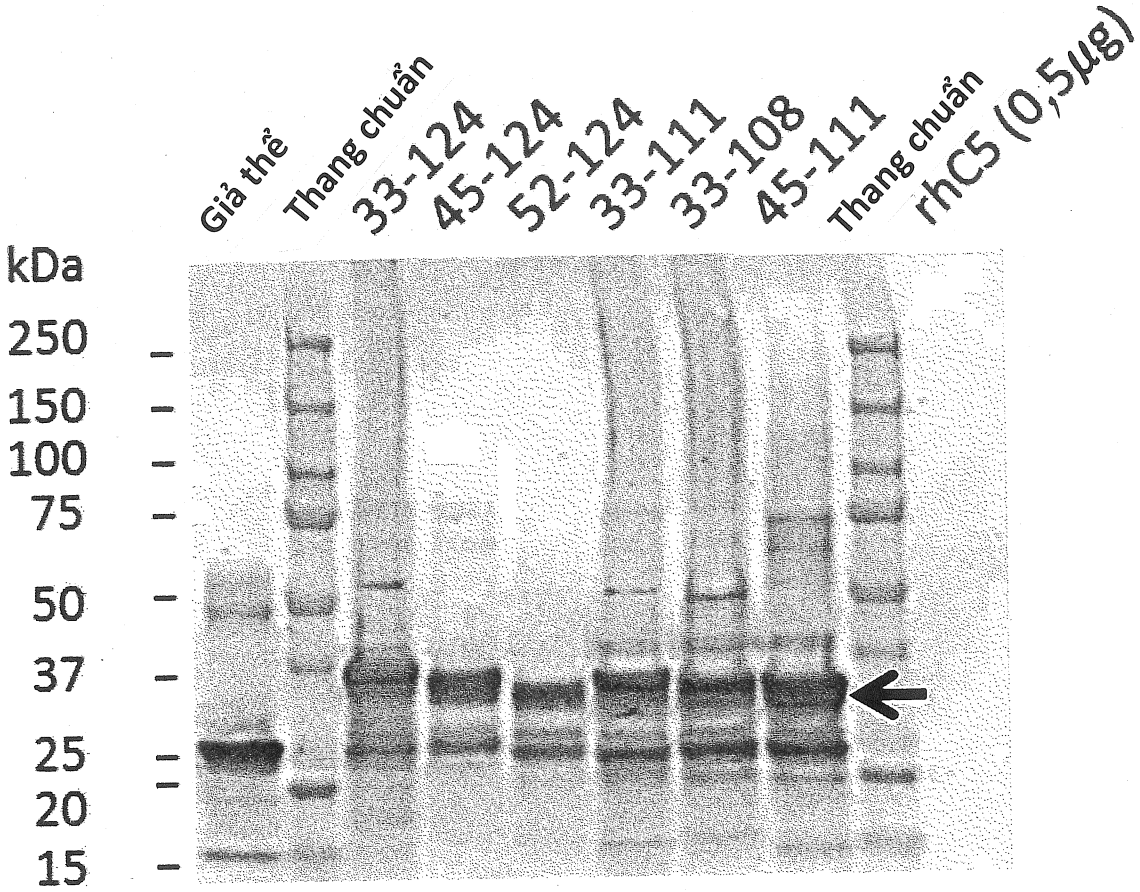

Anti-GST
CFA0305
CFA0307
CFA0366
CFA0501
CFA0538
CFA0599
CFA0666
CFA0672
CFA0675
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
250kD
19-180
161-340
321-500
481-660

[Fig. 4]

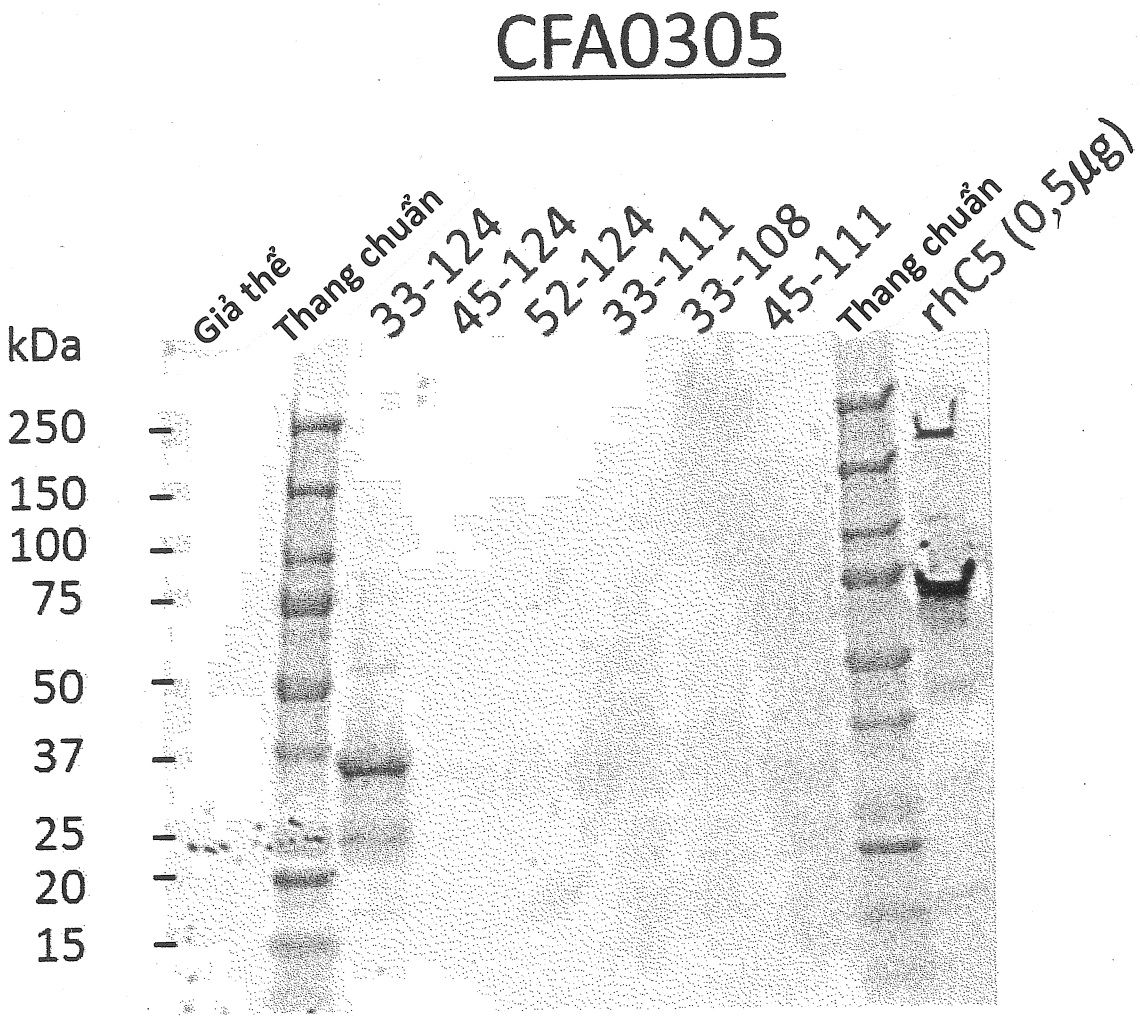

Sensorgram được điều chỉnh
RU
40
30
20
10
0
-10
-20
Đáp ứng (0= đường cơ sở)
0
60
120
180
240
300
360
420
s
Thời gian (0= đường cơ sở)
CFA0305
CFA0307
CFA0366
Eculizumab F760G4
Sensorgram được điều chỉnh
CFA0501
CFA0599
CFA0538
Eculizumab F760G4
Sensorgram được điều chỉnh
CFA0666
CFA0672
CFA0675
Eculizumab F760G4

[Fig. 5A]

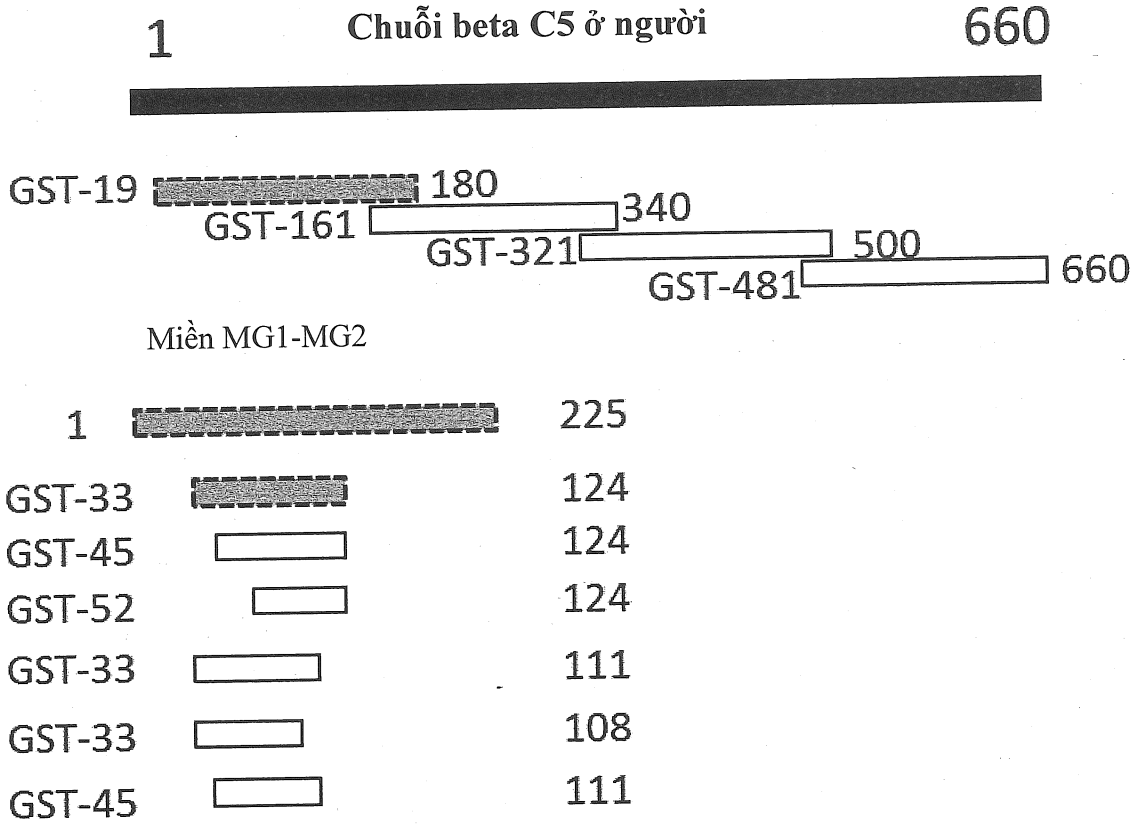
Kháng GST



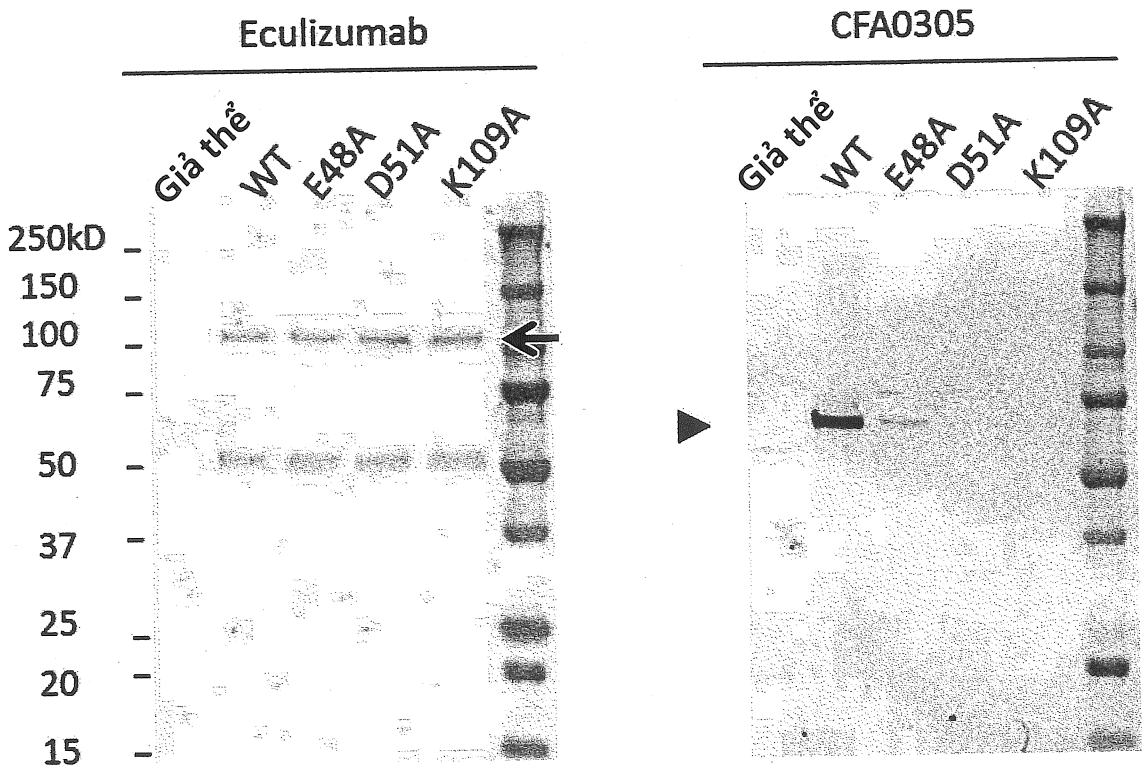
[Fig. 5B]


