



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103032** (13) **C2**
(51) МПК

C07K 16/26 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2011 01111	(72) Винахідник(и): Льонг Донмайєнн Дон Мун (US), Луань Пен (US), Тань Їнь (US), Уїтчер Деррік Райан (US), Якхі Піа Пауліїна (FI)
(22) Дата подання заявки: 29.07.2009	(73) Власник(и): Елі Ліллі енд Компані, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.09.2013	(74) Представник: Шляховецький Олександр Михайлович, реєстр. №21
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/086,557	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2006/019339 A1, 26.01.2006 US 2007/224186 A1, 27.09.2007
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 06.08.2008	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 11.04.2011, Бюл.№ 7	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.09.2013, Бюл.№ 17	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/US2009/052044, 29.07.2009	

(54) СЕЛЕКТИВНІ АНТИТІЛА ПРОТИ ГЕПСИДИНУ-25 ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується моноклональних антитіл, які зв'язуються з N-кінцем людського гепсидину-25 і відрізняються тим, що мають високу спорідненість та селективність до згаданого поліпептиду. Антитіла за винаходом є прийнятними для підвищення рівнів заліза у сироватці, кількості ретикулоцитів, кількості еритроцитів, рівнів гемоглобіну та/або гематокриту у людини та для лікування різних розладів, таких як анемія, у людини. Антитіла за цим винаходом є також прийнятними як аналітичні інструменти, наприклад сендвіч-ELISA.

UA 103032 C2

Цей винахід стосується галузі медицини, зокрема, галузі антитіл проти людського гепсидину-25. Конкретніше, цей винахід стосується лікування певних захворювань, таких як анемія, шляхом введення пацієнтам, які цього потребують, селективних антитіл проти гепсидину-25. Цей винахід також стосується способів та наборів для виявлення гепсидину-25 та/або діагностування хворобливого стану, який характеризується підвищеними рівнями гепсидину-25.

Вважають, що людський гепсидин, поліпептид, який експресується, головним чином, гепатоцитами, є важливим залізорегулювальним білком, який за типом негативного зворотного зв'язку регулює всмоктування заліза у кишечнику, рециркування заліза макрофагами та мобілізацію заліза з печінкових депо заліза. Доведено, що надпродукування гепсидину відіграє головну роль у патофізіології анемії та/або анемії, спричиненої хронічними захворюваннями.

На сьогоднішній день кількість прийнятних та ефективних лікарських засобів для лікування анемії та/або анемії, спричиненої хронічними захворюваннями, є обмеженою. Зокрема, введення еритропоєтину є ефективним для лише приблизно 50 % усіх пацієнтів і пов'язане з небажаними побічними ефектами. Окрім того, переливання крові є небажаним через забруднення, інфекції та перевантаження залізом.

Людський гепсидин кодується як препропептид з 84 амінокислот, який містить типову N-кінцеву сигнальну послідовність з 24 амінокислот з інформацією про те, що подальша послідовність будується безпосередньо на мембрані ендоплазматичного ретикулума, та ділянку з 35 амінокислот з консенсусним сайтом, безпосередньо за яким йде C-кінцевий біологічно активний залізорегулювальний гормон з 25 амінокислот (гепсидин-25, послідовність SEQ ID NO: 1). Відомо, що *in vivo* утворюються також різні скорочені на N-кінці форми гепсидину, такі як гепсидин-20 (наприклад, для людей, амінокислоти 6-25 послідовності SEQ ID NO: 1) та гепсидин-22 (наприклад, для людей, амінокислоти 4-25 послідовності SEQ ID NO: 1). Гадають, однак, що гепсидин-25 є найбільш, якщо не єдиною, фізіологічно прийнятною формою гепсидину у людей. Особливо бажаними є лікарські засоби, які, на відміну від попередника або скорочених форм, селективно регулюють концентрацію гепсидину-25. Зокрема, антитіла, які, на відміну від попередника або скорочених форм, селективно зв'язуються з гепсидином-25, забезпечили б численні переваги при лікуванні або діагностуванні розладів, пов'язаних з підвищеними рівнями гепсидину-25. Наприклад, порівняно з неселективними антитілами проти гепсидину, високоафінні селективні антитіла проти гепсидину-25 знизили б ризик виникнення побічних ефектів, та клінічна доза, необхідна для ефективного лікування, була б меншою завдяки тому, що терапевтичні антитіла не зв'язувались би з фізіологічно неприйнятними формами гепсидину. Незважаючи на те, що раніше повідомлялось про нелюдські поліклональні та моноклональні антитіла проти гепсидину (дивись, наприклад, публікації заявок на патент США № 2006/0019339, № 2007/0224186 та № 2008/0213277), у цій галузі все ще залишається велика потреба у моноклональних антитілах, які селективно зв'язуються з гепсидином-25. Таким чином, одним з аспектів цього винаходу є надання антитіл, які селективно зв'язують людський гепсидин-25 у межах амінокислот гепсидину-25 від 1 до 7, включно. Такі антитіла є прийнятними для підвищення рівнів заліза у сироватці, кількості ретикулоцитів, кількості еритроцитів, рівнів гемоглобіну та/або гематокриту у людини для лікування захворювання, стану або розладу, таких як анемія.

На додаток до цього, наявні імунологічні аналізи на гепсидин не відрізняють активного, фізіологічно прийнятного, гепсидину-25 від неактивних, фізіологічно неприйнятних, видів гепсидину (дивись, наприклад, Kemna E.H., et al., *Haematologica*, 93(1):90-97 (2008); Roe M.A., et al., *Br. J. Nutr.*, 97:544-549 (2007); та Luukkonen S. and Punnonen K., *Gin. Chem. Lab. Med.*, 44:1361-1362 (2006)). На цей час єдиними вільно доступними методами селективного аналізу на гепсидин-25 є LC/MS (рідина хроматографія/мас-спектроскопія) або подібні трудомісткі методи, які потребують виділення різних форм гепсидину (дивись, наприклад, Gutierrez J.A., et al., *BioTechniques*, 38:S13-S17 (2005), Murphy, et al., *Blood*, 110:1048-1054 (2007), та Kemna E.H., et al., *Clin. Chem.*, 53:620-628 (2007)). Ці аналізи можуть бути надійними та точними, але їх складність, вартість та високі вимоги до рівня операторського досвіду та вправності є причиною обмеження їх повсякденного застосування. Відповідно, існує також велика потреба у антитілах, які селективно та з високою спорідненістю зв'язуються з людським гепсидином-25, для їх застосування у імунологічних аналізах для виявлення або визначення рівнів гепсидину-25. Таким чином, інший аспект цього винаходу пропонує способи застосування селективних антитіл проти гепсидину-25 у відносно простих, але високочутливих, надійних та селективних імунологічних аналізах для виявлення та визначення рівнів гепсидину-25 у тканинах та біологічних рідинах ссавців.

Цей винахід пропонує антитіла, які селективно зв'язують людський гепсидин-25 у межах амінокислот гепсидину-25 від 1 до 7, включно. За одним з варіантів здійснення антитіло за цим

винаходом селективно зв'язує поліпептид, який має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 1, на відміну від споріднених попередників та скорочених поліпептидів, і містить шість CDR (гіперваріабельних ділянок), вибраних з групи, яку складають: (i) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 9, 10, 11, 32, 33 та 34, відповідно; (ii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 12, 13, 14, 35, 36 та 37, відповідно; (iii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 45, 13, 14, 35, 36 та 37, відповідно; (iv) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 12, 13, 14, 38, 36 та 37, відповідно; (v) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 15, 10, 16, 39, 40 та 41, відповідно; (vi) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 20, 21, 22, 42, 43 та 44, відповідно; (vii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 20, 21, 23, 42, 43 та 44, відповідно; (viii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 24, 25, 23, 42, 43 та 44, відповідно; (ix) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 26, 25, 27, 42, 43 та 44, відповідно; та (x) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 26, 25, 28, 42, 43 та 44, відповідно.

За іншим варіантом здійснення антитіла за цим винаходом зв'язує антигенну детермінанту, яка міститься у межах амінокислот 1-7, включно, людського гепсидину-25, тобто DTHFPIC послідовності SEQ ID NO: 1 або DTNFPIC гепсидину-25 гризунів (послідовність SEQ ID NO: 2 або 3). За варіантом, якому віддається перевага, антитіло за цим винаходом містить поліпептид варіабельної ділянки легкого ланцюга ("LCVR") та поліпептид варіабельної ділянки важкого ланцюга ("HCVR"), де (i) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 48 та 49, відповідно; (ii) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 50 та 51, відповідно; (iii) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 52 та 51, відповідно; (iv) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 53 та 54, відповідно; (v) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 55 та 56, відповідно; (vi) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 59 та 58, відповідно; (vii) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 60 та 58, відповідно; (viii) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 61 та 58, відповідно; (ix) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 62 та 58, відповідно; або (x) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 63 та 58, відповідно.

За іншим варіантом здійснення цей винахід пропонує ізольовані нуклеїновокислотні молекули, що кодують антитіла за цим винаходом; вектори, які містять нуклеїновокислотні молекули, що кодують антитіла за цим винаходом, факультативно функціонально зв'язані з контрольними послідовностями, які розпізнаються клітиною-хазяїном, трансформованою згаданим вектором; клітини-хазяї, які містять вектори, які містять нуклеїновокислотні молекули, що кодують антитіла за цим винаходом; спосіб продукування антитіла за цим винаходом, який включає культивування клітин-хазяїв, які містять нуклеїновокислотні молекули, що кодують антитіла за цим винаходом, завдяки чому експресується нуклеїнова кислота, і факультативно виділення антитіла з середовища для культивування клітин-хазяїв.

За іншим варіантом здійснення цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, яка містить антитіло за цим винаходом та фармацевтично прийнятний носій або розріджувач. За варіантом, якому віддається перевага, згадана фармацевтична композиція містить однорідну або по суті однорідну популяцію моноклонального антитіла за цим винаходом та фармацевтично прийнятний носій або розріджувач.

За іншим варіантом здійснення цей винахід пропонує людське генно-інженерне моноклональне антитіло, яке селективно зв'язує зрілий людський гепсидин, для застосування у терапії.

За іншим варіантом здійснення цей винахід пропонує людське генно-інженерне моноклональне антитіло, яке селективно зв'язує зрілий людський гепсидин, для застосування для лікування або запобігання анемії у людини.

Цей винахід також передбачає застосування людського генно-інженерного моноклонального антитіла, яке селективно зв'язує зрілий людський гепсидин, у способі підвищення рівнів заліза у сироватці, кількості ретикулоцитів, кількості еритроцитів, рівнів гемоглобіну та/або гематокриту у тварини, за варіантом, якому віддається перевага, виду ссавців, за варіантом, якому віддається більша перевага, людини.

Цей винахід також пропонує спосіб підвищення рівнів заліза у сироватці, кількості ретикулоцитів, кількості еритроцитів, рівнів гемоглобіну та/або гематокриту, який включає введення людині, яка цього потребує, ефективної кількості людського генно-інженерного моноклонального антитіла, яке зв'язує зрілий людський гепсидин.

За іншим варіантом здійснення цей винахід пропонує спосіб лікування захворювання, стану або розладу у людини, сприятливим для якого є підвищення рівня заліза у сироватці, кількості ретикулоцитів, кількості еритроцитів, рівнів гемоглобіну та/або гематокриту, у тому числі (але без обмеження) анемії, наприклад, анемії, спричиненої хронічними захворюваннями, запалення, хронічного захворювання та/або раку.

Цей винахід пропонує також спосіб визначення кількості гепсидину-25 у зразку тканини або біологічної рідини, який одержали від ссавця, що включає стадії: (i) одержання зразка тканини або біологічної рідини від згаданого ссавця; (ii) введення згаданого зразка у контакт з селективним антитілом проти гепсидину-25 або його фрагментом; та (iii) визначення кількості гепсидину-25 у згаданому зразку безпосередньо або опосередковано за допомогою кількісного, напівкількісного або якісного способу.