CFA0305
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
Giả thể
Thang chuẩn
33-124
45-124
52-124
33-111
33-108
45-111
Thang chuẩn
rhC5 (0,5μg)

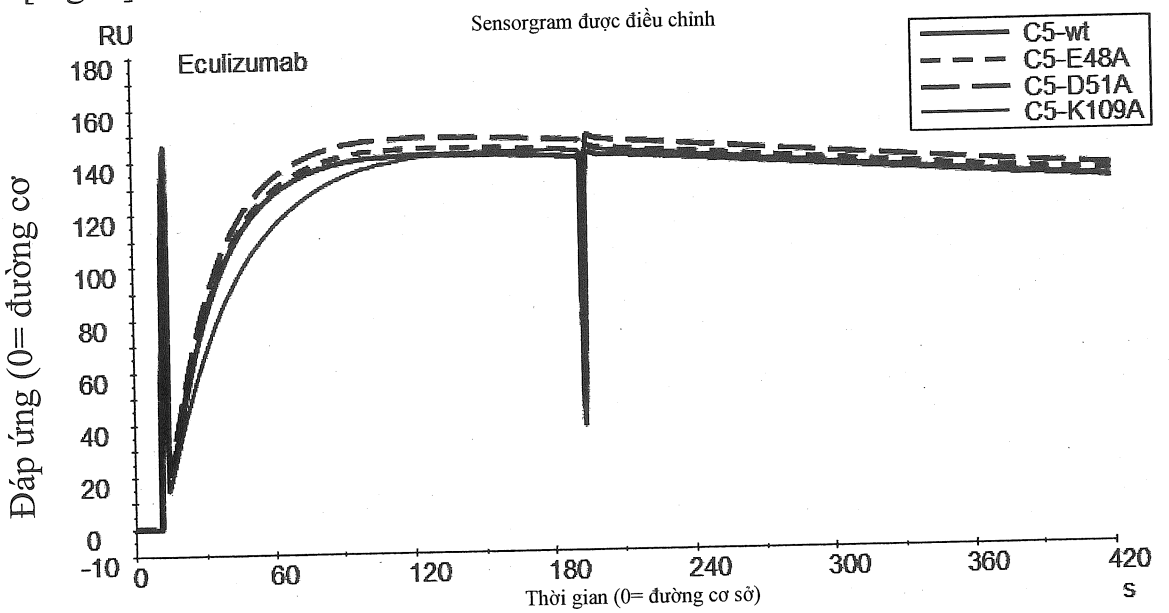
[Fig. 5C]

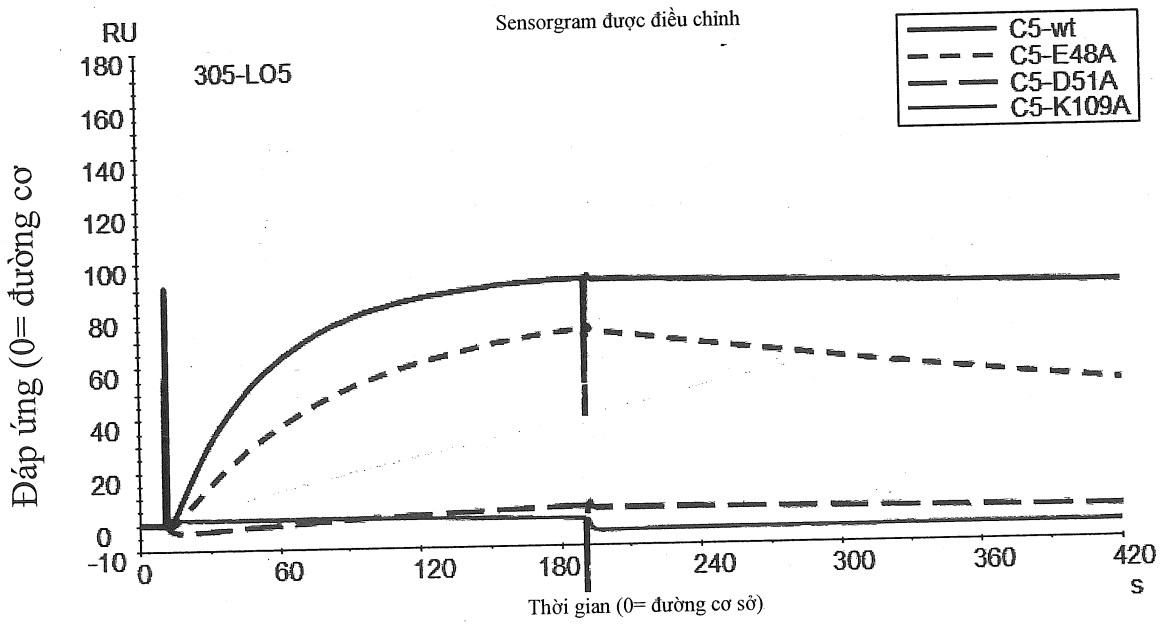

1
Chuỗi beta C5 ở người
660
GST-19
180
GST-161
340
GST-321
500
GST-481
660
Miền MG1-MG2
1
225
GST-33
124
GST-45
124
GST-52
124
GST-33
111
GST-33
108
GST-45
111

[Fig. 6]

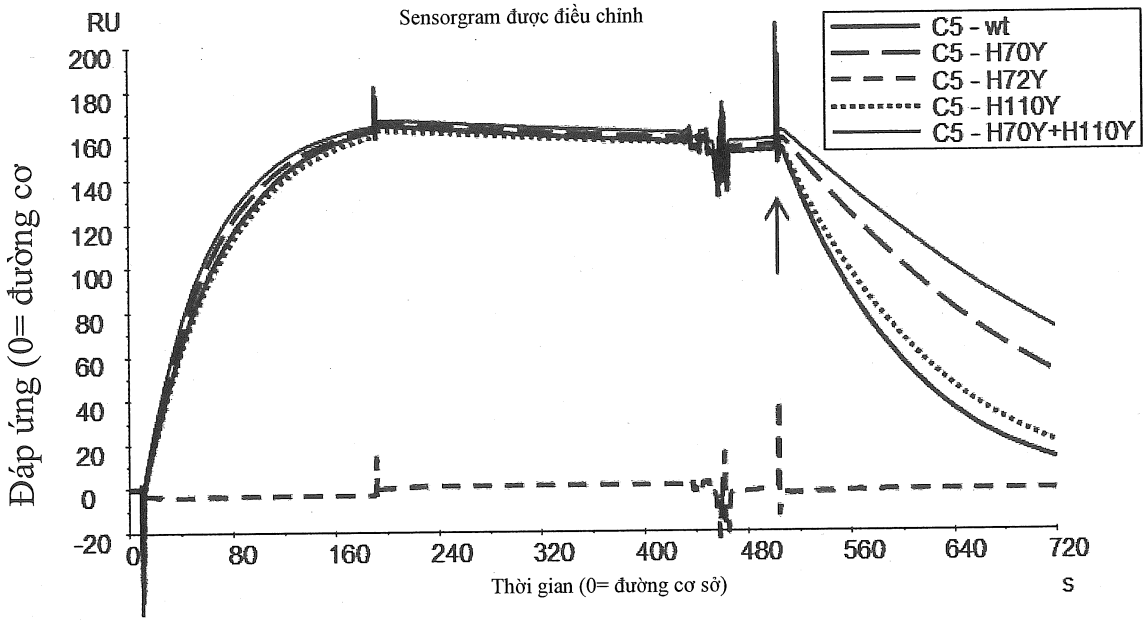

Eculizumab
CFA0305
Giả thể
WT
E48A
D51A
K109A
Giả thể
WT
E48A
D51A
K109A
250kD
150
100
75
50
37
25
20
15

[Fig. 7]

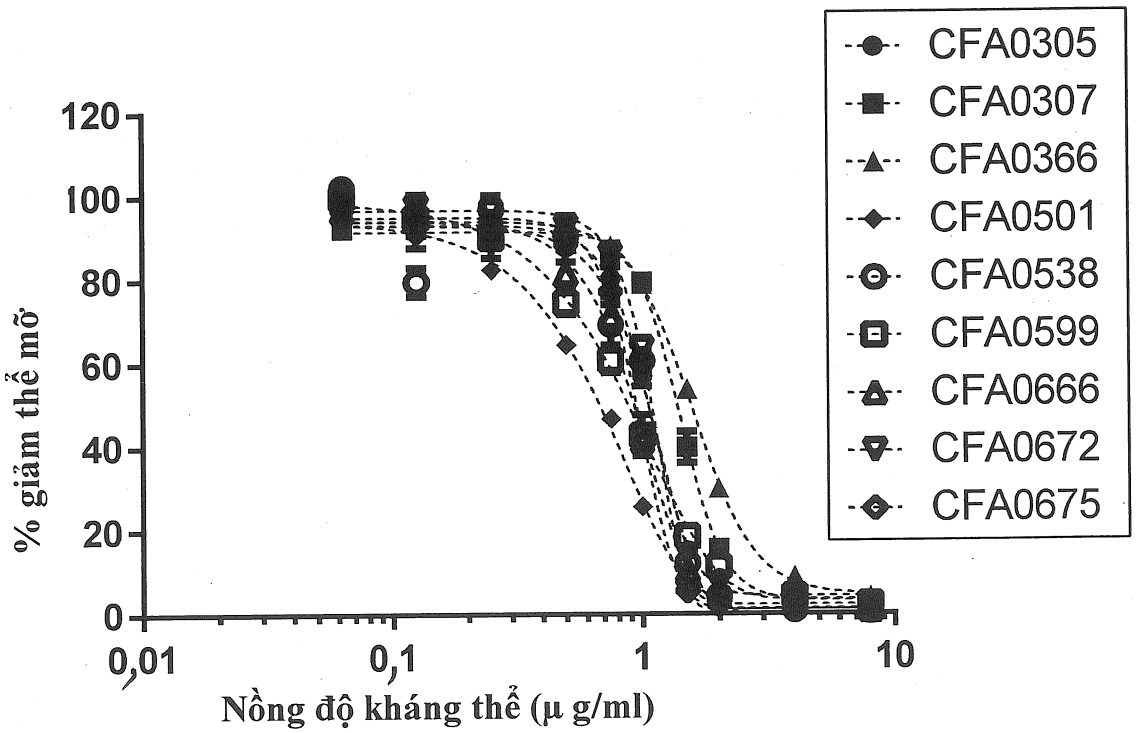

Sensorgram được điều chỉnh
RU
Eculizumab
C5-wt
C5-E48A
C5-D51A
C5-K109A
Đáp ứng (0= đường cơ
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-10
0
60
120
180
240
300
360
420
s
Thời gian (0= đường cơ sở)


Sensorgram được điều chỉnh
RU
305-LO5
C5-wt
C5-E48A
C5-D51A
C5-K109A
Đáp ứng (0= đường cơ
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-10
0
60
120
180
240
300
360
420
s
Thời gian (0= đường cơ sở)

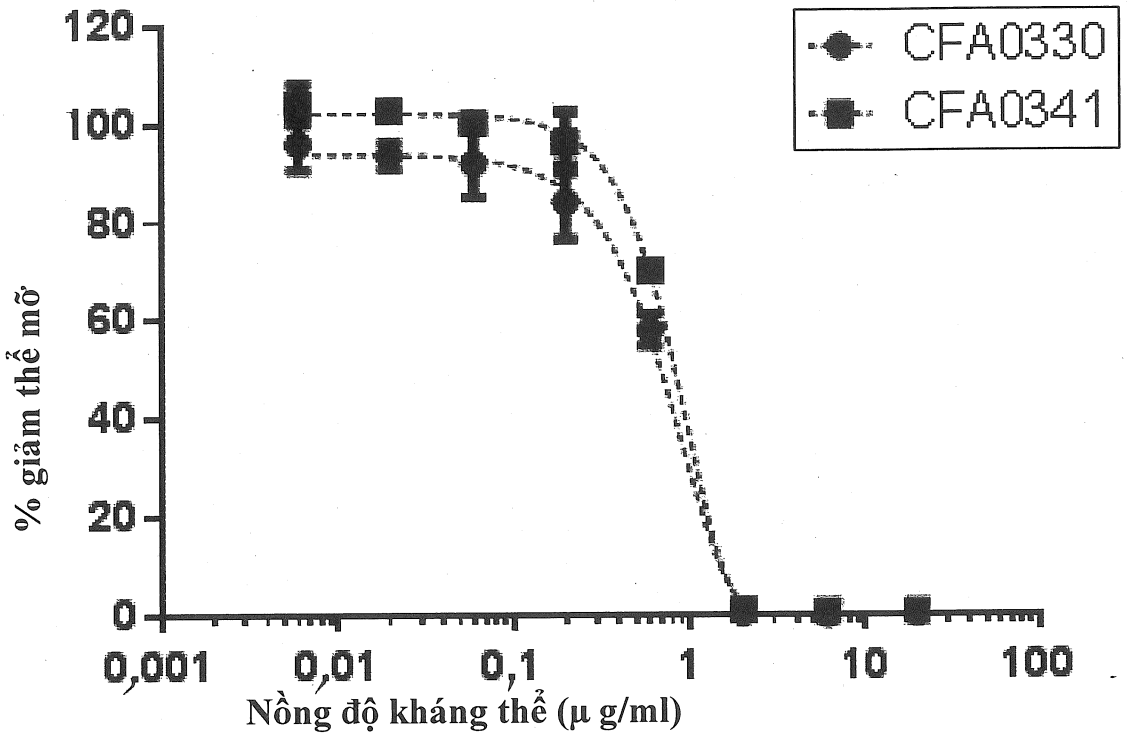
[Fig. 8]


Sensorgram được điều chỉnh
RU
Đáp ứng (0= đường cơ
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0
80
160
240
320
400
480
560
640
720
Thời gian (0= đường cơ sở)
s
C5 - wt
C5 - H70Y
C5 - H72Y
C5 - H110Y
C5 - H70Y+H110Y

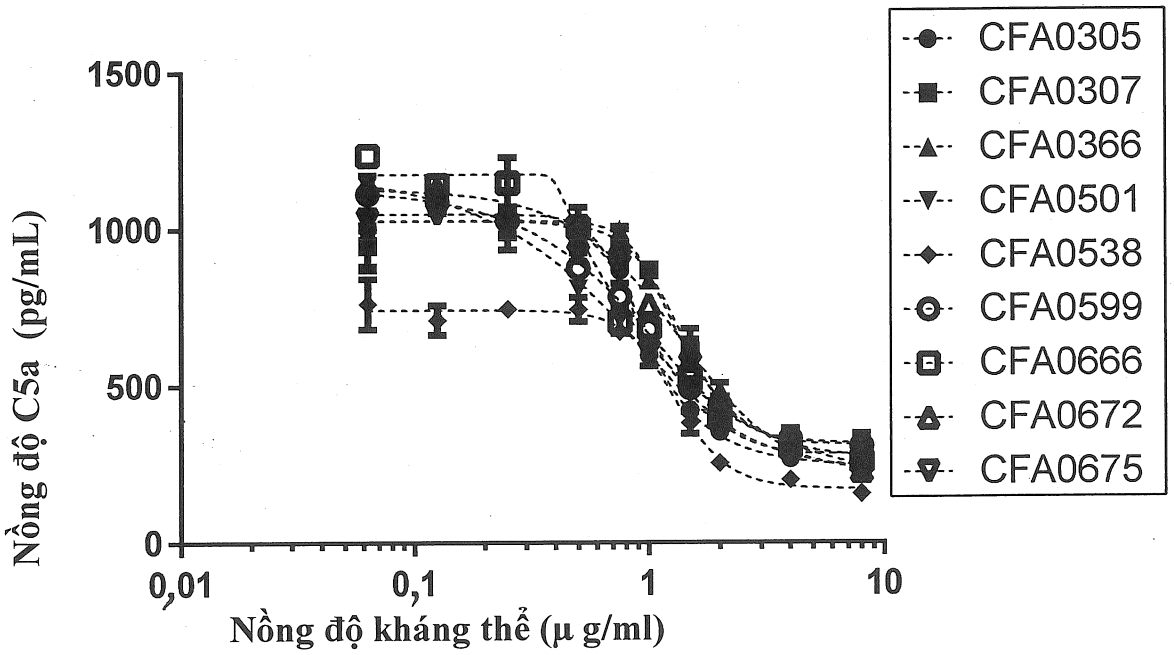
[Fig. 9A]


% giảm thể mỡ
120
100
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
Nồng độ kháng thể (μ g/ml)
CFA0305
CFA0307
CFA0366
CFA0501
CFA0538
CFA0599
CFA0666
CFA0672
CFA0675

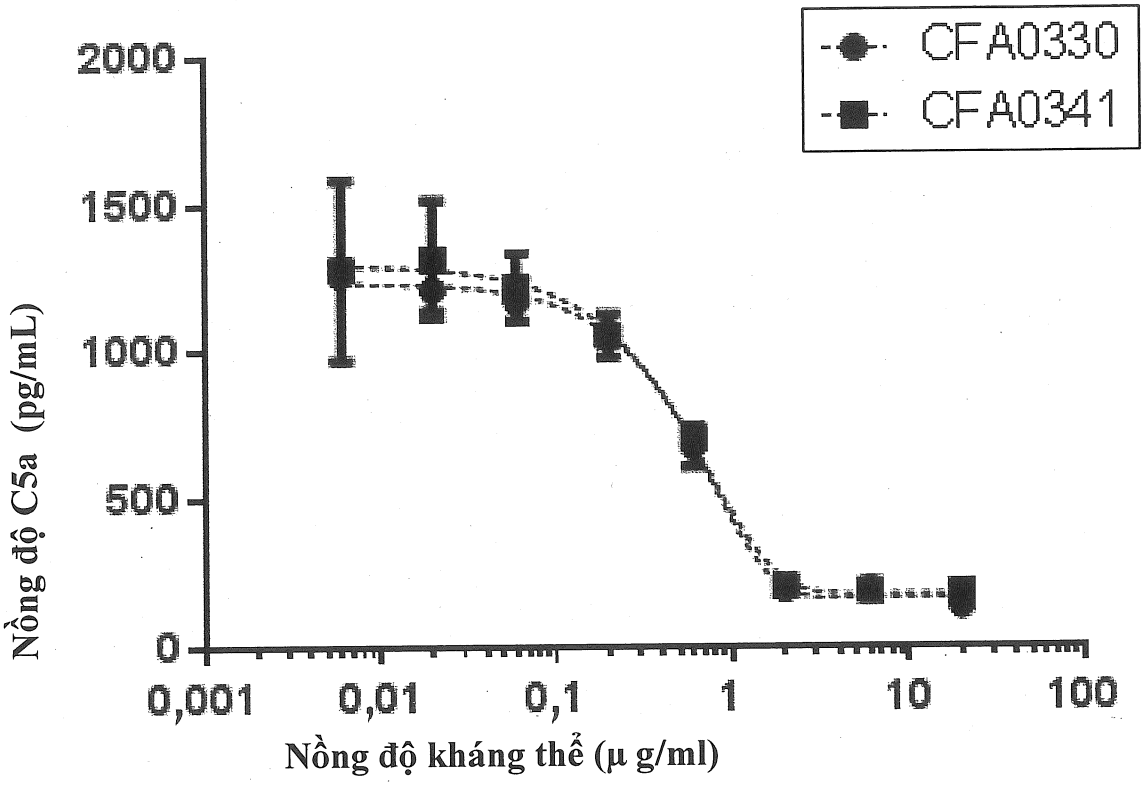
[Fig. 9B]



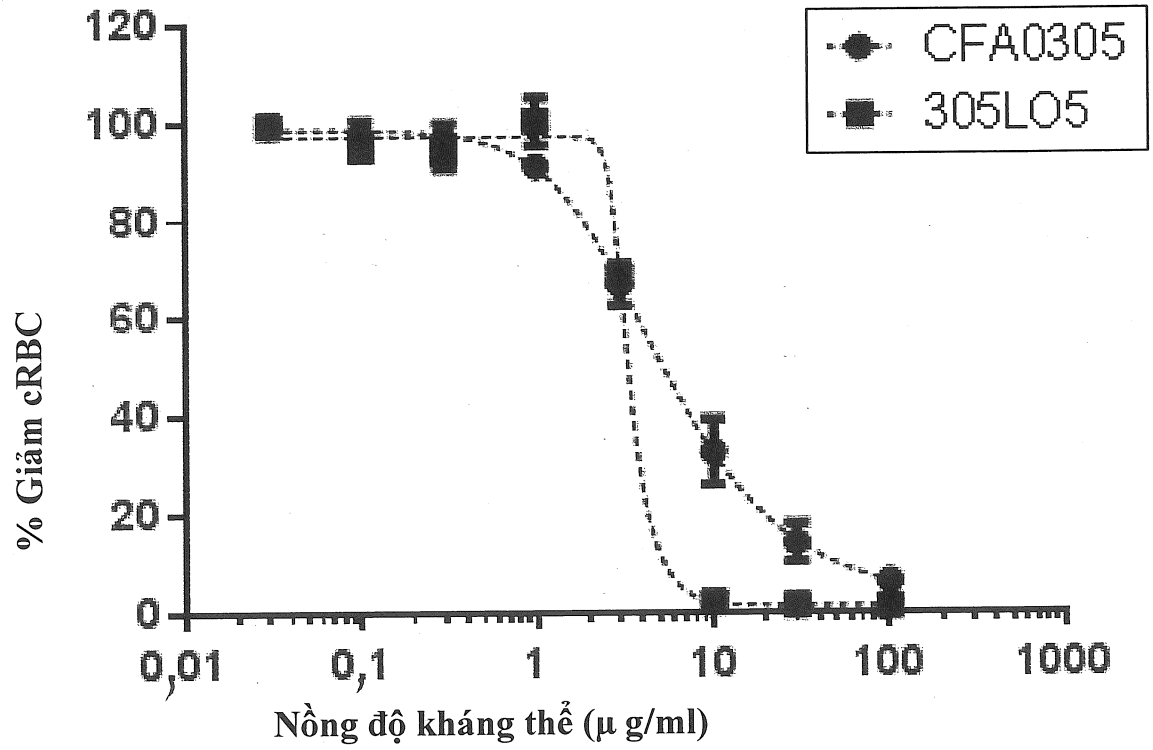
[Fig. 10A]