За іншим варіантом здійснення антитіла за цим винаходом є прийнятними для способу кількісного визначення білка гепсидину-25 у зразку тканини або біологічної рідини, який одержали від ссавця, який включає: (i) сенсibiliзацію твердої основи першим антитілом, яке зв'язує антигенну детермінанту, яка міститься між амінокислотами 5-25, включно, послідовності SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 (мишачі амінокислоти 5-25) або послідовності SEQ ID NO: 2 (пацючі амінокислоти 5-25); (ii) одержання експериментального зразка тканини або біологічної рідини від згаданого ссавця; (iii) нанесення експериментального зразка на сенсibiliзовану антитілом тверду основу; (iii) надання можливості будь-якому присутньому гепсидину утворення комплексу гепсидин-перше антитіло за відповідних умов для зв'язування гепсидину-першого антитіла; (iv) видалення незв'язаного зразка; (v) нанесення другого антитіла, яке зв'язує антигенну детермінанту, яка міститься у межах амінокислот 1-7, включно, людського гепсидину-25 або гепсидину-25 гризунів, тобто DTHFPIC або DTNFPIC, відповідно, на тверду основу; (vi) надання можливості будь-якому присутньому гепсидину-25 утворення комплексу друге антитіло-гепсидин-25-перше антитіло за відповідних умов для зв'язування другим антитілом будь-якого комплексу гепсидин-25-перше антитіло; та (v) видалення незв'язаного другого антитіла; і (vi) виявлення присутності або відсутності другого антитіла. Присутність або відсутність другого антитіла може виявлятися безпосередньо або опосередковано і може визначатись за допомогою кількісного, напівкількісного або якісного способу.

Опис фігур

На Фіг. 1 зображений мас-спектр MALDI-TOF (мас-спектрометрія з іонізацією методом лазерної десорбції у матричному розчині з часопролітним аналізатором) форм людського гепсидину, імунопреципітованого з людської сироватки із селективним Mab 3.23 проти гепсидину-25. Сигнал 1 має масу, яка відповідає очікуваній масі інтактного людського гепсидину-25 (приблизна молекулярна маса (MW) 2790 Дальтон (Да)). Сигнал 2 має масу, яка відповідає очікуваній масі інтактного людського гепсидину-20 (молекулярна маса 2192 Да). Як показує хроматограма, Mab 3.23 проти гепсидину-25 зв'язує виявні кількості гепсидину-25 і набагато менші кількості гепсидину-20. Mab 3.23, як видається, не зв'язує виявних кількостей гепсидину-22 (молекулярна маса 2436 Да), гепсидину-24 (молекулярна маса 2674 Да) або прогепсидину (молекулярна маса 6929 Да). Мас-спектр одержали за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометра у лінійному режимі з утворенням позитивних іонів з а-ціано-4-гідроксикоричною кислотою (пептидна матриця) як носієм для зразків по суті як описано у Прикладі 6 нижче.

На Фіг. 2 зображений збільшений вид відповідної ділянки (молекулярна маса 2000-3000 Да) мас-спектра, представленого на Фіг. 1. Як показує хроматограма, Mab 3.23 зв'язує гепсидин-25 (Сигнал 1) і, набагато меншою мірою, гепсидин-20 (Сигнал 2). Селективне Mab 3.23 проти

гепсидину, як видається, не зв'язує виявник кількостей гепсидину-22 (молекулярна маса 2436 Да) або гепсидину-24 (молекулярна маса 2674 Да).

На Фіг. 3 зображений мас-спектр MALDI-TOF форм людського гепсидину, імунопреципітованого з людської сироватки із селективним Mab 5E8 проти гепсидину-25. Сигнал 1 має масу, яка відповідає очікуваній масі інтактного людського гепсидину-25 (2790 Да). Як показує хроматограма, Mab 5E8 проти гепсидину-25 зв'язує виявні кількості лише гепсидину-25. Мас-спектр одержали за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометра у лінійному режимі з утворенням позитивних іонів з а-ціано-4-гідроксикоричною кислотою (пептидна матриця) як носієм для зразків по суті як описано у Прикладі 6 нижче.

На Фіг. 4 зображений збільшений вид відповідної ділянки (молекулярна маса 2000-3000 Да) мас-спектра, зображеного на Фіг. 1. Як показує хроматограма, Mab 5E8 зв'язує виявні кількості гепсидину-25 (Сигнал 1). Mab 5E8 не зв'язує виявних кількостей гепсидину-20 (молекулярна маса 2192 Да), гепсидину-22 (молекулярна маса 2436 Да), гепсидину-24 (молекулярна маса 2674 Да) або прогепсидину (молекулярна маса 6929 Да).

На Фіг. 5 зображена калібраційна крива для гепсидину-25, яку одержали шляхом послідовного розбавлення синтезованого гепсидину-25 (темні кола), розпочинаючи з концентрації 10 мкг/л (10 нг/мл), з проведенням імунологічного MSD сендвіч-аналізу, опис якого наведений у Прикладі 8. Імунологічний MSD сендвіч-аналіз був специфічним для гепсидину-25 і не розпізнавав гепсидину-20 (темні трикутники) або гепсидину-22 (світлі кола).

У цьому описі вжиті наведені нижче скорочення: ACN: ацетонітрил, BSA: бичачий сироватковий альбумін, DTT: дитіотреїтол, EDTA: етилендіамінтетраоцтова кислота, ELISA: твердофазний імуоферментний аналіз, IMAC: іммобілізована металоафінна хроматографія, IPTG: ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид, Mab: моноклональне антитіло, Mabs: моноклональні антитіла, MALDI-TOF: мас-спектрометрія з іонізацією методом лазерної десорбції у матричному розчині з часопротітним аналізатором, PBS: фосфатно-буферний фізіологічний розчин, SPR: поверхневий плазмонний резонанс, TEA: трифтороцтова кислота. Усі скорочення амінокислот, вжиті у цьому описі, є скороченнями, прийнятими Відомством з патентів і товарних знаків США, як наведено у § 1.822 (B)(2) 37 Кодексу законів США.

Цей винахід пропонує антитіла, які селективно зв'язують гепсидин-25 шляхом спрямованого зв'язування антигенної детермінанти, яка міститься у межах амінокислот від 1 до 7, включно, гепсидину-25. Такі антитіла є прийнятними для підвищення рівнів заліза у сироватці, кількості ретикулоцитів, кількості еритроцитів, рівнів гемоглобіну та/або гематокриту у людини для лікування захворювання, стану або розладу, наприклад, анемії. Окрім того, цей винахід пропонує способи застосування таких антитіл у відносно простих, однак високочутливих та селективних, імунологічних аналізах для виявлення та/або визначення рівнів гепсидину-25 у тканинах та біологічних рідинах ссавців.

Термін "гепсидин", при вживанні у цьому описі, означає будь-яку форму білка гепсидину, який, як відомо, є присутнім у організмі ссавців. Термін "зрілий гепсидин", при вживанні у цьому описі, означає будь-яку зрілу, біологічно активну, форму білка гепсидину, який експресується у організмі ссавців. Словосполучення "людський гепсидин", при вживанні у цьому описі, означає будь-яку форму білка гепсидину, який є присутнім у організмі людей. Словосполучення "людський гепсидин-25", при вживанні у цьому описі, означає зрілу форму людського гепсидину, який має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 1.

Загальна структура антитіла є добре відомою у цій галузі. У разі антитіла типу IgG, існує чотири амінокислотні ланцюги (два "важкі" ланцюги і два "легкі" ланцюги), які є поперечно зшитими за допомогою внутрішньоланцюгових та міжланцюгових дисульфідних зв'язків. У разі експресії у певних біологічних системах, антитіла, які мають немодифіковані послідовності людської Fc-ділянки, глікозилюються на згаданій Fc-ділянці. Антитіла можуть також глікозилюватись у інших положеннях. Субодичні структури та об'ємні конфігурації антитіл є добре відомими у цій галузі. Кожен важкий ланцюг містить N-кінцеву варіабельну ділянку важкого ланцюга ("HCVR") та константну ділянку важкого ланцюга ("HCCR"). Константна ділянка важкого ланцюга містить три домени (CH1, CH2 та CH3) у разі IgG, IgD та IgA; і 4 домени (CH1, CH2, CH3 та CH4) у разі IgM та IgE. Кожен легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (у цьому описі "LCVR") та константну ділянку легкого ланцюга ("LCCR").

Варіабельні ділянки кожної пари легкий/важкий ланцюг утворюють антигензв'язувальний центр антитіла. HCVR та LCVR можуть крім того підрозділятися на гіперваріабельні ділянки, які називають ділянками, що обумовлюють комплементарність (CDR), які чергуються з більш консервативними ділянками, які називають каркасними ділянками (FR). Кожна з HCVR та LCVR містить три CDR та чотири FR, які від амінокінця до карбоксильного кінця розміщуються таким чином: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. У цьому описі три CDR важкого ланцюга

позначені як "CDRH1, CDRH2 та CDRH3" і три CDR легкого ланцюга позначені як "CDRL1, CDRL2 та CDRL3". CDR містять більшість залишків, які забезпечують специфічні взаємодії з антигеном. Розподіл амінокислот до кожного домену відповідає добре відомим домовленостям (наприклад, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest, " National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Антитіла за цим винаходом можуть мати константну ділянку важкого ланцюга, вибрану з будь-якого класу імуноглобулінів (IgA, IgD, IgG, IgM та IgE). За варіантом, якому віддається перевага, антитіла за цим винаходом містять константну ділянку, яка походить з Fc-ділянки людського або мишачого IgG.

Термін "моноклональне антитіло" означає антитіло, яке походить з однієї копії або клону, у тому числі, наприклад, будь-якого еукаріотного, прокаріотного або фагового клону, а не спосіб, за допомогою якого воно продукується. За варіантом, якому віддається перевага, моноклональне антитіло за цим винаходом існує у однорідній або по суті однорідній популяції.

Антитіло за цим винаходом може бути інтактним, тобто містити повні або повномірні константні ділянки, у тому числі Fc-ділянку, або частиною чи фрагментом такого антитіла, за умови, що будь-яка скорочена форма містить антигензв'язувальну частину та зберігає антигензв'язувальну здатність. Такі скорочені форми включають, наприклад, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент або F(ab')₂-фрагмент, які містять CDR або варіабельні ділянки описаних селективних антитіл проти гепсидину-25. Окрім того, такі скорочені форми антитіла можуть бути одноланцюговим Fv-фрагментом, який можна одержати шляхом сполучення ДНК, яка кодує LCVR та HCVR, з лінкерною послідовністю. (Дивись, Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, crop. 269-315, 1994). Незалежно від того, чи є фрагменти або частини визначеними, термін "антитіло", який вживають у цьому описі, охоплює такі фрагменти або частини, а також одноланцюгові форми, якщо не зазначено інше. Доки частина білка або фрагмент білка зберігає здатність селективного зв'язування гепсидину-25 та нейтралізації однієї або декількох біологічних активностей, характерних для гепсидину-25 ссавців *in vivo* або *in vitro*, доти вона охоплюється визначенням терміну "антитіло".

Антитіла за цим винаходом можна одержати за допомогою методів, добре відомих у цій галузі, наприклад, за допомогою технології рекомбінантних ДНК, методу фагового дисплею, методів синтезу або комбінацій таких методів чи інших методів, широко відомих у цій галузі (дивись, наприклад, Jayasena S.D., Clin. Chem., 45:1628-1650 (1999) та Fellouse F.A., et al., J. Mol. Biol., 373(4):924-940 (2007)).

У наведених нижче Таблиці 1 та Таблиці 2 представлені CDR, яким віддається перевага, для антитіл за цим винаходом.

Таблиця 1

Fab	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Консенсусна 1	SASSSX ₁ SX ₂ MY (SEQ ID NO: 6)	LTSX ₃ LAS (SEQ ID NO: 7)	QQWSSX ₄ PPT (SEQ ID NO: 8)
4C11	SASSSVSYMY (SEQ ID NO: 9)	LTSN ₁ LAS (SEQ ID NO: 10)	QQWSSNPPT (SEQ ID NO: 11)
1G8	SASSAS ₁ MY (SEQ ID NO: 12)	LTSH ₁ LAS (SEQ ID NO: 13)	QQWSSGPPT (SEQ ID NO: 14)
1B4	SASPSVSYMY (SEQ ID NO: 45)	LTSH ₁ LAS (SEQ ID NO: 13)	QQWSSGPPT (SEQ ID NO: 14)
1E3	SASSAS ₁ MY (SEQ ID NO: 12)	LTSH ₁ LAS (SEQ ID NO: 13)	QQWSSGPPT (SEQ ID NO: 14)
3A9	SASSSVSSMY (SEQ ID NO: 15)	LTSN ₁ LAS (SEQ ID NO: 10)	QQWSSYPPT (SEQ ID NO: 16)
Консенсусна 2	KSSQSLLYX ₅ NGKTYLT (SEQ ID NO: 17)	LVSKLDX ₆ (SEQ ID NO: 18)	X ₇ QGSHPWX ₈ (SEQ ID NO: 19)
5E8	KSSQSLLYSNGKTYLT (SEQ ID NO: 20)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 21)	VQGSHPWT (SEQ ID NO: 22)
OB3	KSSQSLLYSNGKTYLT (SEQ ID NO: 20)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 21)	HQGSHPWT (SEQ ID NO: 23)
OB1	KSSQSLLYRNGKTYLT (SEQ ID NO: 24)	LVSKLDP (SEQ ID NO: 25)	HQGSHPWT (SEQ ID NO: 23)

Продовження таблиці 1

Fab	LCDR1	LCDR2	LCDR3
OH4	KSSQSLLYPNGKTYLT (SEQ ID NO: 26)	LVSKLDP (SEQ ID NO: 25)	IQGSHFPWT (SEQ ID NO: 27)
OE1	KSSQSLLYPNGKTYLT	LVSKLDP	FQGSHFPWV
Fab	LCDR1	LCDR2	LCDR3
	(SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 28)

*X₁ - V або A, X₂ - Y або S; X₃ - N або H, X₄ - N, G або Y; X₅ - S, R або P; X₆ - S або P; X₇ - V, H, I або F; X₈ - T або V.