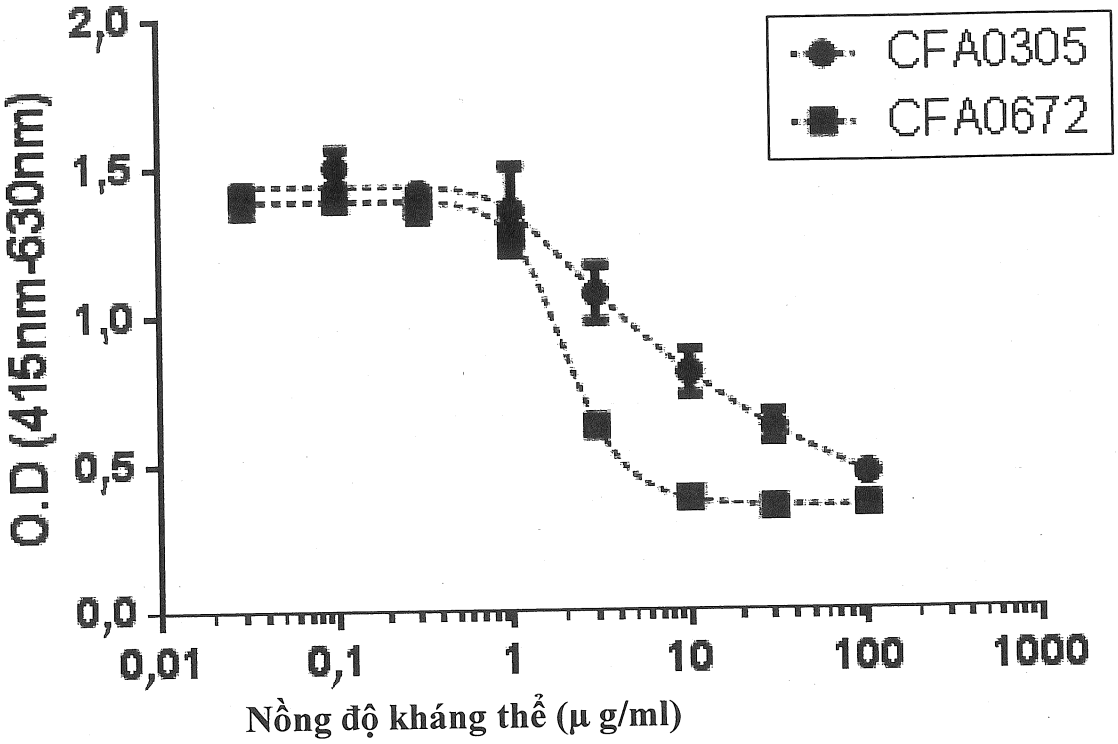
[Fig. 10B]



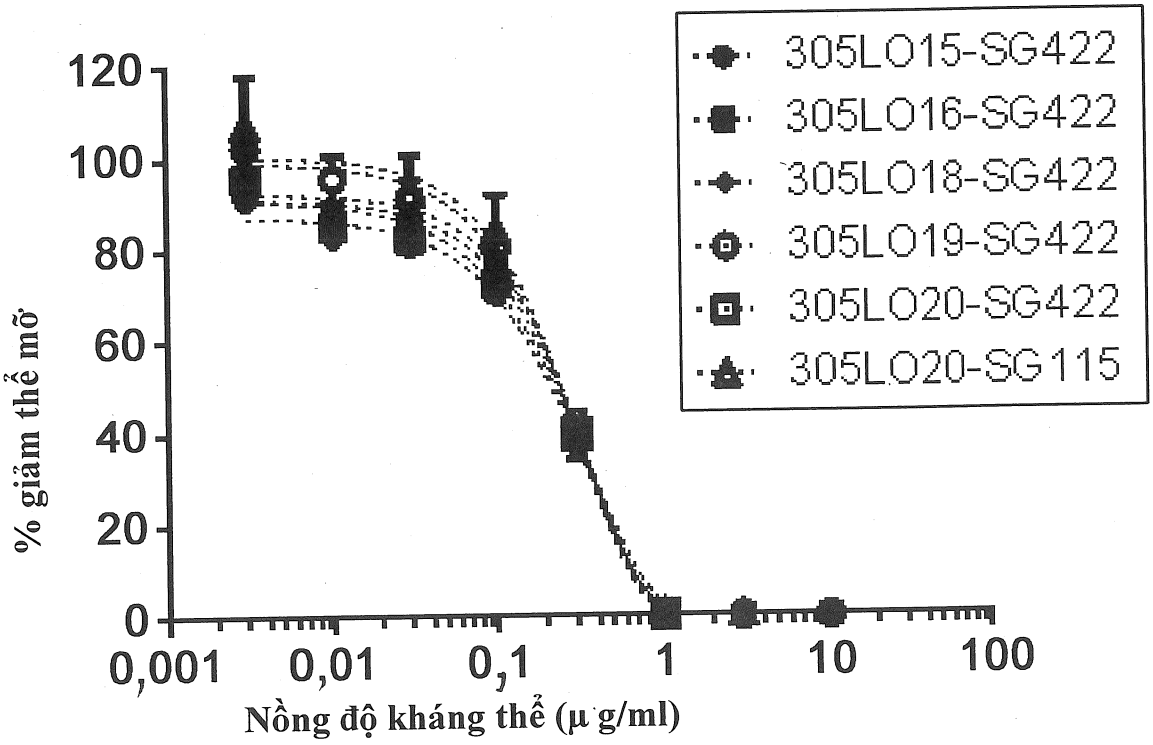
[Fig. 11]



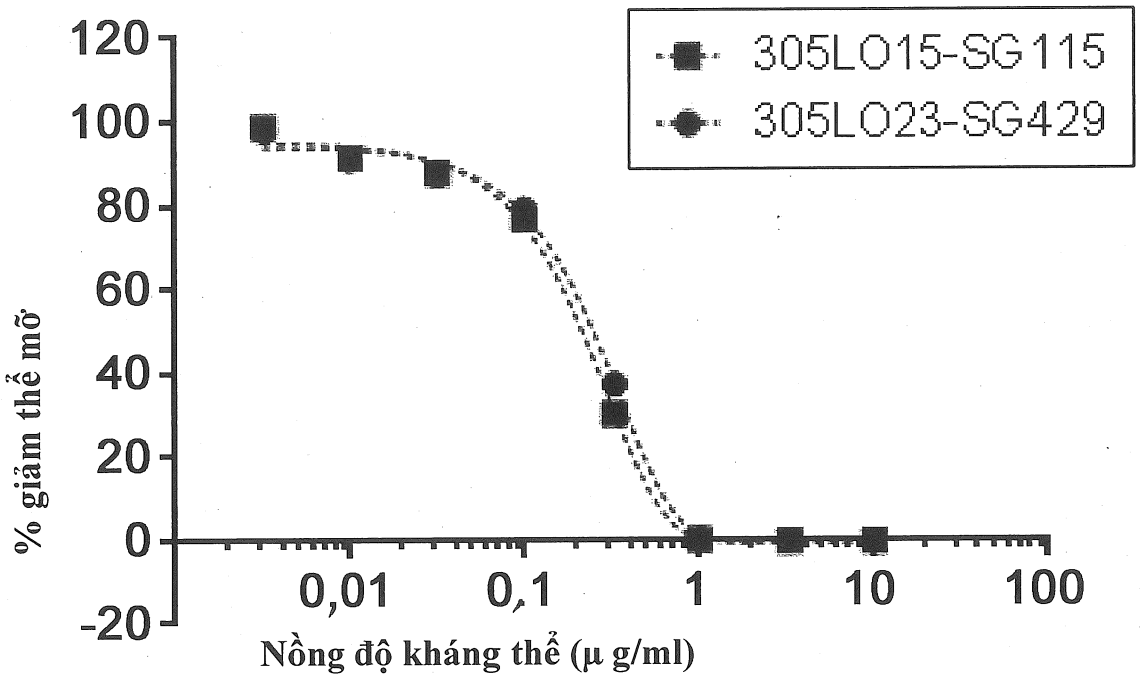
[Fig. 12]


CFA0305
CFA0672
O.D (415nm-630nm)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ kháng thể (µ g/ml)

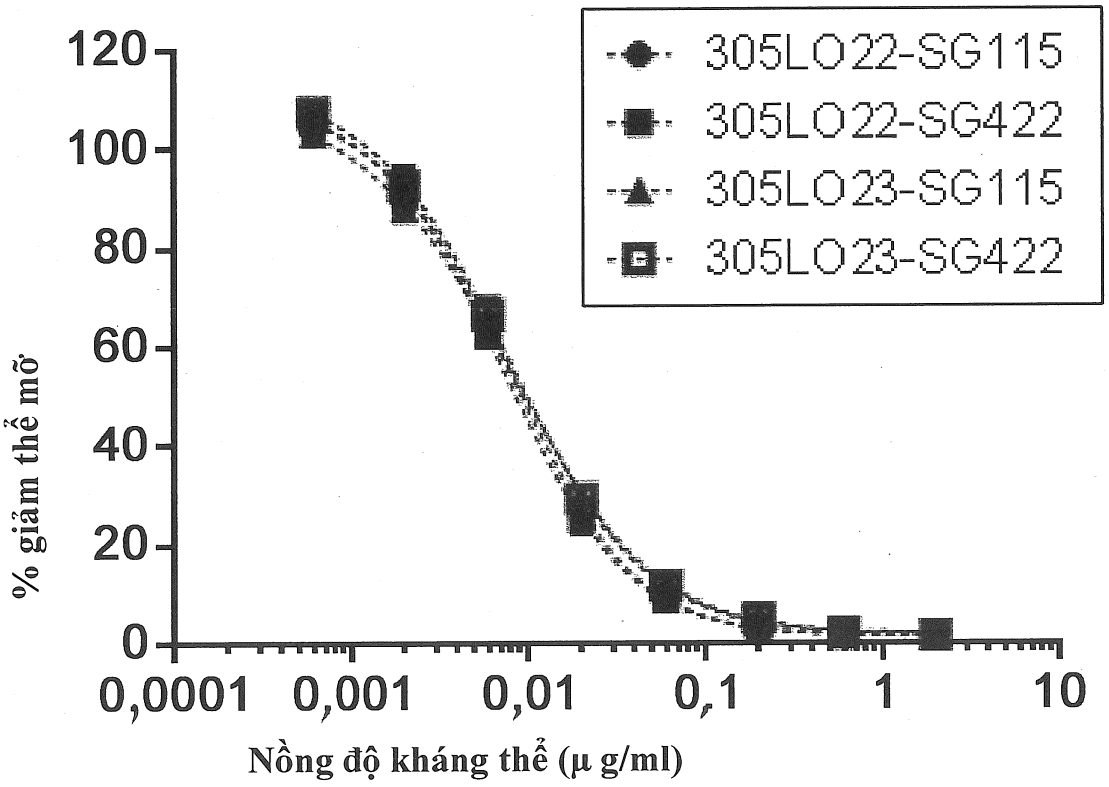
[Fig. 13]


305LO15-SG422
305LO16-SG422
305LO18-SG422
305LO19-SG422
305LO20-SG422
305LO20-SG115
% giảm thể mỡ
120
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ kháng thể (µ g/ml)

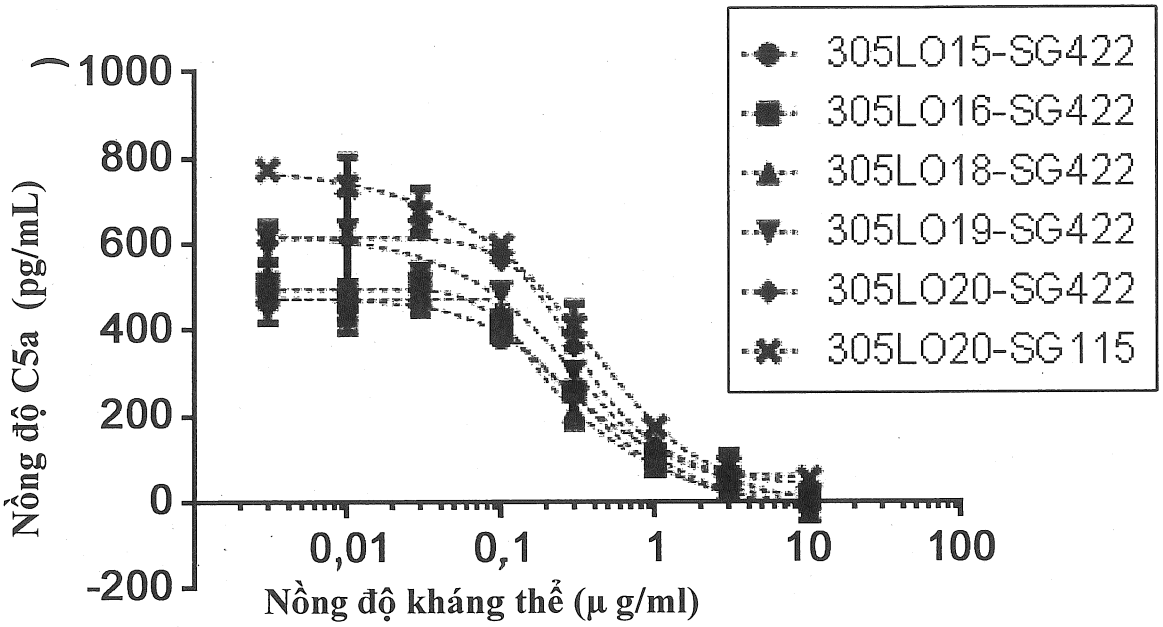
[Fig. 14]


305LO15-SG115
305LO23-SG429
120
100
80
60
40
20
0
-20
% giảm thể mỡ
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ kháng thể (μ g/ml)

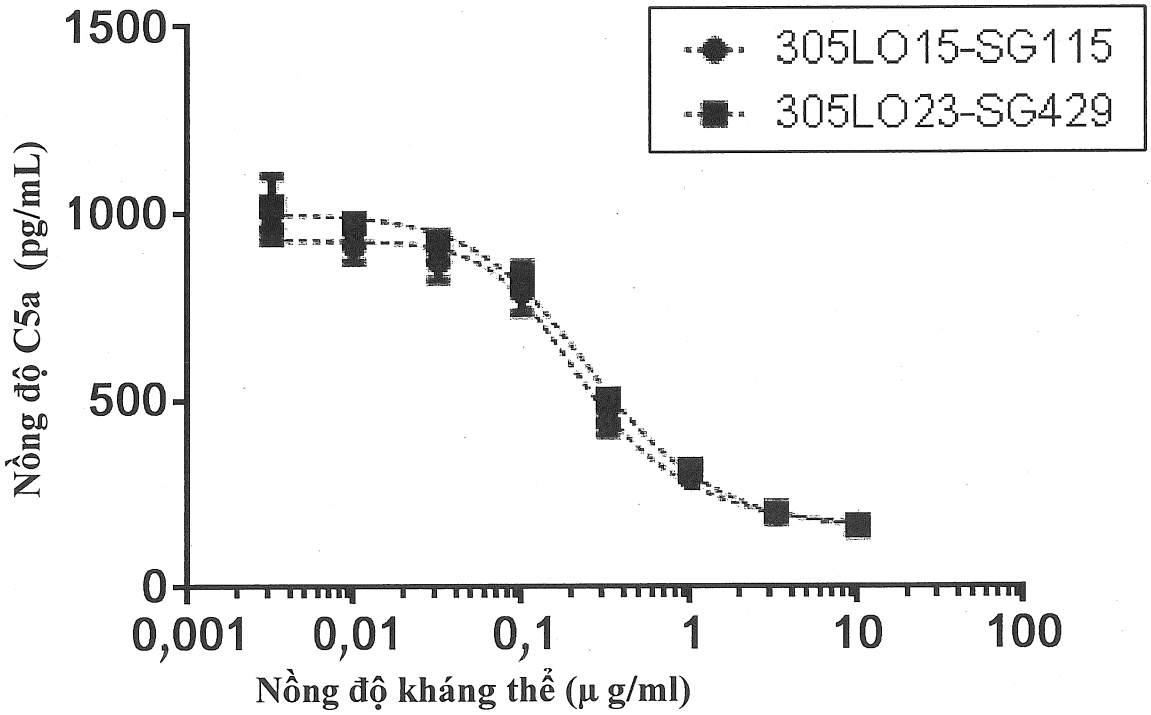
[Fig. 15]


305LO22-SG115
305LO22-SG422
305LO23-SG115
305LO23-SG422
120
100
80
60
40
20
0
% giảm thể mỡ
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Nồng độ kháng thể (μ g/ml)

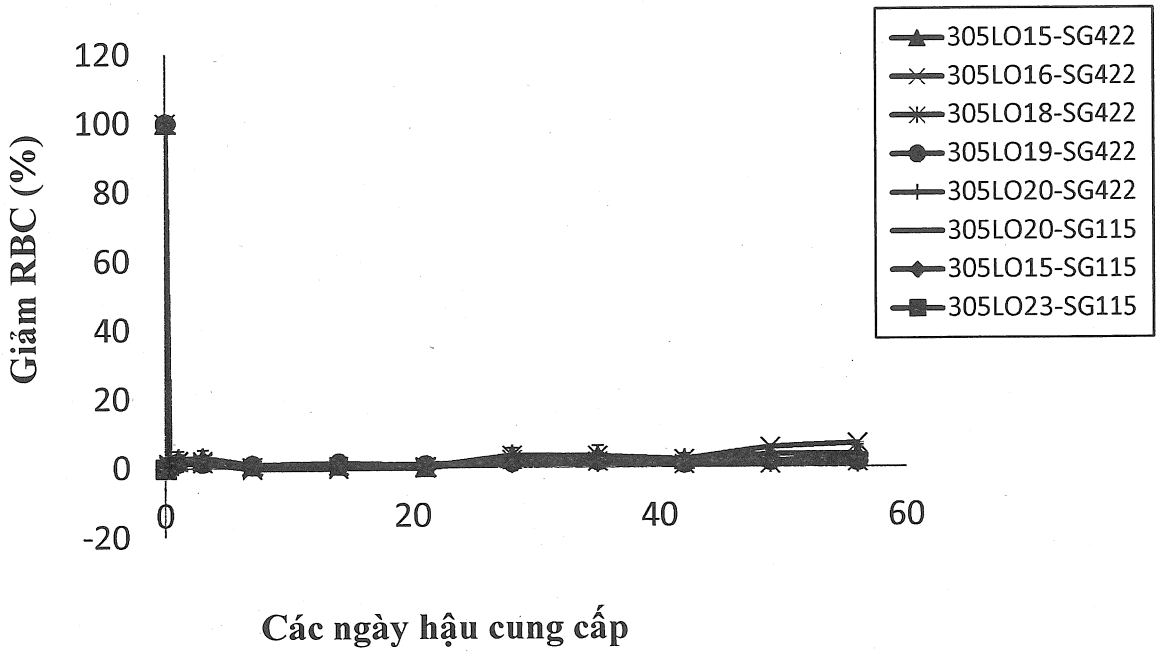
[Fig. 16]


305LO15-SG422
305LO16-SG422
305LO18-SG422
305LO19-SG422
305LO20-SG422
305LO20-SG115
1000
800
600
400
200
0
-200
Nồng độ C5a (pg/mL)
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ kháng thể (μ g/ml)

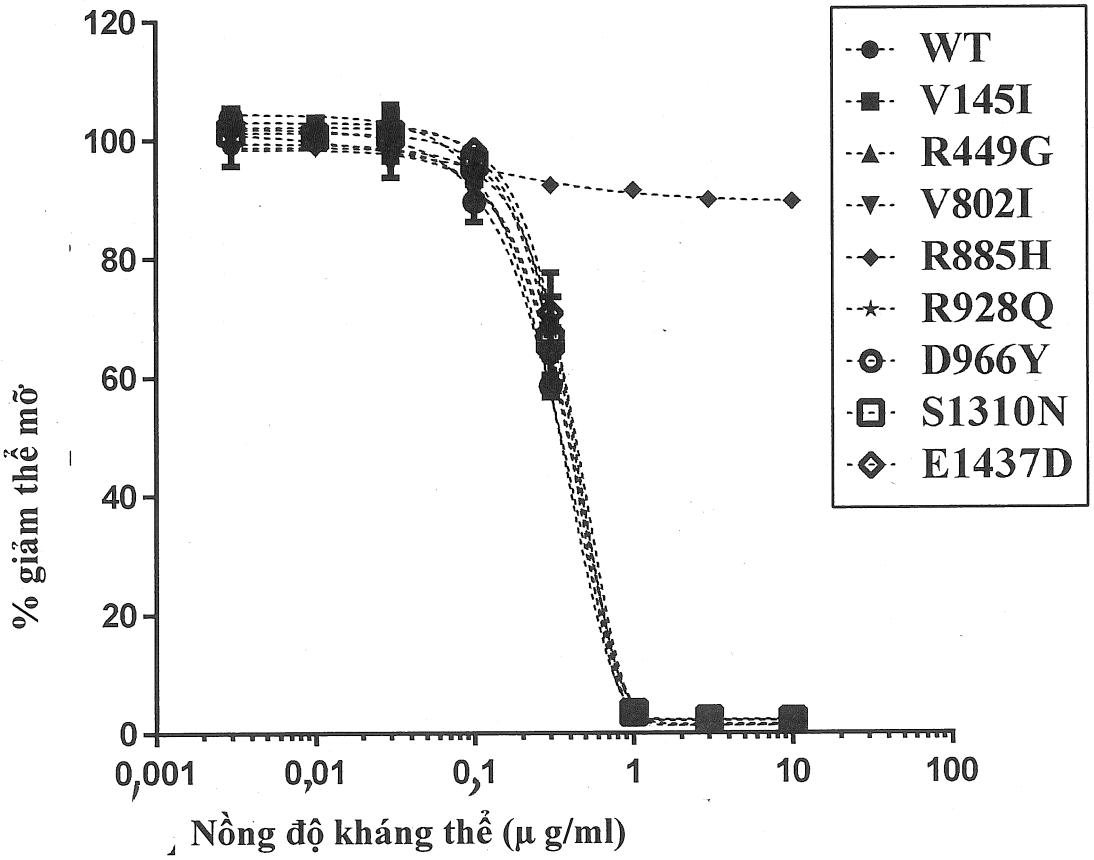
[Fig. 17]


305LO15-SG115
305LO23-SG429
1500
1000
500
0
Nồng độ C5a (pg/mL)
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ kháng thể (μ g/ml)

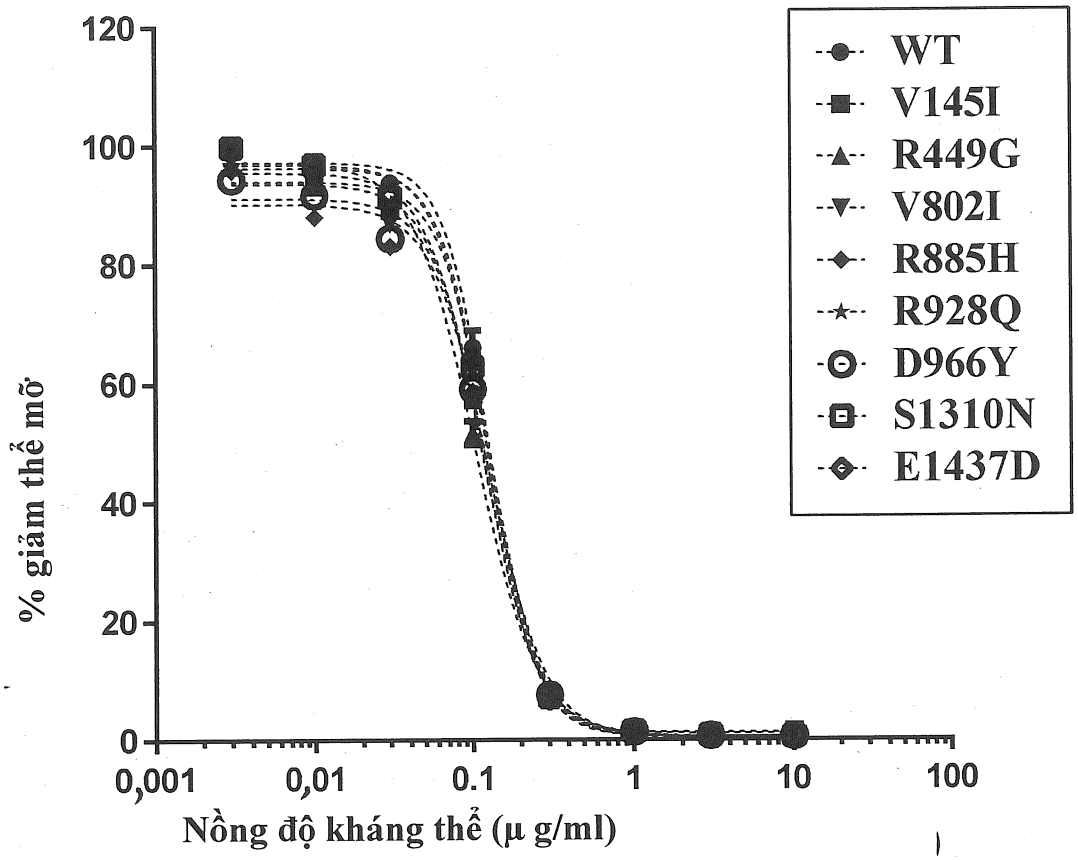
[Fig. 18]