5

Таблиця 2

Fab	HCDR1	HCDR2	HCDR3
Консенсусна	GX ₉ SLX ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ G X ₁₃ GX ₁₄ G (SEQ ID NO: 29)	HIWWN X ₁₅ X ₁₆ K X ₁₇ YNT X ₁₈ LKS (SEQ ID NO: 30)	I X ₁₉ YYG X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ GFAY (SEQ ID NO: 31)
4C11	GFSLSTYGIGVG (SEQ ID NO: 32)	HIWWNDNKS YNTALKS (SEQ ID NO: 33)	IGYYGSTSGFAY (SEQ ID NO: 34)
1G8	GYSLSSTPGIGVG (SEQ ID NO: 35)	HRVWNDAKSYNTALKS (SEQ ID NO: 36)	IGYYGSTAGFAY (SEQ ID NO: 37)
1B4	GYSLSSTPGIGVG (SEQ ID NO: 35)	HIWWNDAKSYNTALKS (SEQ ID NO: 36)	IGYYGSTAGFAY (SEQ ID NO: 37)
1E3	GLSLSTPGIGVG (SEQ ID NO: 38)	HIWWNDAKSYNTALKS (SEQ ID NO: 36)	IGYYGSTAGFAY (SEQ ID NO: 37)
3A9	GFSLNSYGFVG (SEQ ID NO: 39)	HIWWNGNKYYNTTLKS (SEQ ID NO: 40)	IHYGNSYGFAY (SEQ ID NO: 41)
Консенсусна 2	GFAFSSYDMS (SEQ ID NO: 42)	TIISGGTYTYPPDSVKG (SEQ ID NO: 43)	DGYIH (SEQ ID NO: 44)
5E8	GFAFSSYDMS (SEQ ID NO: 42)	TIISGGTYTYPPDSVKG (SEQ ID NO: 43)	DGYIH (SEQ ID NO: 44)
OB3	GFAFSSYDMS (SEQ ID NO: 42)	TIISGGTYTYPPDSVKG (SEQ ID NO: 43)	DGYIH (SEQ ID NO: 44)
OB1	GFAFSSYDMS (SEQ ID NO: 42)	TIISGGTYTYPPDSVKG (SEQ ID NO: 43)	DGYIH (SEQ ID NO: 44)
OH4	GFAFSSYDMS (SEQ ID NO: 42)	TIISGGTYTYPPDSVKG (SEQ ID NO: 43)	DGYIH (SEQ ID NO: 44)
OE1	GFAFSSYDMS (SEQ ID NO: 42)	TIISGGTYTYPPDSVKG (SEQ ID NO: 43)	DGYIH (SEQ ID NO: 44)

* X₉ - F, Y або L; X₁₀ - S або N, X₁₁ - T або S; X₁₂ - Y або P, X₁₃ - I або F; X₁₄ - V або I; X₁₅ - D або G; X₁₆ - A або N; X₁₇ - S або Y; X₁₈ - A або T; X₁₉ - G або H; X₂₀ - S або N; X₂₁ - T або S; X₂₂ - S, A або Y.

10

Цей винахід включає (але без обмеження ними) антитіла, які містять: а) варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить:

- i) LCDR1, яка має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яку складають послідовності SEQ ID NO: 6, 9, 12, 45, 15, 17, 20, 24 та 26;
- ii) LCDR2, яка має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яку складають послідовності SEQ ID NO: 7, 10, 13, 18, 21 та 25; та
- iii) LCDR3, яка має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яку складають послідовності SEQ ID NO: 8, 11, 14, 16, 19, 22, 23, 17 та 28; та

b) варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить:

- i) HCDR1, яка має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яку складають послідовності SEQ ID NO: 29, 32, 35, 38, 39 та 42;
- ii) HCDR2, яка має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яку складають послідовності SEQ ID NO: 30, 33, 36, 40 та 43; та

послідовність SEQ ID NO: 58. Антитіло за цим винаходом, якому віддається найбільша перевага, містить LCVR, яка має послідовність SEQ ID NO: 48, та HCVR, яка має послідовність SEQ ID NO: 49. Інше антитіло за цим винаходом, якому віддається найбільша перевага, містить LCVR, яка має послідовність SEQ ID NO: 55, та HCVR, яка має послідовність SEQ ID NO: 56.

5 Такі LCVR, за варіантом, якому віддається перевага, є зв'язаними з константною ділянкою легкого ланцюга або важкого ланцюга.

Моноклональні антитіла за цим винаходом, яким віддається перевага, позначені у цьому описі як 4C11, 1G8, 1B4, 1E3, 3A9, 2, 5E8, OB3, OB1, OH4 та OE1. Амінокислотні послідовності SEQ ID NO, які кодують Mabs 4C11, 1G8, 1B4, 1E3, 3A9, 5E8, OB3, OB1, OH4, OE1, 3.12, 3.23

10 та/або різні їх фрагменти, подані у наведеній нижче Таблиці 3.

Таблиця 3

Mab	LC	HC	LC VR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3	HC VR	HCD R1	HCD R2	HCD R3
Консенсусна 1	64	65	46	6	7	8	47	29	30	31
4C11	66	67	48	9	10	11	49	32	33	34
1G8	68	69	50	12	13	14	51	35	36	37
1B4	70	69	52	45	13	14	51	35	36	37
1E3	71	72	53	12	13	14	54	38	36	37
3A9	73	74	55	15	10	16	56	39	40	41
Консенсусна 2	75	76	57	17	18	19	58	42	43	44
5E8	77	76	59	20	21	22	58	42	43	44
OB3	78	76	60	20	21	23	58	42	43	44
OB1	79	76	61	24	25	23	58	42	43	44
OH4	80	76	62	26	25	27	58	42	43	44
OE1	81	76	63	26	25	28	58	42	43	44
3.23	82	83								
3.12	84	85								

Термін "антигенна детермінанта" означає ту частину молекули, яка може розпізнаватись та зв'язуватись антитілом на одному або декількох антигензв'язувальних центрах антитіла. Антигенні детермінанти, як правило, складаються з хімічно активних поверхневих угруповань молекул, таких як амінокислоти або бічні ланцюги цукрів, і, як правило, мають специфічні об'ємні структурні характеристики, а також специфічні зарядові характеристики. За варіантом, якому віддається перевага, антитіла за цим винаходом зв'язуються з антигенною детермінантою на N-кінці зрілого гепсидину. За варіантом, якому віддається більша перевага, антитіла за цим винаходом зв'язуються з антигенною детермінантою, яка міститься у межах амінокислот гепсидину-25 з 1 до 7, включно. За варіантом, якому віддається більша перевага, антитіла за цим винаходом зв'язуються з N-кінцем людського гепсидину-25. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, антитіла за цим винаходом зв'язуються з антигенною детермінантою, яка міститься у межах амінокислот людського гепсидину-25 з 1 до 7, включно. За варіантом, якому віддається найбільша перевага, антитіла за цим винаходом зв'язуються з антигенною детермінантою, яка міститься у межах амінокислот DTHFPIC послідовності SEQ ID NO: 1.

Термін "зв'язувальна спорідненість (K_D)", вжитий у цьому описі, означає швидкість дисоціації конкретної взаємодії антиген-антитіло. K_D являє собою відношення швидкості дисоціації, яку також називають "константою дисоціації (k_{off})", до швидкості асоціації або "константи асоціації (k_{on})". Таким чином, K_D дорівнює k_{off}/k_{on} і виражається як молярна концентрація (M). З цього випливає, що чим меншим є значення K_D , тим сильнішою є спорідненість до зв'язування. Таким чином, $K_D=1$ мкМ означає більш слабку зв'язувальну спорідненість порівняно з $K_D=1$ нМ. Значення K_D можна одержати за методиками, відомими у цій галузі.

Термін "селективне", вжитий у цьому описі відносно антитіла проти гепсидину-25 за цим винаходом, означає антитіло, яке зв'язує гепсидин-25 зі значенням K_D поприблизно у 1000, 500, 200, 100, 50, 10 разів або поприблизно у 5 разів нижчим за значення, з яким антитіло зв'язує щонайменше одну форму-попередник гепсидину-25 та/або щонайменше одну скорочену на N-кінці форму гепсидину-25, яка є присутньою у того самого виду ссавців, як визначається засобами SPR при температурі 25 °C. На додаток до цього або альтернативно селективне антитіло проти гепсидину-25 за цим винаходом зв'язується з гепсидином-25, але не зв'язується або лише мінімально зв'язується із щонайменше однією формою-попередником гепсидину-25

та/або щонайменше однією скороченою на N-кінці формою гепсидину-25, яка є присутньою у того самого виду ссавців, у разі проведення аналізу методами імунологічного аналізу та/або мас-спектрометрії MALDI-TOF, опис яких наведено у Прикладах 4-8, поданих нижче. За варіантом, якому віддається перевага, формою-попередником гепсидину-25 є прогепсидин, за варіантом, якому віддається більша перевага, людський прогепсидин і за варіантом, якому віддається найбільша перевага, людський прогепсидин, який містить амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 90. За варіантом, якому віддається перевага, скороченою на N-кінці формою гепсидину-25 є людський гепсидин-20 (тобто амінокислоти 6-25 послідовності SEQ ID NO: 1) або людський гепсидин-22 (амінокислоти 4-25 послідовності SEQ ID NO: 1).

Термін "виявляти" або "виявлення" вжитий у найширшому значенні з включенням кількісних, напівкількісних або якісних визначень молекули-мішені. За одним з аспектів цього винаходу методи, опис яких наведено у цій заявці, можуть лише визначати присутність або відсутність конкретного поліпептиду гепсидину у біологічному зразку, і, таким чином, поліпептид гепсидин є виявним або, альтернативно, невиявним у зразку у разі аналізування за допомогою згаданого методу.

Термін "біологічна активність" щодо антитіла за цим винаходом охоплює (але без обмеження) спорідненість до зв'язування антигенної детермінанти або антигензв'язувальну спорідненість, *in vivo* та/або *in vitro* стабільність антитіла, імуногенні властивості антитіла, наприклад, у разі введення людині, та/або здатність нейтралізувати або антагонізувати біологічну активність гепсидину-25, *in vivo* або *in vitro*, у тому числі (але без обмеження) пригнічення порушення регуляції рівнів заліза у сироватці на тваринній моделі запалення, наприклад, у разі контрольного аналізу запалення, індукованого IL-6. Вищезгадані властивості або характеристики можна спостерігати або вимірювати за допомогою визнаних у цій галузі методів, у тому числі (але без обмеження) сцинтиляційного аналізу із застосуванням МІПів (молекулярно-імпринтованих полімерів), ELISA (твердофазний імуоферментний аналіз), імунологічного аналізу за допомогою аналізатора ORIGIN (компанія IGEN), аналізу гасіння флуоресценції, ELISA з гасінням флуоресценції, конкурентного ELISA, поверхневого плазмонного резонансу (SPR), у тому числі (але без обмеження) SPR із застосуванням біосенсора BIAcore, аналізів нейтралізації *in vitro* та *in vivo* без обмеження (дивись, наприклад, WO 2006/062685).

Термін "біологічна активність" відносно гепсидину охоплює (але без обмеження) специфічне зв'язування гепсидину з іншим білком, у тому числі (але без обмеження) з його рецептором феропортином, одну або декілька феропортин-опосередкованих функцій гепсидину, наприклад, індуковану гепсидином інтерналізацію та/або деградацію феропортину (дивись, наприклад, Nemeth E., et al., *Hepcidin Regulates Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization*, Science 306, 2090-2093, (2004)), регуляцію гепсидином опосередкованого феропортином відтоку заліза, індуковане гепсидином зниження рівнів заліза у сироватці, кількості ретикулоцитів, кількості еритроцитів, рівнів гемоглобіну та/або гематокриту у людини, стабільність білків, тобто вплив гепсидину на рівні або активність іншого білка *in vivo* або *in vitro*, та рівні експресії та/або тканинного розподілу гепсидину.