305LO15-SG422
305LO16-SG422
305LO18-SG422
305LO19-SG422
305LO20-SG422
305LO20-SG115
305LO15-SG115
305LO23-SG115
Giảm RBC (%)
120
100
80
60
40
20
0
-20
0
20
40
60
Các ngày hậu cung cấp

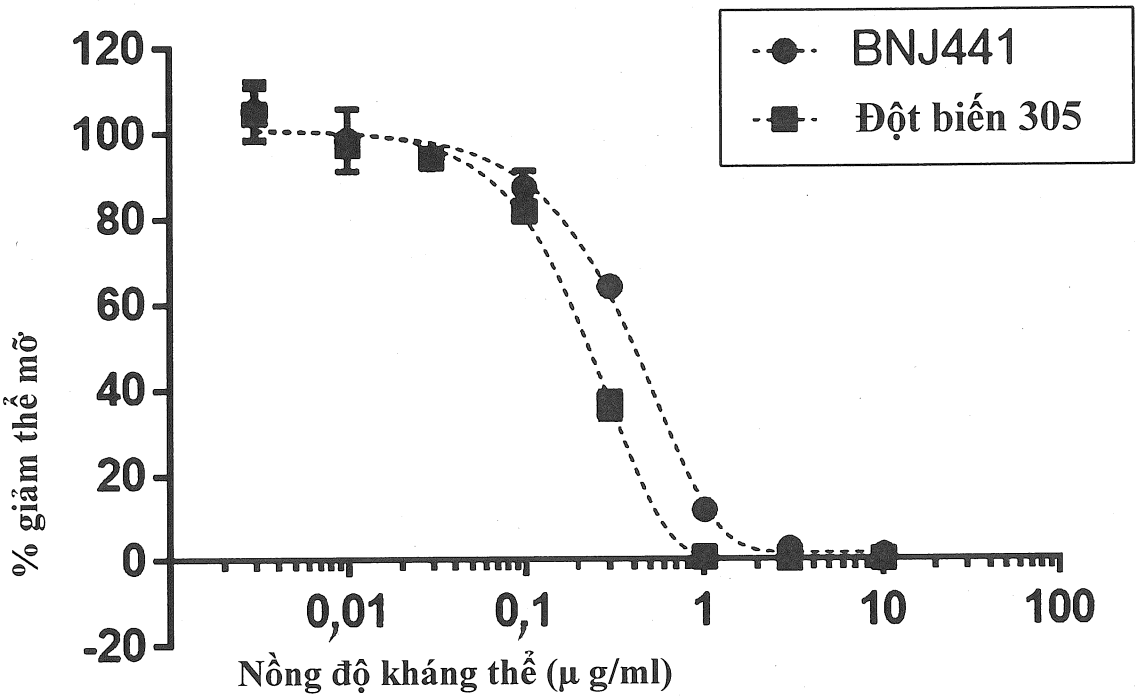
[Fig. 19]


WT
V145I
R449G
V802I
R885H
R928Q
D966Y
S1310N
E1437D
% giảm thể mỡ
120
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ kháng thể (μ g/ml)

[Fig. 20]

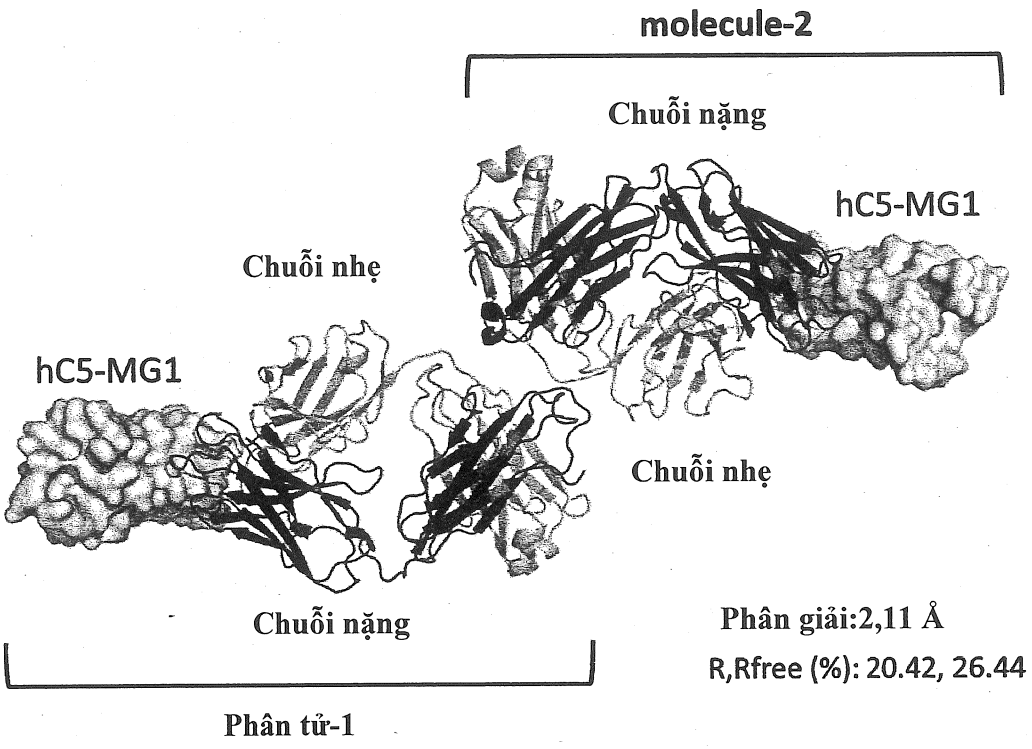

120
100
80
60
40
20
0
% giảm thể mỡ
0,001
0,01
0.1
1
10
100
Nồng độ kháng thể (μ g/ml)
WT
V145I
R449G
V802I
R885H
R928Q
D966Y
S1310N
E1437D

[Fig. 21]

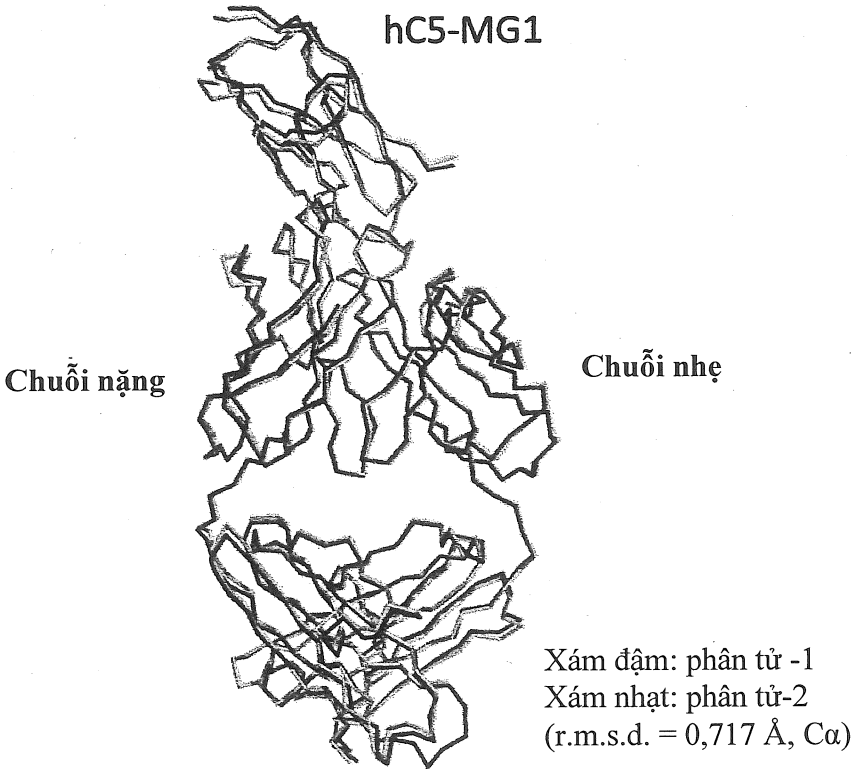

120
100
80
60
40
20
0
-20
% giảm thể mỡ
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ kháng thể (μ g/ml)
BNJ441
Đột biến 305

[Fig. 22]

A)


molecule-2
Chuỗi nặng
hC5-MG1
Chuỗi nhẹ
hC5-MG1
Chuỗi nhẹ
Chuỗi nặng
Phân giải:2,11 Å
R,Rfree (%): 20.42, 26.44
Phân tử-1

B)


hC5-MG1
Chuỗi nặng
Chuỗi nhẹ
Xám đậm: phân tử -1
Xám nhạt: phân tử-2
(r.m.s.d. = 0,717 Å, Cα)

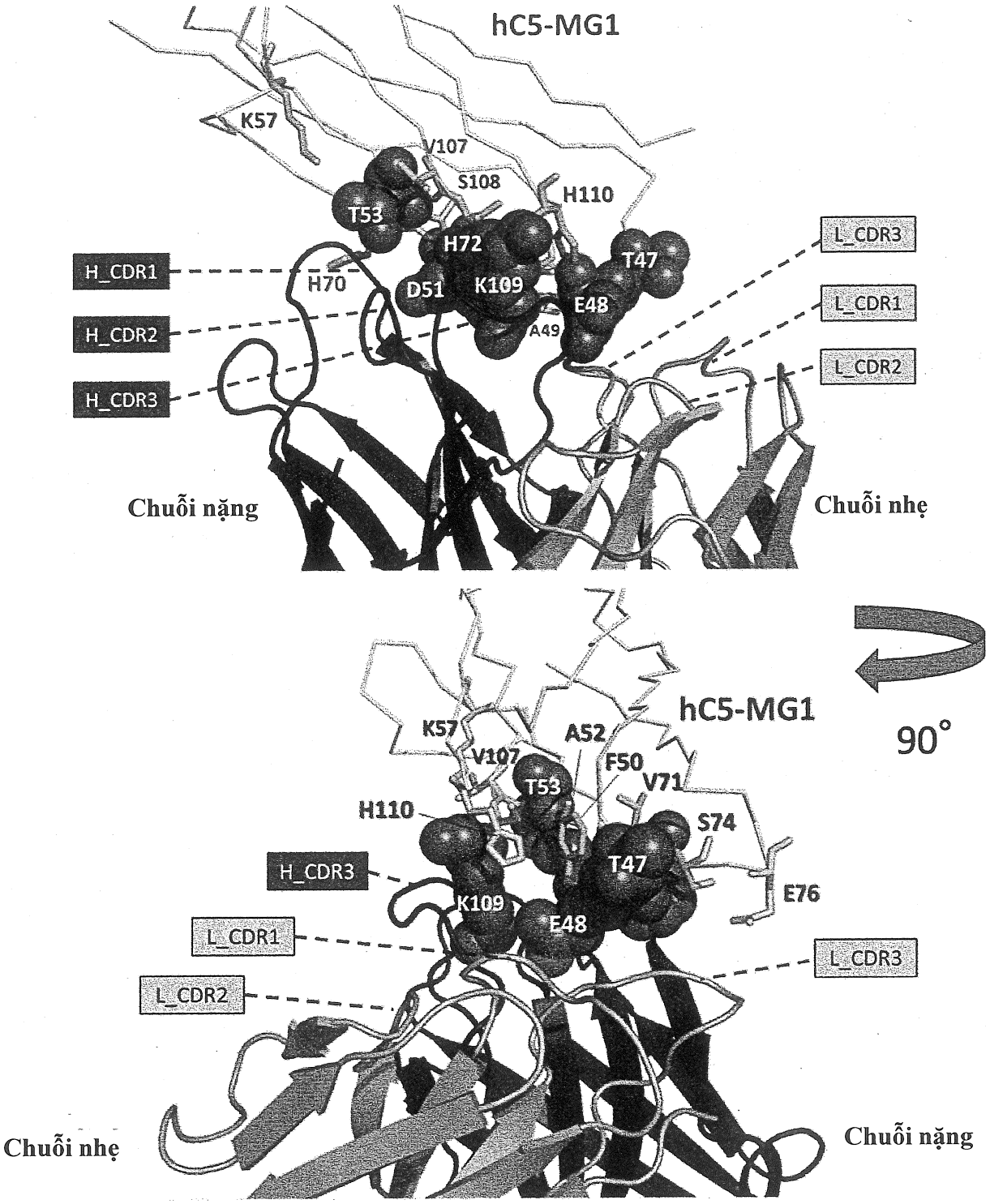
[Fig. 23A]

Miền MG1 HC5 (20-124)

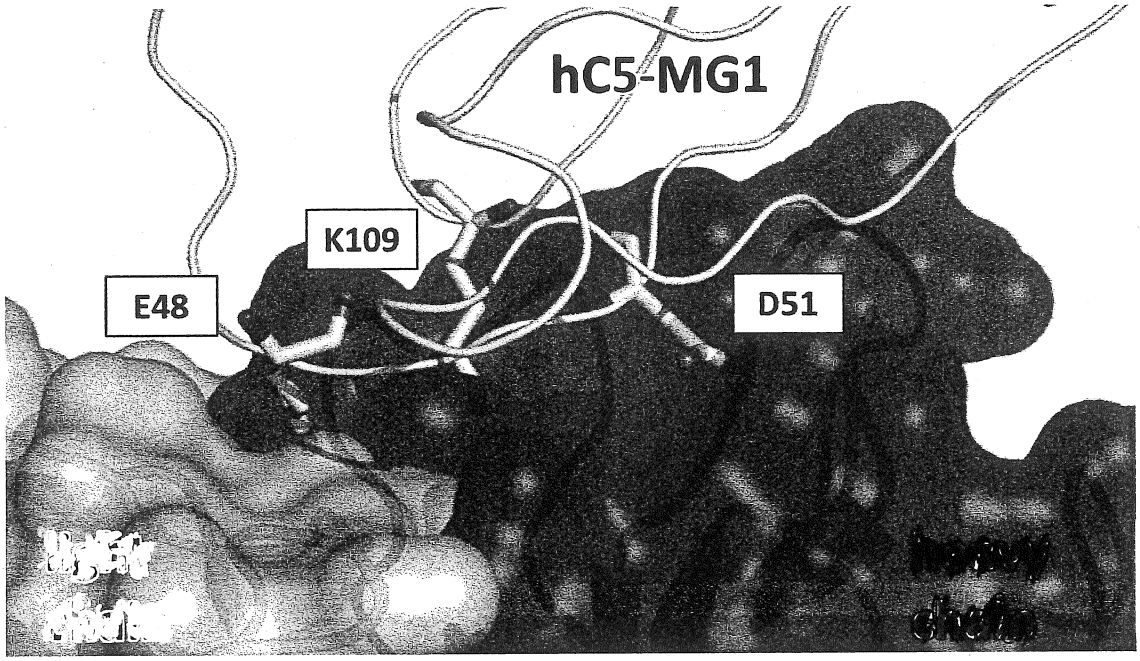
2										3										4											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
E	Q	T	Y	V	I	S	A	P	K	I	F	R	V	G	A	S	E	N	I	V	I	Q	V	Y	G	Y	T	E	A		
5										6										7											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
F	D	A	T	I	S	I	K	S	Y	P	D	K	K	F	S	Y	S	S	G	H	V	H	L	S	S	E	N	K	F		
8										9										1	0										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Q	N	S	A	I	L	T	I	Q	P	K	Q	L	P	G	G	Q	N	P	V	S	Y	V	Y	L	E	V	V	S	K		
1	1									1	2																				
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4																	
H	F	S	K	S	K	R	M	P	I	T	Y	D	N	G																	

< 3.0 Å < 4.5 Å

[Fig. 23B]


hC5-MG1
K57
V107
S108
H110
T53
H72
T47
H_CDR1
H70
D51
K109
E48
A49
H_CDR2
H_CDR3
L_CDR3
L_CDR1
L_CDR2
Chuỗi nặng
Chuỗi nhẹ
hC5-MG1
90°
K57
A52
V107
F50
T53
V71
H110
S74
T47
H_CDR3
E76
K109
E48
L_CDR1
L_CDR3
L_CDR2
Chuỗi nhẹ
Chuỗi nặng

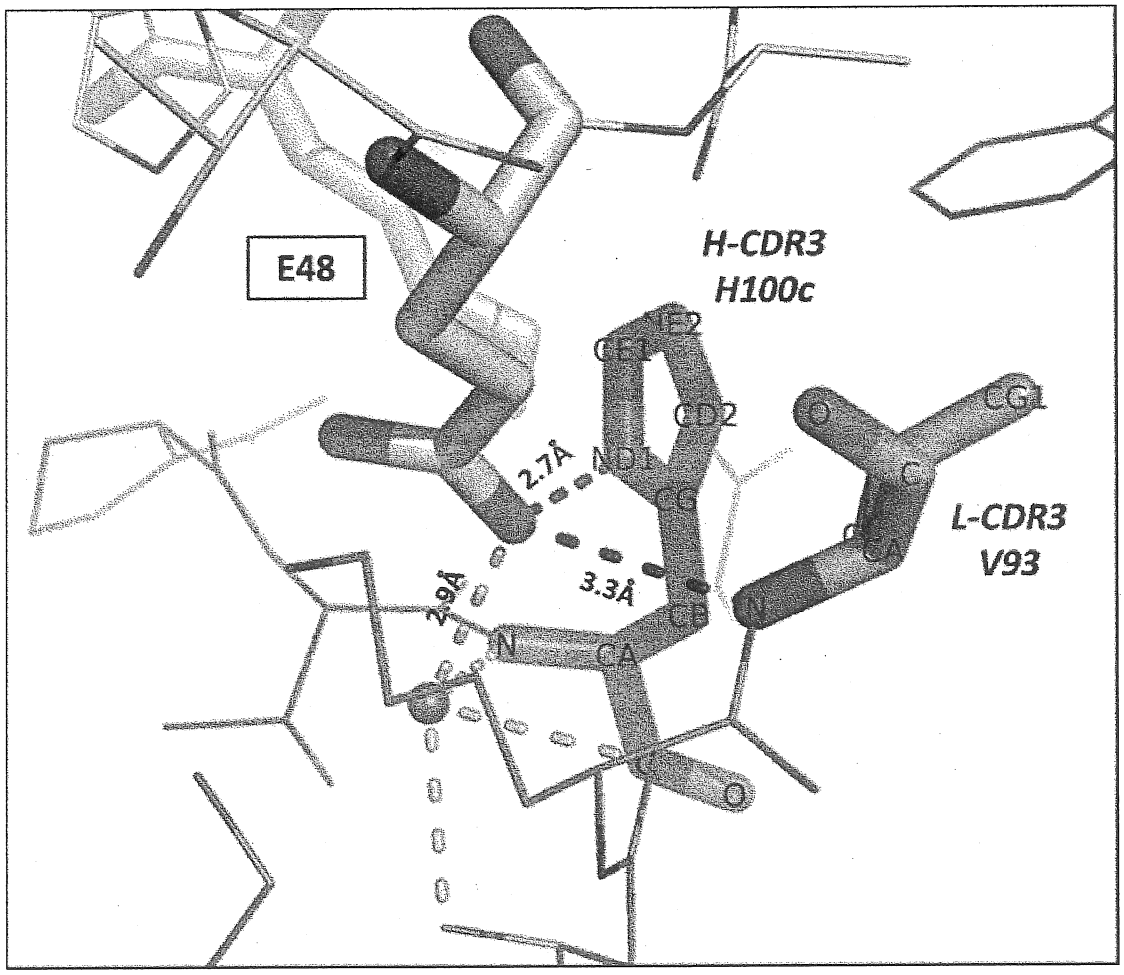
[Fig. 24A]



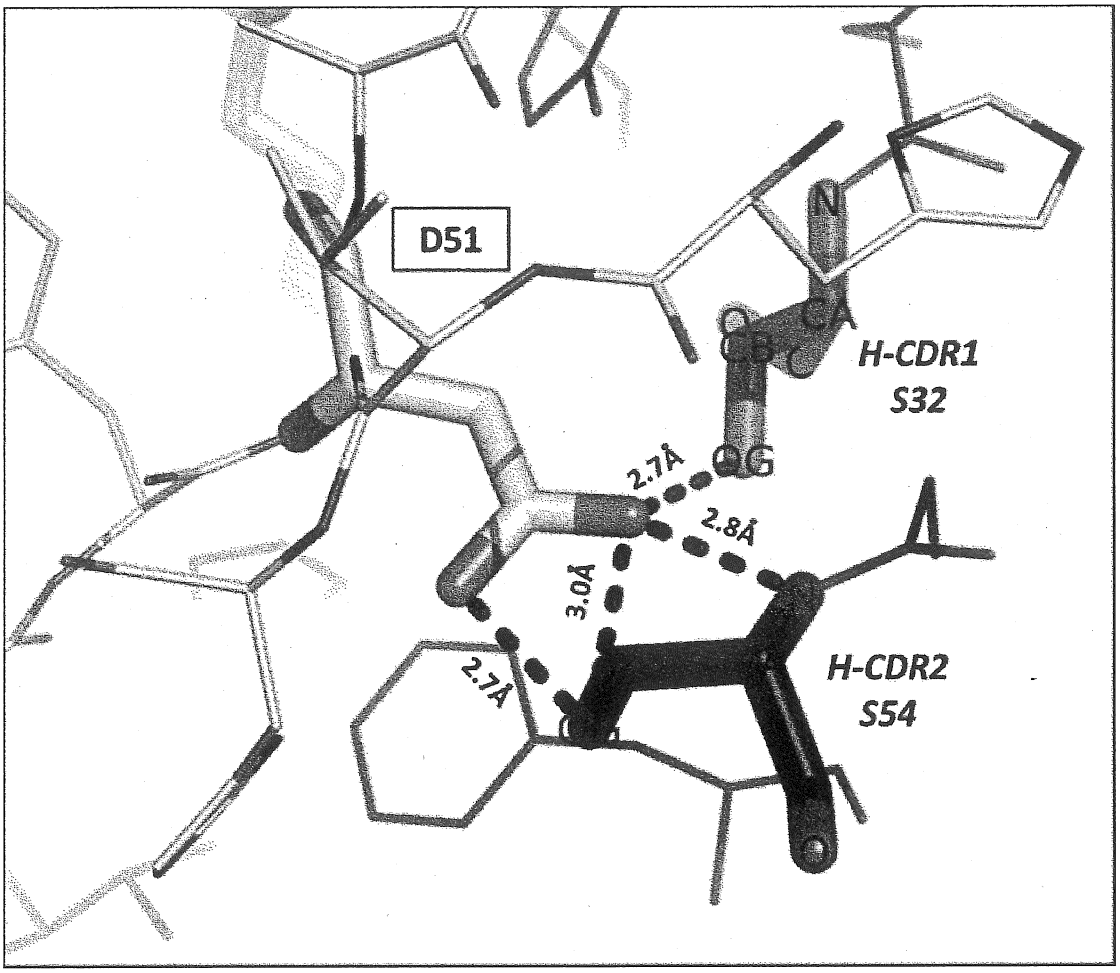
(Chuỗi nhẹ)

(Chuỗi nặng)