Термін "пригнічувати" або "нейтралізувати", вжитий у цьому описі відносно біологічної активності антитіла за цим винаходом, означає здатність антитіла значною мірою антагонізувати, забороняти, запобігати, стримувати, уповільнювати, порушувати, ліквідувати, зупиняти, зменшувати або спричинювати зворотний розвиток біологічної активності гепсидину, у тому числі (але без обмеження) біологічної активності людського, пацієнтського або мишачого гепсидину-25.

Терміни "суб'єкт" та "пацієнт", які взаємозамінно вживають у цьому описі, означають ссавця, за варіантом, якому віддається перевага, людину. У певних варіантах здійснення цього винаходу пацієнт має захворювання, розлад або стан, сприятливим для якого було б зниження рівня гепсидину, зниження біологічної активності гепсидину та/або підвищення рівня заліза у сироватці, кількості ретикулоцитів, кількості еритроцитів, рівнів гемоглобіну та/або гематокриту.

Словосполучення "специфічно зв'язує", вжите у цьому описі стосовно утворення зв'язку між антитілом та поліпептидом гепсидином, означає, що антитіло зв'язує поліпептид гепсидин зі значенням K_D меншим ніж приблизно 500 нМ, при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C.

За одним із варіантів здійснення антитіла за цим винаходом має значення K_D для людського гепсидину-25 (послідовність SEQ ID NO: 1) менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, менше ніж приблизно 1 нМ або менше ніж приблизно 800 пМ, при визначенні засобами SPR при

температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається перевага, антитіло за цим винаходом також специфічно зв'язує щонайменше один зрілий поліпептид гепсидин ссавця нелюдського виду при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається більша перевага, згадане антитіло також специфічно зв'язує щонайменше один поліпептид гепсидин-25, вибраний з групи, яку складають мишачий гепсидин-25, пацючий гепсидин-25 та гепсидин-25 макак-крабоїців (послідовності SEQ ID NO: 3, 2 та 4, відповідно), при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане антитіло також специфічно зв'язує гепсидин-25 макак-крабоїців (послідовність SEQ ID NO: 4) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане антитіло також специфічно зв'язує мишачий та/або пацючий гепсидин-25 (послідовності SEQ ID NO: 3 та 2, відповідно) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C.

За одним із варіантів здійснення антитіло за цим винаходом має значення K_D для людського гепсидину-25 (послідовність SEQ ID NO: 1) менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, менше ніж приблизно 1 нМ або менше ніж приблизно 800 пМ при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C, та i) згадане антитіло має значення K_D для людського прогепсидину, людського гепсидину-20 (послідовність SEQ ID NO: 88) або людського гепсидину-22 (послідовність SEQ ID NO: 89), яке є у щонайменше приблизно 200, приблизно 100, приблизно 50, приблизно 10 або приблизно 5 разів вищим при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C або ii) зв'язування згаданого антитіла з людським прогепсидином, людським гепсидином-20 (послідовність SEQ ID NO: 88) або людським гепсидином-22 (послідовність SEQ ID NO: 89) не виявляється або мінімально виявляється методом імунологічного аналізу та/або методом мас-спектрометрії MALDI-TOF, опис яких наведений у Прикладах 4-7. За варіантом, якому віддається перевага, згадане антитіло також специфічно зв'язує щонайменше один зрілий поліпептид гепсидин ссавця нелюдського виду при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається більша перевага, згадане антитіло також специфічно зв'язує щонайменше один поліпептид гепсидин-25, вибраний з групи, до складу якої входить мишачий гепсидин-25, пацючий гепсидин-25 та гепсидин-25 макак-крабоїдів (послідовності SEQ ID NO: 3, 2 та 4, відповідно) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане антитіло також специфічно зв'язує гепсидин-25 макак-крабоїдів (послідовність SEQ ID NO: 4) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане антитіло також специфічно зв'язує мишачий та/або пацючий гепсидин-25 (послідовності SEQ ID NO: 2 та 3, відповідно) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C.

За іншим варіантом здійснення антитіло за цим винаходом має значення K_D для людського гепсидину-25 (послідовність SEQ ID NO: 1) від приблизно 100 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до приблизно 1 нМ при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C, та i) згадане антитіло має значення K_D для людського прогепсидину, людського гепсидину-20 (послідовність SEQ ID NO: 88) або людського гепсидину-22 (послідовність SEQ ID NO: 89), яке є у щонайменше приблизно 200, приблизно 100, приблизно 50, приблизно 10 або приблизно 5 разів вищим при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C або ii) зв'язування згаданого антитіла з людським прогепсидином, людським гепсидином-20 (послідовність SEQ ID NO: 88) або людським гепсидином-22 (послідовність SEQ ID NO: 89) не виявляється або мінімально виявляється методом імунологічного аналізу та/або методом мас-спектрометрії MALDI-TOF, опис яких наведений у Прикладах 4-7. За варіантом, якому віддається перевага, згадане антитіло також специфічно зв'язує щонайменше один зрілий поліпептид гепсидин ссавця нелюдського виду при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається більша перевага, згадане антитіло також специфічно зв'язує щонайменше один поліпептид гепсидин-25, вибраний з групи, яку складають мишачий гепсидин-25, пацючий гепсидин-25 та гепсидин-25 макак-крабоїдів (послідовності SEQ ID NO: 3, 2 та 4, відповідно), при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане антитіло також специфічно зв'язує гепсидин-25 макак-крабоїдів (послідовність SEQ ID NO: 4) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане антитіло також специфічно зв'язує мишачий та/або пацючий гепсидин-25 (послідовності SEQ ID NO: 2 та 3, відповідно) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C.

За одним з варіантів здійснення антитіло за цим винаходом має значення K_D для людського гепсидину-25 (послідовність SEQ ID NO: 1) менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно

50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, менше ніж приблизно 1 нМ або менше ніж приблизно 800 пМ при визначенні засобами SPR при температурі 25 °С. За варіантом, якому віддається перевага, антитіло за цим винаходом також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до приблизно 1 нМ для щонайменше одного зрілого поліпептиду гепсидину ссавця нелюдського виду при визначенні засобами SPR при температурі 25 °С. За варіантом, якому віддається більша перевага, згадане антитіло також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до 1 нМ для щонайменше одного поліпептиду гепсидину-25, вибраного з групи, яку складають мишачий гепсидин-25, пацючий гепсидин-25 та гепсидин-25 макак-крабоїдів (послідовності SEQ ID NO: 3, 2 та 4, відповідно), при визначенні засобами SPR при температурі 25 °С. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане антитіло також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до 1 нМ для гепсидину-25 макак-крабоїдів (послідовність SEQ ID NO: 4) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °С. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане антитіло також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до 1 нМ для мишачого та/або пацючого гепсидину-25 (послідовності SEQ ID NO: 3 та 2, відповідно) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °С.

За іншим варіантом здійснення, антитіло за цим винаходом має значення K_D для людського гепсидину-25 (послідовність SEQ ID NO: 1) від приблизно 100 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до 1 нМ при визначенні засобами SPR при температурі 25 °С. За варіантом, якому віддається перевага, антитіло за цим винаходом також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до приблизно 1 нМ для щонайменше одного поліпептиду гепсидину ссавця нелюдського виду при визначенні засобами SPR при температурі 25 °С. За варіантом, якому віддається більша перевага, згадане антитіло також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до 1 нМ для щонайменше одного поліпептиду гепсидину-25, вибраного з групи, яку складають мишачий гепсидин-25, пацючий гепсидин-25 та гепсидин-25 макак-крабоїдів (послідовності SEQ ID NO: 3, 2 та 4, відповідно), при визначенні засобами SPR при температурі 25 °С. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане антитіло також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до 1 нМ для гепсидину-25 макак-крабоїдів (послідовність SEQ ID NO: 4) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °С. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане антитіло також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до 1 нМ для мишачого та/або пацючого гепсидину-25 (послідовності SEQ ID NO: 3 та 2, відповідно) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °С.

За одним з варіантів здійснення антитіло за цим винаходом має значення K_D для людського гепсидину-25 (послідовність SEQ ID NO: 1) менше ніж приблизно 100 нМ, менше ніж приблизно 50 нМ, менше ніж приблизно 25 нМ, менше ніж приблизно 10 нМ, менше ніж приблизно 5 нМ, менше ніж приблизно 1 нМ або менше ніж приблизно 800 пМ при визначенні засобами SPR при температурі 25 °С, та i) згадане антитіло має значення K_D для людського прогепсидину, людського гепсидину-20 (послідовність SEQ ID NO: 88) або людського гепсидину-22 (послідовність SEQ ID NO: 89), яке є у щонайменше приблизно 200, приблизно 100, приблизно 50, приблизно 10 або приблизно 5 разів вищим при визначенні засобами SPR при температурі 25 °С або ii) зв'язування згаданого антитіла з людським прогепсидином, людським гепсидином-20 (послідовність SEQ ID NO: 88) або людським гепсидином-22 (послідовність SEQ ID NO: 89) не виявляється або мінімально виявляється методом імунологічного аналізу та/або методом мас-спектрометрії MALDI-TOF, опис яких наведений у Прикладах 4-7. За варіантом, якому віддається перевага, згадане антитіло також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 пМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до приблизно 1 нМ для щонайменше одного зрілого поліпептиду гепсидину ссавця нелюдського виду при визначенні засобами SPR при температурі

25 °C. За варіантом, якому віддається більша перевага, згадане антитіло також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до 1 нМ для щонайменше одного поліпептиду гепсидину-25, вибраного з групи, яку складають мишачий гепсидин-25, пацючий гепсидин-25 та гепсидин-25 макак-крабоїдів (послідовності SEQ ID NO: 3, 2 та 4, відповідно), при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане антитіло також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до 1 нМ для гепсидину-25 макак-крабоїдів (послідовність SEQ ID NO: 4) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане антитіло також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до 1 нМ для мишачого та/або пацючого гепсидину-25 (послідовності SEQ ID NO: 3 та 2, відповідно) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C.

За іншим варіантом здійснення антитіло за цим винаходом має значення K_D для людського гепсидину-25 (послідовність SEQ ID NO: 1) від приблизно 100 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до приблизно 1 нМ при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C, та i) згадане антитіло має значення K_D для людського прогепсидину, людського гепсидину-20 (послідовність SEQ ID NO: 88) або людського гепсидину-22 (послідовність SEQ ID NO: 89), яке є у щонайменше приблизно 200, приблизно 100, приблизно 50, приблизно 10 або приблизно 5 разів вищим при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C або ii) зв'язування згаданого антитіла з людським прогепсидином, людським гепсидином-20 (послідовність SEQ ID NO: 88) або людським гепсидином-22 (послідовність SEQ ID NO: 89) не виявляється або мінімально виявляється методом імунологічного аналізу та/або методом мас-спектрометрії MALDI-TOF, опис яких наведений у Прикладах 4-7. За варіантом, якому віддається перевага, згадане антитіло також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до приблизно 1 нМ для щонайменше одного зрілого поліпептиду гепсидину ссавця нелюдського виду при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається більша перевага, згадане антитіло також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до 1 нМ для щонайменше одного поліпептиду гепсидину-25, вибраного з групи, яку складають мишачий гепсидин-25, пацючий гепсидин-25 та гепсидин-25 макак-крабоїдів (послідовності SEQ ID NO: 3, 2 та 4, відповідно), при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане антитіло також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до 1 нМ для гепсидину-25 макак-крабоїдів (послідовність SEQ ID NO: 4) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане антитіло також має значення K_D від приблизно 100 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 800 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 1 нМ або від приблизно 35 нМ до 1 нМ для мишачого та/або пацючого гепсидину-25 (послідовності SEQ ID NO: 3 та 2, відповідно) при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C.

Експресія антитіла

Для одержання рекомбінантного вектора експресії, трансфікування клітин-хазяїв, вибору трансформантів, ізолювання ліній клітин-хазяїв, які продукують антитіло за цим винаходом, культивування цих клітин-хазяїв та виділення антитіла з культурального середовища, застосовують стандартні методи молекулярної біології.

Цей винахід спрямований також на клітини-хазяї, які експресують антитіло проти гепсидину за цим винаходом. Для експресії антитіла за цим винаходом можуть застосовуватись найрізноманітніші системи експресії клітин-хазяїв, відомі у цій галузі, у тому числі прокаріотні (бактеріальні) та еукаріотні системи експресії (такі як дріжджі, бакуловірус, клітини рослин, ссавців та інших тварин, трансгенні тварини та клітини-гібридами), а також системи експресії фагового дисплею.

Антитіло за цим винаходом можна одержати шляхом рекомбінантної експресії генів легких та важких ланцюгів імуноглобуліну у клітині-хазяїні. Для рекомбінантної експресії антитіла, клітину-хазяїна трансформують, трансдукують, інфікують тощо одним або декількома рекомбінантними векторами експресії, які несуть фрагменти ДНК, які кодують легкі та/або важкі імуноглобулінові ланцюги антитіла, так що легкі та/або важкі ланцюги експресуються клітиною-

хазяїном. Важкий ланцюг і легкий ланцюг можуть експресуватись незалежно від різних промоторів, з якими вони є функціонально зв'язаними у одному векторі, або альтернативно важкий ланцюг і легкий ланцюг можуть експресуватись незалежно від різних промоторів, з якими вони є функціонально зв'язаними у двох векторах - один з яких експресує важкий ланцюг і

5 один експресує легкий ланцюг. Факультативно важкий ланцюг і легкий ланцюг можуть експресуватись у різних клітинах-хазяях.

Клітини-хазяї можуть також застосовуватись для продукування частин або фрагментів інтактних антитіл, наприклад, Fab-фрагментів або молекул scFv, традиційними методами. Наприклад, може виникнути необхідність трансфікування клітини-хазяїна ДНК, яка кодує легкий ланцюг або важкий ланцюг антитіла за цим винаходом. Технологія рекомбінантних ДНК може також застосовуватись для видалення певної частини або усієї ДНК, яка кодує будь-який з або обидва легкий та важкий ланцюги, яка не є необхідною для зв'язування з людським гепсидином-25. Молекули, експресовані такими скороченими молекулами ДНК, також охоплюються антитілами за цим винаходом.

15 Цей винахід пропонує клітину-хазяїна, яка містить нуклеїновокислотну молекулу за цим винаходом. За варіантом, якому віддається перевага, клітина-хазяїн за цим винаходом містить один або декілька векторів або генно-інженерних конструкцій, які містять нуклеїновокислотну молекулу за цим винаходом. Наприклад, клітиною-хазяїном за цим винаходом є клітина, до якої було введено вектор за цим винаходом, де згаданий вектор містить полінуклеотид, який кодує

20 LCVR антитіла за цим винаходом, та/або полінуклеотид, який кодує HCVR антитіла за цим винаходом. Цей винахід пропонує також клітину-хазяїна, до якої було введено два вектори за цим винаходом; один містить полінуклеотид, який кодує LCVR антитіла за цим винаходом, і один містить полінуклеотид, який кодує HCVR, наявні у антитіла за цим винаходом, кожен з яких є функціонально зв'язаним з енхансерним/промоторним регуляторними елементами (які були одержані, наприклад, з мавпячого вірусу SV40, цитомегаловірусу (CMV), аденовірусу тощо, наприклад, CMV енхансерний/AdMLP (головний пізній промотор аденовірусу) промоторний регуляторний елемент або SV40 енхансерний/AdMLP промоторний регуляторний елемент) для стимулювання високих рівнів транскрипції генів.

Після завершення експресії інтактні антитіла, окремі легкі та важкі ланцюги або інші форми імуноглобулінів за цим винаходом можуть бути очищені за стандартними методами у цій галузі, у тому числі фракціонуванням сульфатом амонію, іонообмінним хроматографуванням, афінним (наприклад, білок А) хроматографуванням, хроматографуванням з оберненою фазою, гідрофобним хроматографуванням, хроматографуванням на колонці з гідроксилапатитом, гелелектрофорезом тощо. Перевагу для фармацевтичних варіантів застосування віддають по суті чистому імуноглобуліну із щонайменше приблизно 90 %, приблизно 92 %, приблизно 94 % або приблизно 96 % однорідністю, і найбільшу перевагу віддають імуноглобуліну з приблизно 98-99 % однорідністю. Після завершення очищення, часткового або до необхідного ступеня однорідності, стерильні антитіла можна застосовувати з терапевтичними цілями, зазначеними у цьому описі.

40 Людське генно-інженерне антитіло

За варіантом, якому віддається перевага, антитіло за цим винаходом, призначене для застосування з терапевтичними цілями, має послідовність каркасної та константної ділянки (тією мірою, у якій вони існують у антитілі), яку одержали від людини для зменшення ймовірності того, що згадане антитіло буде викликати імунну реакцію. Людські генно-інженерні антитіла становлять особливий інтерес, оскільки вони є цінними для терапевтичного застосування і зменшують ймовірність утворення людських антитіл проти мишачого антигену, що часто спостерігається у разі антитіл мишачого походження або антитіл, які містять складові частини мишачого походження, у разі введення людині. За варіантом, якому віддається перевага, введені людські генно-інженерні антитіла можуть мати період напіввиведення, що

50 більше нагадує період напіввиведення природних людських антитіл, на відміну, наприклад, від мишачих антитіл, що надає можливість введення суб'єкту менших доз та з меншою частотою.

Словосполучення "людські генно-інженерні антитіла", вжите у цьому описі, означає антитіло, щонайменше одна частина якого має людське походження. Наприклад, людське генно-інженерне антитіло може містити складові частини, які були одержані з антитіла нелюдського походження, наприклад, мишачого, та складові частини, які були одержані з антитіла людського походження, з'єднані між собою, наприклад, хімічним шляхом за допомогою традиційних методів (наприклад, синтетичних) або одержані у вигляді безперервного поліпептиду методами генної інженерії.

За варіантом, якому віддається перевага, "людське генно-інженерне антитіло" має CDR, які

60 походять з або які одержують з вихідного антитіла, тобто нелюдського антитіла, за варіантом,

якому віддається перевага, мишачого Mab або його фрагмента, наприклад, мишачого Fab 4C11, у той час як каркасна та константна ділянка, тією мірою, у якій вона є присутньою (або значна чи суттєва її частина, тобто щонайменше приблизно 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %), кодуються інформацією про нуклеїновокислотну послідовність, яка знаходиться на людській зародковій імуноглобуліновій ділянці (дивись, наприклад, International ImMunoGeneTics Database) або у її рекомбінованій або мутованій формах, незалежно від того, продукуються чи ні згадані антитіла у людській клітині. За варіантом, якому віддається перевага, щонайменше дві, три, чотири, п'ять або шість CDRs людського генно-інженерного антитіла оптимізуються з CDRs нелюдського вихідного антитіла, з якого одержали людське генно-інженерне антитіло, для одержання необхідної властивості, наприклад, поліпшеної специфічності, афінності або нейтралізації, яка може бути ідентифікована за допомогою відбіркового аналізу, наприклад, ELISA. За варіантом, якому віддається перевага, оптимізована CDR у антитілі за цим винаходом містить щонайменше одну заміну амінокислотного залишку, порівняно з CDR, присутньою у вихідному мишачому Fab 4C11, 3A9 або 5E8. Певні заміни амінокислотних залишків у CDRs людських генно-інженерних антитіл за цим винаходом, порівняно з CDRs вихідного мишачого Fab 4C11, 3A9 або 5E8, зменшують ймовірність нестабільності антитіла (наприклад, видалення одного або декількох Asn залишків CDR) або зменшують ймовірність імуногенності антитіла у разі введення людині (наприклад, як прогнозується технологією IMMUNOFILTER™ (компанія Xencor, Inc., Monrovia, штат Каліфорнія).

Людські генно-інженерні антитіла за варіантом, якому віддається перевага, містять мінімальну послідовність, яку одержують із нелюдського антитіла. Людські генно-інженерні антитіла можуть містити залишки, які є відсутніми як у антитіла-реципієнта, так і у послідовностях CDR або каркасної ділянки, імпортованих з вихідного антитіла. Людські генно-інженерні антитіла можна піддавати *in vitro* мутагенезу за методами повсякденного застосування у цій галузі і, тому, амінокислотні послідовності каркасних ділянок HCVR та LCVR людських генно-інженерних рекомбінантних антитіл є послідовностями, які, у разі одержання з цих споріднених із людськими зародковими послідовностями HCVR та LCVR, можуть не існувати за природних умов у межах людського зародкового репертуару антитіл *in vivo*. Передбачається, що такі амінокислотні послідовності каркасних ділянок HCVR та LCVR людських генно-інженерних рекомбінантних антитіл є на щонайменше приблизно 85 %, приблизно 90 %, приблизно 92 %, приблизно 94 %, приблизно 95 %, приблизно 96 %, приблизно 98 %, за варіантом, якому віддається більша перевага, щонайменше на приблизно 99 % або за варіантом, якому віддається найбільша перевага, 100 % ідентичними людській зародковій послідовності.

У варіантах здійснення, яким віддається перевага, людське генно-інженерне антитіло за цим винаходом містить людські зародкові каркасні послідовності легкого ланцюга та людські зародкові каркасні послідовності важкого ланцюга (дивись, наприклад, WO 2005/005604).

У цій галузі доступними є численні методи одержання людських генно-інженерних антитіл (дивись, наприклад, WO2006/06046935; Queen, et al., Proc. Natl. Acad. Set USA 88:2869 (1991); Jones et al., Nature, 321:522 (1986); Riechmann, et al., Nature, 332:323-327 (1988); та Verhoeven, et al., Science, 239:1534 (1988)). Наприклад, людські генно-інженерні антитіла можна продукувати шляхом одержання нуклеїновокислотних послідовностей, які кодують HCVR та LCVR вихідного антитіла (наприклад, мишачого антитіла або антитіла, що продукується гібридомою), яке селективно зв'язує гепсидин-25, ідентифікування CDRs у згаданих HCVR та LCVR (нелюдських), і пересадження таких CDR-кодувальних нуклеїновокислотних послідовностей на вибрані людські нуклеїновокислотні послідовності, які кодують каркасні ділянки. Факультативно CDR може бути оптимізована шляхом довільного мутагенезу або мутагенезу у конкретних положеннях з метою заміни однієї або декількох амінокислот CDR іншою амінокислотою перед пересадженням CDR на каркасну ділянку. Альтернативно CDR може бути оптимізована після введення до людської каркасної ділянки за допомогою методів, доступних фахівцю у цій галузі.

Після пересадження CDR-кодувальних послідовностей на вибрані людські послідовності, які кодують каркасні ділянки, одержані послідовності ДНК, які кодують людські генно-інженерні послідовності варіабельних ділянок важкого ланцюга та варіабельних ділянок легкого ланцюга, експресують з одержанням людського генно-інженерного антитіла, яке зв'язує гепсидин-25. Людські генно-інженерні HCVR та LCVR можуть експресуватись як частина цілої молекули антитіла проти гепсидину-25, тобто як гібридний білок з людськими послідовностями константного домену. Однак послідовності HCVR та LCVR можуть також експресуватись за відсутності послідовностей константних ділянок з одержанням, наприклад, людського генно-

інженерного Fv або Fab проти гепсидину-25 (дивись, наприклад, Watkins J., et al., Anal. Biochem. 253:37-45 (1997) та Watkins J., et al., Anal. Biochem. 256:169-177, (1998)).

Варіанти діагностичного застосування

Антитіла за цим винаходом являють собою засіб точного виявлення або визначення кількості гепсидину-25 у тканині або біологічній рідині для оцінювання схильності до захворювань та станів, стимульованих гепсидином-25, та для виявлення і діагностування таких захворювань та станів у пацієнтів, які страждають на них. Наприклад, селективні антитіла проти гепсидину-25 за цим винаходом можуть бути введені до складу чутливих і надійних імунологічних аналізів, таких як ELISA, RIA (радіоімунологічний аналіз), імунодифузійних аналізів або імунодетекторних аналізів, таких як SPR. Подібним чином, селективні антитіла проти гепсидину-25 за цим винаходом є також прийнятними для імуногістохімічних (IHC) та імунофлуоресцентних (IF) аналізів зразків тканин або біологічних рідин. Такі аналізи можуть застосовуватись для виявлення рівнів гепсидину-25, які відхиляються від норми, і, таким чином, діагностування захворювань та станів, які стимулюються гепсидином-25. Конкретніше, цей винахід пропонує способи діагностування у пацієнта захворювання або стану, пов'язаного з гепсидином-25, шляхом визначення рівня гепсидину-25 у зразку тканини або біологічній рідині від згаданого пацієнта та порівняння рівня гепсидину-25 у згаданому зразку з рівнем гепсидину-25 у відповідному зразку від одного або декількох контрольних індивідумів або з еталонним стандартом, з виявленням, тим самим, хворобливого стану, пов'язаного з рівнем гепсидину-25, який відхиляється від норми. Згаданий хворобливий стан може являти собою одне або декілька генетичних або негенетичних захворювань, пов'язаних зі зниженими рівнями заліза у сироватці, кількістю ретикулоцитів, кількістю еритроцитів, рівнями гемоглобіну та/або гематокриту. За варіантом, якому віддається перевага, згаданий хворобливий стан може являти собою одне або декілька генетичних або негенетичних захворювань, пов'язаних з анемією.