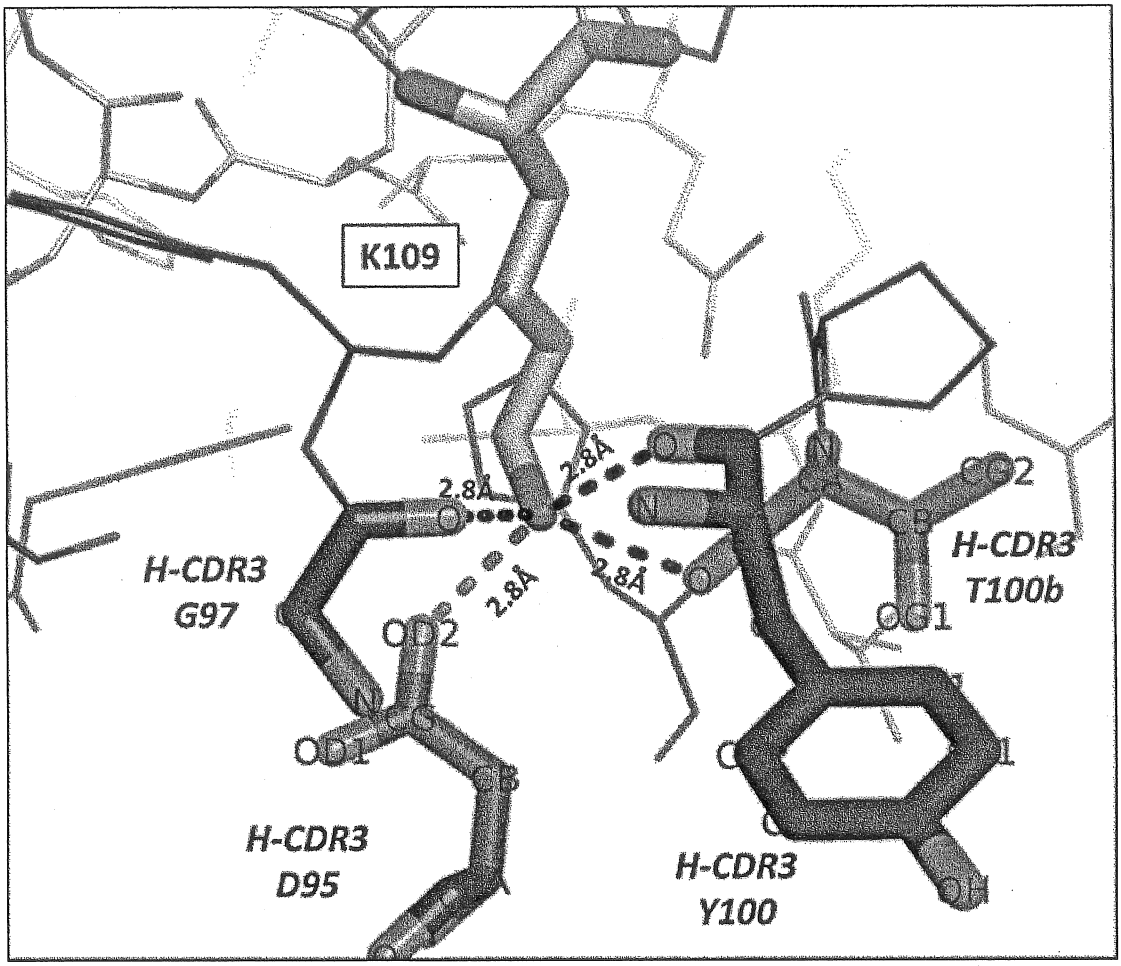
[Fig. 24B]



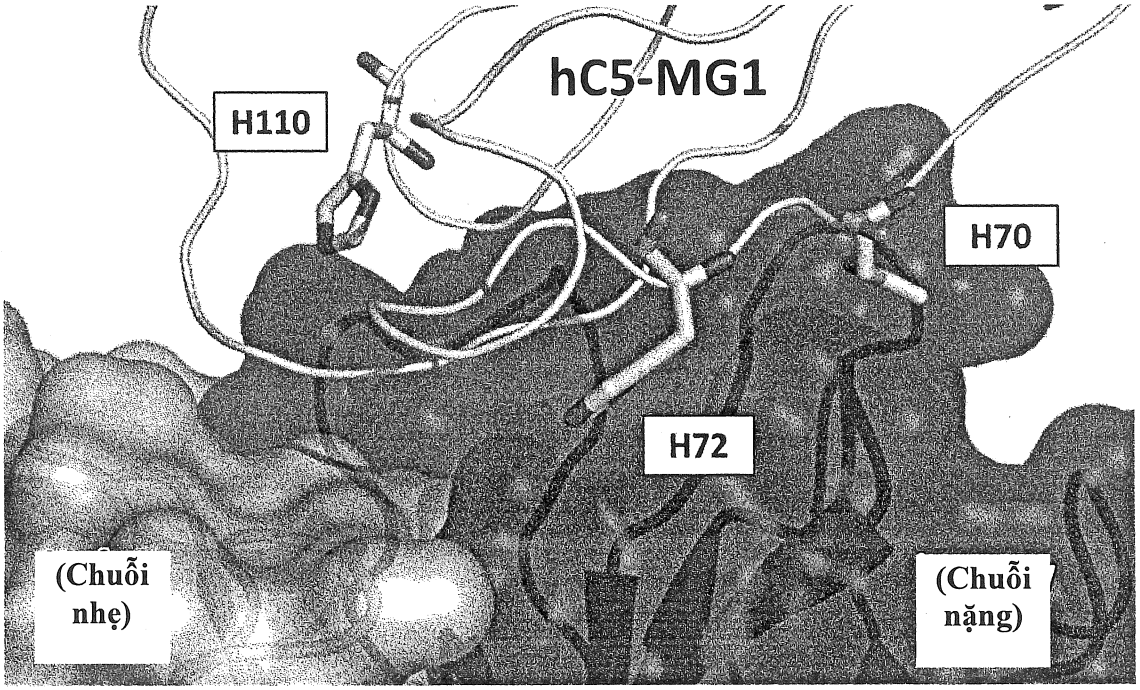
[Fig. 24C]



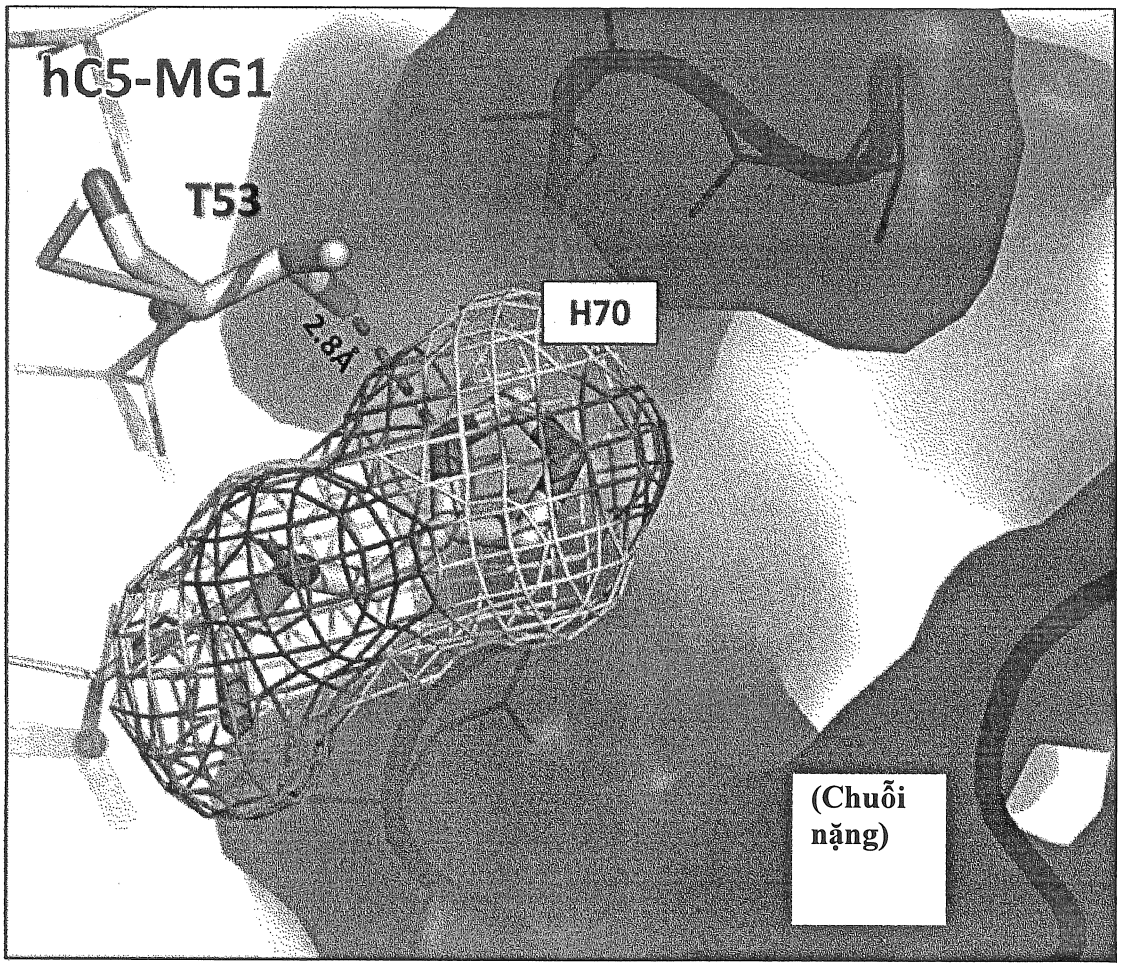
[Fig. 24D]



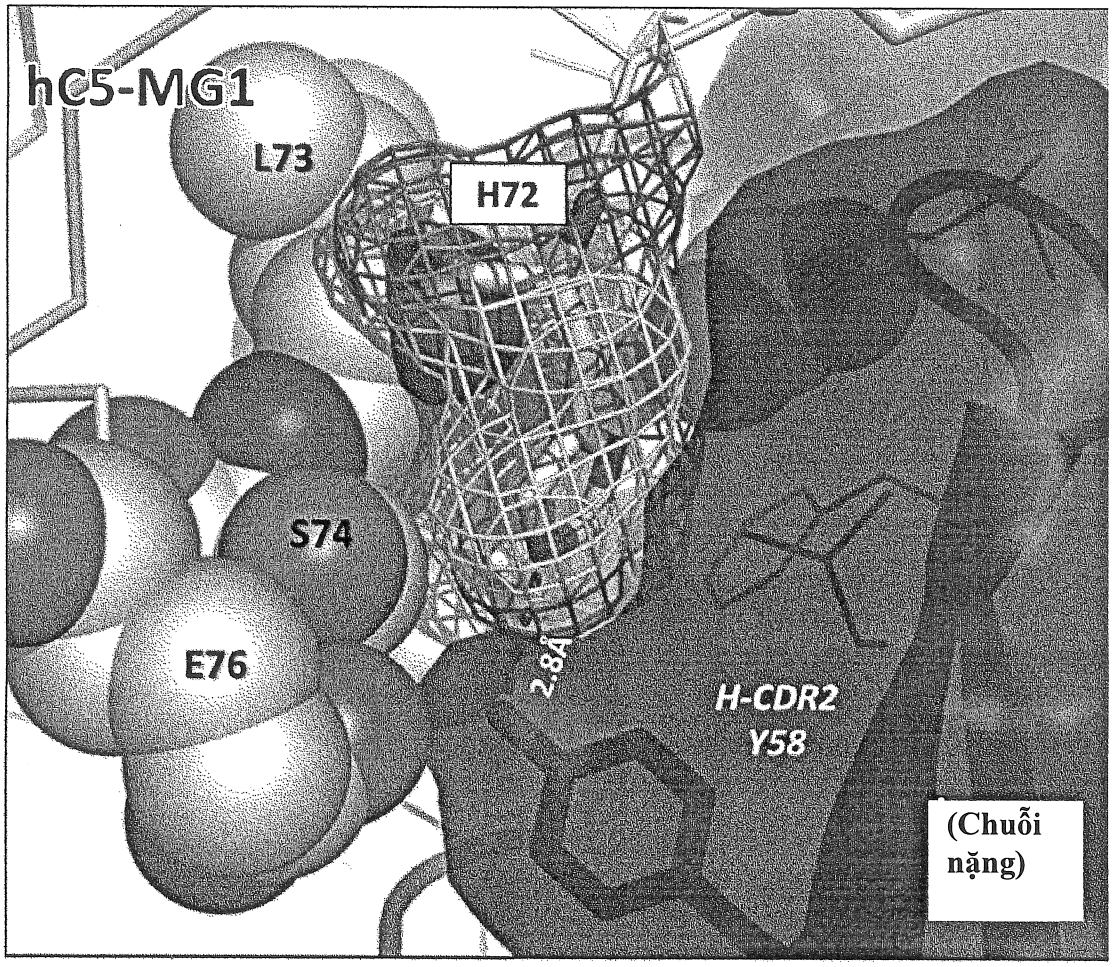
[Fig. 25A]



[Fig. 25B]



[Fig. 25C]



[Fig. 25D]