Пропонується також спосіб моніторингу у пацієнта захворювання або стану, пов'язаного з гепсидином-25. Згаданий спосіб включає визначення рівня гепсидину-25 у зразку тканини або біологічній рідині від пацієнта, який страждає на або знаходиться під загрозою виникнення захворювання або стану, пов'язаного з гепсидином-25, у перший момент часу; визначення рівня гепсидину-25 у одному або декількох зразках тканини або біологічній рідині від згаданого пацієнта в один або декілька різних моментів часу; порівняння рівнів гепсидину-25, визначених у різні моменти часу, і, тим самим, здійснення моніторингу захворювання або стану, що стимулюється гепсидином-25.

Селективні антитіла проти гепсидину-25 за цим винаходом є особливо прийнятними для застосування у високопродуктивних методах. До таких методів належать методи із застосуванням біочипів, завдяки чому багато зразків можуть випробуватись на мікропланшеті або предметному склі чи інших відомих у цій галузі засобах для розміщення досліджуваних культур.

Присутність гепсидину-25 або його рівні у біологічному зразку можна встановити шляхом об'єднання згаданого біологічного зразка з, наприклад, антитілом за цим винаходом за умов, прийнятних для утворення комплексу антиген-антитіло. Згадане антитіло безпосередньо або, за варіантом, якому віддається більша перевага, опосередковано мітять виявною міткою для полегшення виявлення зв'язаного або незв'язаного антитіла. У цій галузі є добре відомими різноманітні методи виявлення утворення імунних комплексів, наприклад, ELISA, RIA, імуноблотинг (наприклад, дот-блотинг, слот-блотинг, вестерн-блотинг тощо), способи та методи непрямої флуоресценції, які полягають у виявленні змін фізичних параметрів, такі як, наприклад, SPR та подібні методи. До таких варіантів застосування належать методи, в яких використовують селективне антитіло проти гепсидину-25 за цим винаходом, кон'юговане з виявною міткою для виявлення гепсидину у біологічному зразку, наприклад, у людській біологічній рідині або у клітинному чи тканинному екстракті. Антитіла за цим винаходом можуть застосовуватись у таких аналізах з або без модифікації виявною міткою. У разі модифікування виявною міткою, антитіла за цим винаходом можуть бути модифіковані шляхом ковалентного або нековалентного приєднання виявної мітки. Термін "виявна", вжитий у цьому описі, визначає характерну ознаку речовини (кон'югату, сполуки або складової), яка дозволяє ідентифікувати або відслідковувати згадану речовину за допомогою детектора із застосуванням відомих аналітичних методів. До типових прикладів виявних міток належать (без обмеження) хромофори, флуоресцентні мітки, фосфоресцентні мітки, люмінесцентні мітки, радіоактивні мітки, різні ферменти (такі як лужна фосфатаза або пероксидаза хрому), магнітні мітки (наприклад, діамантні, парамагнітні та феромагнітні матеріали) і кластери, які містять атоми (іони) важких металів, а також будь-які інші відомі виявні мітки. Кількість стандартного утвореного комплексу антитіло-антиген можна визначати різними методами, відомими у цій

галузі, такими як, наприклад, фотометричні або колориметричні методи. За варіантом, якому віддається перевага, антитіла за цим винаходом застосовують без модифікації, тобто опосередковано міченими за методами, добре відомими у цій галузі.

Цей винахід є прикладом здійснення способу виявлення білка гепсидину-25 у біологічному зразку, який включає інкубування антитіла за цим винаходом з біологічним зразком за умов та впродовж періоду часу, достатніх для надання можливості згаданому антитілу зв'язатись із білком, гепсидином-25, і виявлення згаданого зв'язування. За варіантом, якому віддається перевага, згаданим антитілом є 5E8, OH4 та/або OB3. Способом виявлення білка гепсидину-25 у біологічному зразку, якому віддається перевага, є сендвіч-ELISA, що включає інкубування першого антитіла за цим винаходом з біологічним зразком за умов та впродовж періоду часу, достатніх для надання можливості згаданому антитілу зв'язатись із білком, гепсидином-25, видалення незв'язаного зразка, застосування другого антитіла, яке селективно зв'язує антигенну детермінанту, яка знаходиться у межах амінокислот 1-7 послідовності SEQ ID NO: 1, видалення незв'язаного другого антитіла і виявлення зв'язування згаданого другого антитіла. За варіантом, якому віддається перевага, згаданим першим антитілом є 3.23 або 3.12 і згаданим другим антитілом є OH4 або OB3. Mab 3.23 проти гепсидину містить два поліпептиди легкого ланцюга і два поліпептиди важкого ланцюга, де кожен з поліпептидів легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 82, і кожен з поліпептидів важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 83, і зв'язує поліпептид, який має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 1. Mab 3.12 проти гепсидину містить два поліпептиди легкого ланцюга і два поліпептиди важкого ланцюга, де кожен із поліпептидів легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 84, і кожен з поліпептидів важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 85, і зв'язує поліпептид, який має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 1. Способом виявлення білка гепсидину-25 у біологічному зразку, якому віддається більша перевага, є сендвіч-ELISA, що включає інкубування першого антитіла, яке специфічно зв'язує антигенну детермінанту, яка знаходиться у межах амінокислот 5-25 гепсидину, з біологічним зразком за умов та впродовж періоду часу, достатніх для надання можливості згаданому антитілу зв'язатись з білком(-ами) гепсидину, видалення незв'язаного зразка, застосування другого антитіла, яке зв'язує антигенну детермінанту, яка знаходиться у межах амінокислот 1-7 гепсидину-25, видалення незв'язаного другого антитіла і виявлення присутності або відсутності зв'язування згаданого другого антитіла. За варіантом, якому віддається перевага, згаданим першим антитілом є 3.23 або 3.12 і згаданим другим антитілом є OH4 або OB3. За варіантом, якому віддається більша перевага, друге антитіло є неміченим, і зв'язування виявляють опосередковано за методами, відомими у цій галузі.

Цей винахід пропонує також композиції, способи та набори для скринінгу зразків, які, як гадають, містять гепсидин-25. Такому скринінгу можуть піддаватись зразки від пацієнтів або лабораторні зразки, які, як гадають, містять або продукують такий поліпептид. Набір може включати в себе селективне антитіло проти гепсидину-25 за цим винаходом. Згаданий набір може включати в себе відповідний буфер та реактиви для виявлення взаємодії між зразком та селективним антитілом проти гепсидину-25 за цим винаходом. Запропонований реактив може бути агентом, міченим радіоактивною міткою, флуоресцентною міткою або ферментативною міткою, здатним до зв'язування або взаємодії з антитілом за цим винаходом, таким як антимишаче IgG антитіло.

Реактив згаданого набору може надаватись як рідкий розчин, прикріплений до твердої основи, або як сухий порошок. У разі, якщо реактив надається у вигляді рідкого розчину, за варіантом, якому віддається перевага, згаданим рідким розчином є водний розчин. За варіантом, якому віддається перевага, у разі, якщо реактив, що надається, є прикріпленим до твердої основи, згаданою твердою основою може бути хроматографічне середовище, планшет для випробування, який має певну кількість лунок, або предметне скло мікроскопа. У разі, якщо реактивом, що надається, є сухий порошок, згаданий порошок можна відновлювати шляхом додання прийнятного розчинника, який також може надаватись у складі набору.

Набір за цим винаходом надається у контейнері, який, як правило, являє собою флакон, в який можуть бути вміщені антитіло, антиген або реактив для виявлення, за варіантом, якому віддається перевага, поділене(-ий) на відповідні аліквоти. Набори за цим винаходом будуть також, як правило, включати в себе засіб для розміщення контейнерів зі зразками антитіла, антигену і реактиву. Такими контейнерами можуть бути пластикові контейнери, у яких зберігаються необхідні ампули та один або декілька необхідних хімічних реактивів, таких як

хроматографічний матеріал, розчинники та елюенти, контрольні пробірки, детергенти, антитіла та хімічні реактиви для реакції виявлення.

Варіанти терапевтичного застосування

Захворювання або стани, які стимулюються гепсидином-25, можна попереджати або лікувати шляхом введення пацієнту, який цього потребує, фармацевтичної композиції, яка містить селективне антитіло проти гепсидину-25, друге антитіло, яке зв'язує антигенну детермінанту, яка знаходиться у межах амінокислот 1-7, включно, (1) людського гепсидину-25, тобто DTHFPIC (послідовність SEQ ID NO: 5), та/або (2) мишачого гепсидину-25, тобто DTNFPIC (послідовність SEQ ID NO: 86).

Фармацевтична композиція, яка містить антитіло за цим винаходом, може застосовуватись для підвищення рівнів заліза у сироватці, кількості ретикулоцитів, кількості еритроцитів, рівнів гемоглобіну та/або гематокриту у людини, коли ефективну кількість вводять людині, яка потребує цього. Крім того, антитіло за цим винаходом може застосовуватись для лікування станів, захворювань або розладів, у разі яких присутність гепсидину-25 спричинює чи сприяє небажаним патологічним ефектам, або зниження рівнів гепсидину-25 чи біологічної активності гепсидину чинить терапевтично сприятливу дію на людей. Такі стани, захворювання або розлади охоплюють анемію, у тому числі (але без обмеження) анемію, яка є наслідком інфекції, запалення, хронічного захворювання та раку. Суб'єктами можуть бути чоловіки або жінки. За варіантом, якому віддається перевага, людина має або знаходиться під загрозою появи небажано низького рівня заліза у сироватці, низької кількості ретикулоцитів, кількості еритроцитів, рівнів гемоглобіну та/або гематокриту. За варіантом, якому віддається більша перевага, людина страждає на або знаходиться під загрозою виникнення анемії, у тому числі (але без обмеження) анемії, яка є наслідком інфекції, запалення, хронічного захворювання та/або раку.

Крім того, антитіло за цим винаходом застосовується для виготовлення лікарського засобу для лікування або запобігання анемії, у тому числі (але без обмеження) анемії, яка є наслідком інфекції, запалення, хронічного захворювання та раку.

Селективні антитіла проти гепсидину-25 за цим винаходом є прийнятними також для запобігання та лікування захворювань та станів, стимульованих гепсидином-25. Селективні моноклональні антитіла проти гепсидину-25 за цим винаходом можна вводити до складу фармацевтичних композицій для пасивної імунізації проти гепсидину-25. Функціональні фрагменти моноклональних антитіл за цим винаходом, такі як Fab-фрагменти, P(ab')₂-фрагменти та будь-які фрагменти, які зберегли здатність до селективного зв'язування гепсидину-25, також можуть включатись до складу фармацевтичних композицій та застосовуватись у терапії.

Крім того, селективні моноклональні антитіла проти гепсидину-25 за цим винаходом можуть застосовуватись у імунологічних аналізах для моніторингу розвитку захворювань та станів, які стимулюються гепсидином-25, для яких рівень або кількість гепсидину-25 є показником успішного лікування чи розвитку захворювання або стану.

Більше того, моноклональні антитіла за цим винаходом є прийнятними для застосування у способах оцінювання лікування з блокуванням гепсидину-25 у пацієнта із захворюванням або станом, який стимулюється гепсидином-25. Такі способи включають стадії:

а) одержання першого зразка біологічної рідини від пацієнта перед або на початкових етапах лікування;

б) визначення рівня гепсидину-25 у першому зразку за допомогою імуноаналітичного методу;

с) одержання другого зразка біологічної рідини від пацієнта через відповідний період часу, впродовж якого лікування могло б мати ефект;

д) визначення кількості гепсидину-25 у другому зразку за допомогою імуноаналітичного методу;

е) порівняння визначеної кількості гепсидину-25 у першому зразку з кількістю гепсидину-25 у другому зразку з визначенням ефективності лікування зі зв'язуванням або блокуванням гепсидину-25.

Вищенаведений спосіб, який застосовується для оцінювання лікування зі зв'язуванням або блокуванням гепсидину-25 у пацієнта, є особливо цінним у клінічній практиці, де часовий розподіл прийняття рішень з продовженням однієї чи іншої програми лікування може мати критичні наслідки для пацієнта. Спосіб за цим винаходом надає інформацію, на якій ґрунтуються ці критичні рішення. Згаданий спосіб забезпечує визначення кількості гепсидину-25 перед або на початкових етапах лікування і забезпечує здійснення одного або декількох

визначень кількості гепсидину-25 впродовж одного або декількох періодів після започаткування лікування, зокрема, коли вважають, що лікування почало давати результат.

Лікування з блокуванням гепсидину-25 може являти собою пасивне введення пацієнту селективного антитіла проти гепсидину-25. Селективним антитілом проти гепсидину-25 може бути химерне людське/нелюдське антитіло, гуманізоване або повністю людське моноклональне селективне антитіло проти гепсидину-25 чи будь-який фрагмент селективного антитіла проти гепсидину-25, який є функціональним щодо зв'язування гепсидину-25.

У цій галузі є добре відомими різноманітні методи виявлення утворення імунних комплексів, наприклад, ELISA, RIA, імуноблотинг (наприклад, дот-блотинг, слот-блотинг, вестерн-блотинг тощо), способи та методи непрямой флуоресценції, які полягають у виявленні змін фізичних параметрів, такі як, наприклад, SPR та подібні методи. За одним широко застосовуваним методом утворення імунного комплексу виявляють завдяки застосуванню мітки, такої як радіоактивна мітка або ферментна мітка (така як лужна фосфатаза або пероксидаза хрому). Подальші переваги можна одержати завдяки застосуванню другого зв'язувального ліганду, такого як друге антитіло або молекула, зв'язана з авідинном, для зв'язування біотинізованого ліганду, за методами, добре відомими у цій галузі.

Терміни "лікування" та "лікувати", вжиті у цьому описі, означають введення речовини пацієнту, який має захворювання, стан або розлад, опис яких наведено у цій заявці, симптом такого захворювання, стану або розладу чи схильність до такого захворювання, стану або розладу, з метою одержання терапевтичного ефекту, наприклад, для лікування, полегшення, зміни, впливу, контролювання, припинення, поліпшення симптомів або запобігання захворюванню, стану або розладу, симптому захворювання, стану або розладу чи схильності до захворювання, стану або розладу. За варіантом, якому віддається перевага, пацієнт, що зазнає лікування, є ссавцем, і за варіантом, якому віддається більша перевага, людиною. Схеми приймання лікарського засобу можуть регулюватись для забезпечення оптимальної бажаної реакції (наприклад, терапевтичної реакції). Наприклад, може вводиться разова ударна доза, можуть вводиться декілька менших доз впродовж певного періоду часу або доза може бути пропорційно зменшена або збільшена, як того потребують вимоги терапевтичної ситуації.

Фармацевтичні композиції

Антитіло за цим винаходом може включатись до складу фармацевтичної композиції, прийнятної для введення людині. Антитіло за цим винаходом можна вводити людині самостійно або у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем однією або декількома дозами. Такі фармацевтичні композиції розробляють так, щоб вони були прийнятними для вибраного способу введення, і відповідним чином застосовують фармацевтично прийнятні розріджувачі, носії та/або допоміжні речовини, такі як диспергувальні агенти, буфери, поверхнево-активні речовини, консерванти, солубілізатори, агенти для регулювання ізотонічності, стабілізатори тощо. Згадані композиції можуть розроблятися за традиційними методами, відомими у цій галузі.

До прийнятих носіїв для фармацевтичних композицій належить будь-який матеріал, який, у разі комбінування з моноклональним антитілом за цим винаходом, зберігає активність молекули і не реагує з імунною системою суб'єкта.

Фармацевтичну композицію, яка містить моноклональне антитіло проти гепсидину-25 за цим винаходом, можна вводити суб'єкту, який знаходиться під загрозою виникнення або демонструє такі патології, опис яких наведено у цій заявці, наприклад, анемічні розлади, із застосуванням стандартних методів введення.

Словосполучення "ефективна кількість", вжите у цьому описі, означає кількість, необхідну (у дозах та впродовж періодів часу і для певних засобів введення) для досягнення бажаного терапевтичного результату. Ефективна кількість антитіла може змінюватись у залежності від таких факторів як хворобливий стан, вік, стать та маса індивідуума і здатність антитіла або частини антитіла спричинювати бажану реакцію у індивідуума. Ефективною кількістю також є кількість, у разі якої будь-який токсичний або шкідливий ефекти антитіла переважаються терапевтично сприятливими ефектами.

Ефективною кількістю є принаймні мінімальна, однак менша за токсичну, кількість активного агента, необхідна для справляння терапевтично ефективною дії на суб'єкта. Інакше кажучи, ефективною кількістю або терапевтично ефективною кількістю антитіла за цим винаходом є кількість, яка у ссавців, за варіантом, якому віддається перевага, у людей (i) підвищує рівні заліза у сироватці, кількість ретикулоцитів, кількість еритроцитів, рівні гемоглобіну та/або гематокриту, або (ii) лікує стан, розлад чи захворювання, у разі якого присутність гепсидину-25 спричинює або сприяє небажаному патологічному ефекту, або (iii) результатом зниження рівнів гепсидину-25 або біологічної активності гепсидину є сприятлива терапевтична дія на ссавця, за

варіантом, якому віддається перевага, на людину, яка страждає на анемію (але без обмеження), в тому числі (але без обмеження) анемії, спричиненої хронічними захворюваннями, в тому числі (але без обмеження) анемію, яка є наслідком інфекції, запалення, хронічного захворювання та/або раку. Ефективну кількість антитіла за цим винаходом можна вводити однією дозою або декількома дозами. Крім того, ефективну кількість антитіла за цим винаходом можна вводити декількома дозами у кількостях, які були б меншими за ефективну кількість, якби не вводились більше одного разу.

Як добре відомо у галузі медицини, дози для будь-якого суб'єкта залежать від багатьох факторів, у тому числі частоти та шляху введення, загального стану здоров'я та інших лікарських засобів, які вводяться одночасно. Окрім того, доза може змінюватись у залежності від типу та тяжкості захворювання. Величина типової дози може становити, наприклад, від приблизно 0,1 мг до приблизно 100 мг; за варіантом, якому віддається перевага, від приблизно 1 мг до приблизно 100 мг; за варіантом, якому віддається більша перевага, від приблизно 5 мг до приблизно 50 мг; однак передбачаються дози, менші або більші за цей діапазон, зокрема, приймаючи до уваги вищезгадані фактори. Добова схема парентерального введення лікарського засобу може включати від приблизно 10 мкг/кг до приблизно 10 мг/кг загальної маси тіла, за варіантом, якому віддається перевага, від приблизно 100 мкг/кг до приблизно 10 мг/кг, за варіантом, якому віддається більша перевага, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 10 мг/кг. Розвиток можна контролювати періодичним оцінюванням з відповідним регулюванням дози.

Ці запропоновані кількості антитіла значною мірою залежать від терапевтичних міркувань. Ключовим фактором вибору відповідної дози та планування є одержаний результат. Факторами для розгляду у цьому контексті є конкретний розлад для лікування, клінічний стан конкретного пацієнта, причина розладу, місце доставки антитіла, конкретний тип антитіла, спосіб введення, планування та частота введення та інші фактори, відомі лікарям-практикам.

Антитіло за цим винаходом можна вводити такими шляхами як пероральний, парентеральний, інгаляційний або місцевий. За варіантом, якому віддається перевага, антитіла за цим винаходом можуть бути включені до складу фармацевтичної композиції, прийнятної для парентерального введення. Термін "парентеральний", вжитий у цьому описі, включає внутрішньовенне, внутрішньом'язове, підшкірне, ректальне, вагінальне або внутрішньоочеревинне введення. Перевагу віддають парентеральній доставці шляхом внутрішньовенної, внутрішньоочеревинної або підшкірної ін'єкції. Найбільшу перевагу віддають підшкірній ін'єкції. Прийнятні носії для таких ін'єкцій є добре відомими у цій галузі.

Фармацевтична композиція, як правило, повинна бути стерильною та стабільною за умов виготовлення та зберігання у наданому контейнері, у тому числі, наприклад, герметично закритій ампулі, шприці або іншому пристрої для доставки, наприклад, шприц-ін'єкторі. Таким чином, фармацевтичні композиції можна піддати стерилізуванню фільтруванням після одержання лікарської форми або перетворити на мікробіологічно прийнятні іншим чином.

Наведені нижче приклади запропоновані лише з ілюстративною метою і не призначені для обмеження обсягу цього винаходу.

Приклади

Приклад 1: Одержання людського гепсидину-25

Людський гепсидин-25 можна одержати з комерційних джерел (наприклад, компанія Peptide International (Louisville, штат Кентуккі)) або продукувати за допомогою різноманітних методів синтезу або технологій рекомбінантних ДНК, відомих у цій галузі. Наприклад, гібридний білок, який містить двадцять п'ять амінокислот гепсидину-25 і має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 95, експресується у клітинах *E. coli*. Тільки включення виділяють з 3 літрів клітин *E. coli*, які експресують гібридний білок людського гепсидину-25 після 3-6 год. індукції 1 mM розчином IPTG (ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид) при температурі 37 °C. Тільки включення солюбілізують у буфері А (50 mM трис-буферу та 8 M сечовини (pH 8,0)). Супернатант пропускають через IMAC (іммобілізована металоафінна хроматографія) колонку (20 мл смоли). Колонку промивають буфером А, доки оптична густина не повернеться до вихідного рівня, і зв'язані поліпептиди періодично елюють із колонки 0,5 M розчином імідазолу у буфері А. Гібридний білок людського гепсидину-25 змішують, і відновлюють за допомогою 50 mM розчину DTT. Після цього цей гібридний білок повторно укладають шляхом розбавлення змішаного матеріалу у 2 M розчині сечовини, 3 mM розчині цистеїну, 50 mM розчині трис-буфера (pH 8,0) до кінцевої концентрації білка, меншої за 50 мкг/мл. Цей матеріал перемішують при кімнатній температурі, і окиснюють киснем повітря впродовж 48 год. Окиснені поліпептиди пропускають через IMAC колонку (20 мл) зі швидкістю потоку 5 мл/хв, і гібридний білок людського гепсидину-25 періодично елюють із колонки 0,5 M розчином імідазолу у буфері А. Змішані фракції, які містять гібридний білок людського гепсидину-25, концентрують, і

пропускають через колонку для гель-хроматографування (наприклад, SUPERDEX® 75, GE Healthcare, XK26/60), зрівноважену 50 mM розчином трис-буферу, 4 M розчином сечовини (pH 8,0), зі швидкістю потоку 3 мл/хв. Елюйований мономерний гібридний білок змішують, потім розбавляють у 50 mM розчині трис-буфера, 2 M розчині сечовини, 5 mM розчині CaCl_2 (pH 8,0), після чого розщеплюють за допомогою ентерокинази з одержанням людського гепсидину-25 (послідовність SEQ ID NO: 1). Нерозщеплений гібридний білок людського гепсидину-25 видаляють шляхом пасивної іммобілізованої металоафінної хроматографії (як описано вище). Вихідний потік з IMAC колонки після цього завантажують у хроматографічну колонку C-18 для хроматографування з оберненою фазою зі швидкістю потоку 4,0 мл/хв. Колонку промивають 0,1 % розчином TFA у воді до повернення показника оптичної густини до вихідного рівня, і зв'язані поліпептиди елюють із колонки лінійним градієнтом ACN від 20 % до 40 % з 0,1 % TFA зі швидкістю 0,5 %/хв. Фракції, які містять поліпептид людського гепсидину-25, змішують, і аналізують шляхом N-кінцевого амінокислотного секвенування та засобами мас-спектрометрії з іонізацією методом лазерної десорбції у матричному розчині із часопролітним аналізатором (MALDI-MS).

Поліпептиди, які кодує паціючий гепсидин-25, мишачий гепсидин-25 та гепсидин-25 макак-крабодів і різні скорочені на N-кінці форми людського гепсидину-25, у тому числі гепсидин-22 та гепсидин-20, одержували по суті таким самим чином як описано для людського гепсидину-25.

Приклад 2: Протидія антитіл проти N-кінцевого гепсидину-25

Мишей імунізують N-кінцевим пептидом гепсидину (амінокислоти 1-7 послідовності SEQ ID NO: 1), кон'югованим за допомогою пептидного лінкера, який складається з п'яти амінокислот (тобто GP GPG), з пептидною послідовністю OVA (овальбумін) (амінокислоти 323-336), тобто повномірним імуногеном DTHFPICGPGPGISQAVHAANA EINE (послідовність SEQ ID NO: 87). і селезінки цих мишей збирають на 27 день. В-клітини сортують (1 клітина/лунка) на Ag^+ та IgG^+ В-клітини пам'яті та клітини зародкового центру, і впродовж 2 тижнів сумісно культивують з клітинами лінії EL4B. Після цього одержані супернатанти, які містять IgG, розбавляють у 1,4 рази і піддають скринінгу шляхом проведення ELISA у трьох форматах: 1) 96-лункові планшети сенсibilізують розчином зв'язувального білка NEUTRAVIDIN™ (деглікозилована та ізоелектрично нейтральна форма авідину (компанія Pierce Biotechnology, Rockville, штат Іллінойс), 2 мкг/мл) у карбонатному буфері впродовж ночі. Сайти неспецифічного зв'язування блокують казеїном впродовж 1 год. Після цього планшет тричі промивають PBS з 0,05 % твін-20, і 100 нМ розчин біотинілованого гепсидину інкубують на планшеті впродовж 1 год. Планшет знову промивають як описано. Після цього супернатанти культури, які містять IgG, інкубують впродовж 1 год., і планшет промивають. Специфічне зв'язування антитіла проти гепсидину-25 виявляють за допомогою суміші (0,5 мкг/мл) козячого антимишачого IgG Fcy-лужної фосфатази. Активність лужної фосфатази визначають шляхом додання відповідної кількості субстрату PMP/AMP (розчин (6 мг/мл) фенолфталейнмонофосфату (PMP) у 0,5 M розчині трис-буферу, pH 10,2, 2 % 2-аміно-2-метил-1-пропанолу (AMP), 0,1 % Na_2CO_3), і визначають показник оптичної густини при 560 нм; 2) 96-лункові планшети сенсibilізують розчином (2 мкг/мл) козячого антимишачого каппа IgG у карбонатному буфері впродовж ночі. Потім сайти неспецифічного зв'язування блокують казеїном впродовж 1 год. Планшет тричі промивають PBS з 0,05 % твін-20, і супернатанти культури, які містять IgG, інкубують впродовж 1 год. Після цього на планшеті впродовж 1 год. інкубують біотинілований гепсидин-25 (100 нМ), і планшет промивають як описано вище. Специфічне зв'язування гепсидину-25 з іммобілізованим антитілом після цього виявляють шляхом додання розчину (1 мкг/мл) NEUTRAVIDIN-AP™, кон'югату NEUTRAVIDIN™-лужної фосфатази (компанія Pierce Biotechnology, Rockford, штат Іллінойс), визначають активність лужної фосфатази шляхом додання субстрату PMP/AMP, і визначають оптичну густину при 560 нм; та 3) 96-лункові планшети сенсibilізують 100 нМ розчином гепсидину-25 у воді впродовж ночі при температурі 37 °C. Після цього сайти неспецифічного зв'язування блокують казеїном впродовж 1 год., і планшет тричі промивають PBS з 0,05 % твін-20. Після цього супернатанти культури, які містять IgG, інкубують впродовж 1 год., і планшет знову промивають як описано. Специфічне зв'язування антитіла проти N-кінцевого гепсидину-25 виявляють за допомогою суміші (0,5 мкг/мл) козячого антимишачого IgG Fcy-лужної фосфатази. Активність лужної фосфатази визначають за допомогою субстрату PMP/AMP, і показник оптичної густини визначають при 560 нм.

Після цього за допомогою В-клітин, які експресують мишачі антитіла, специфічні для N-кінця гепсидину-25, наприклад, 3A9, 4C11 та 5E8, ізолювали РНК, варіабельні ділянки ампліфікували за допомогою RT-PCR (полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскриптазою) з подальшим клонуванням у доступних мишачих IgG1 векторах або важкому і легкому ланцюгу,

відповідно. Із застосуванням SPR була підтверджена ідентичність тимчасово експресованих мишачих антитіл як специфічних антитіла проти N-кінцевого гепсидину-25.

Приклад 3: Визначення афінного зв'язування Fabs та Mabs проти гепсидину за допомогою SPR

5 Для визначення кінетики зв'язування та афінності антитіл, наприклад, антитіл, розкритих у цьому описі, можна застосовувати Біосенсор на основі поверхневого плазмонного резонансу, такий як BIAcore® T100. Система BIAcore® використовує оптичні властивості SPR для виявлення зміни концентрації білків молекул, які взаємодіють у межах декстранової біосенсорної матриці. За виключенням зазначеного, усі реактиви та матеріали закуповують від
10 компанії BIAcore® AB (Uppsala, Швеція). Усі визначення здійснюють при температурі 25 °C. Зразки розчиняють у буфері HBS-EP (150 mM розчин хлориду натрію, 3 mM розчин EDTA, 0,05 % (у відношенні маси до об'єму) розчин поверхнево-активної речовини P-20 та 10 mM розчин ГЕПЕС-буфера, pH 7,4). Для захоплення Fabs з людським каппа-ланцюгом козячі антитіла проти людського каппа-ланцюга іммобілізують у протокових кюветах 1-4 сенсорного
15 планшета CM5 на рівні 5000-10000 реакційних одиниць (Ru) із застосуванням набору для зв'язування амінів. Для захоплення Mabs з мишачим IgG1, козячі антитіла проти мишачого Fc гамма-ланцюга іммобілізують у протокових кюветах 1-4 сенсорного планшета CM5 на рівні 5000-10000 Ru із застосуванням набору для зв'язування амінів. Для захоплення антитіл з людським IgG4 білок A іммобілізують у протокових кюветах 1-4 сенсорного планшета CM5 на
20 рівні 400-700 Ru із застосуванням набору для зв'язування амінів. Fabs, одержані з периплазми клітин E. coli, та Mabs, одержані з культури клітин ссавців, оцінюють із застосуванням численних аналітичних циклів. Кожен цикл складається з таких етапів: 0,3-2 хв введення Fab або Mab (~10 мкл/хв) з метою захоплення 200-1000 Ru, 2 хв введення (50 мкл/хв) різних концентрацій людського гепсидину-25 (від 600 nM до 0,1 nM), який одержали, як описано у наведеному вище
25 Прикладі 1, з подальшими 2-Ю хв для дисоціації і відновлення із застосуванням 30 мкл 10 mM розчину гліцину гідрохлориду, pH 1,5. Визначення здійснюють при температурі 25 °C, швидкість асоціації та дисоціації для кожного циклу визначають із застосуванням моделі зв'язування "1:1 з масопередачею" із застосуванням комп'ютерної програми BIAevaluation.

Мишачі моноклональні антитіла 3A9, 4C11, 5E8, OB3, OH4, OB1 та OE1 демонстрували зв'язування людського гепсидину-25 зі спорідненістю (K_D) від приблизно 36 nM до приблизно 1
30 nM. Мишаче моноклональне антитіло OH4 зв'язує людський гепсидин-25 з K_D приблизно 1,2 nM, але виявно не зв'язується з людським гепсидином-20 або людським гепсидином-22. Мишаче моноклональне антитіло 5E8 зв'язує людський гепсидин-25, але виявлювано не зв'язується з мишачим або пацючим гепсидином-25. Мишаче моноклональне антитіло 4C11 зв'язує людський, мишачий та пацючий гепсидин-25 і, набагато меншою мірою, людський гепсидин-22 (приблизно 209 nM), але не людський гепсидин-20.

Приклад 4: Визначення пар Mabs, що одночасно зв'язують людський гепсидин-25

Моноклональні антитіла, які одержали проти амінокислот 1-7, включно, людського гепсидину-25, які демонстрували високоафінне зв'язування з людським гепсидином-25 за
40 результатами аналізу засобами SPR, перевіряли на їх здатність до одночасного зв'язування з людським гепсидином-25 з Mab 3.23.

Стикло, на BIAcore® T100, козяче антимишаче IgG1 Fc поліклональне антитіло іммобілізували у протокових кюветах 1-4 планшета CM5 на рівні 5000-15000 реакційних одиниць (Ru). Mab 5E8 іммобілізували у протоковій кюветі 2, Mab 4C11 іммобілізували у протоковій
45 кюветі 3 і Mab 3A9 іммобілізували у протоковій кюветі 4. Протокову кювету 1 застосовували як еталонну протокову кювету. Після цього у всі протокові кювети вносили людський гепсидин-25. Усі протокові кювети з іммобілізованими Mabs 5E8, 4C11 та 3A9 продемонстрували збільшення Ru, що вказує на зв'язування цих Mabs з людським гепсидином-25. Після цього у всі протокові кювети вводили Mab 3.23. Лише протокова кювета 2, з іммобілізованим Mab 5E8,
50 продемонструвала одночасне зв'язування людського гепсидину-25 Mabs 5E8 та 3.23.

Крім того, Mabs Hu22, 3.23, 3.12 та негативне контрольне людське IgG4 антитіло іммобілізували на окремих протокових кюветах сенсорного планшета CM4 (компанія BIAcore) на
рівні 1000-4000 Ru. Після цього у згадані протокові кювети вводили людський гепсидин-25. Потім у згадані протокові кювети вводили Mab 5E8. Протокові кювети з іммобілізованими Mabs
55 Hu22, 3.23, та 3.12 продемонстрували зв'язування людського гепсидину-25 з одночасним зв'язуванням Mab 5E8. У протоковій кюветі з іммобілізованим негативним контрольним людським IgG4 не спостерігалось зв'язування ні людського гепсидину-25, ні Mab 5E8. Окрім того, Mab 5E8 не зв'язувало людський гепсидин-25 одночасно ні з кролячими поліклональними сироватками проти KLH (гемоціанін лімфи равлика)-кон'югованих пептидів, які склались з
60 амінокислот 1-7 людського та мишачого гепсидину-25 (компанія Alpha Diagnostic International,

San Antonio, штат Техас; номер за каталогом Нерс13-S), ні з очищеним препаратом IgG (компанія Alpha Diagnostic International; номер за каталогом Нерс13-A)).

Приклад 5: Сендвіч-ELISA для визначення рівня людського гепсидину-25

Лунки багатолункового планшета сенсibilізують впродовж 1 год. при кімнатній температурі розчином Mab 3.23 з концентрацією 2 мг/л у карбонатно-бікарбонатному сенсibilізувальному буфері, pH 9,40 (компанія Pierce Biotechnology, Rockville, штат іллінойс). Після цього вміст лунок відсмоктують, і лунки тричі промивають TBST (забуференим TRIS фізіологічним розчином, який містить трис-буфер (10 ммоль/л), pH 7,4, NaCl (150 ммоль/л) та твін-20 (1 мл/л)). Після цього лунки впродовж 1 год. блокують TBS-казеїновим блокувальним буфером (150 mM NaCl, 25 mM трис-буферу, 1 % казеїну, pH 7,4, з протимікробним препаратом Kathon (компанія Pierce Biotechnology; номер за каталогом 37532). Після цього для одержання калібраційної кривої до ряду лунок додають 100 мкл стандартного розчину гепсидину-25 (різні концентрації синтезованого людського гепсидину-25 у аналітичному буфері, який містить 50 ммоль/л ГЕПЕС-буферу, pH 7,40, 150 ммоль/л NaCl, 10 мл/л неіоногенної поверхнево-активної речовини Triton® X-100 (компанія Union Carbide Corp., Danbury, штат Коннектикут), 5 ммоль/л EDTA та 5 ммоль/л етиленглікотетраоцтової кислоти (EGTA)). У подальшому зразки сироватки розбавляють 1:20 у аналітичному буфері, додають у відповідні лунки, і планшет для проведення ELISA інкубують впродовж 1 год. при кімнатній температурі. Після відсмоктування вмісту лунки тричі промивають TBST, і у лунки додають 100 мкл розчину (1 мг/мл, розведення 1:1000) біотинізованого моноклонального антитіла 5E8 проти гепсидину з подальшим 1 год. інкубуванням при кімнатній температурі. Після відсмоктування вмісту лунки тричі промивають TBST, і у лунки додають 100 мкл розчину полістрептавідину-HRP (пероксидаза хрому) (компанія Pierce Biotechnology, Rockville, штат Іллінойс) з подальшим 30 хв інкубуванням при кімнатній температурі. Після цього лунки тричі промивають TBST. Після останнього відсмоктування TBST у лунки додають 100 мкл розчину субстрату для проявлення, 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (компанія Pierce Biotechnology, Rockville, штат Іллінойс), з подальшим 30 хв інкубуванням при кімнатній температурі. Реакцію припиняють додаванням однакового об'єму 2N розчину фосфорної кислоти, і планшети зчитують при 450 нм.

Концентрації гепсидину-25 у сироватці 40 нормальних індивідів та хворих на рак пацієнтів, які були визначені за допомогою сендвіч-ELISA, опис якого було наведено вище, становили від 5 мкг/л до 656 мкг/л і прямо корелювали з концентраціями гепсидину-25 у сироватці, які визначали за допомогою стандартного LC/MS аналізу ($r=0,98$, $p<0,0001$) (дивись, Murphy, et al., (2007)). Було також визначено, що концентрація гепсидину-25 у 100 зразках сироватки від здорових донорів-людей (50 чоловіків і 50 жінок; вік у межах від 18 років до 66 років, середній вік 37 років), які одержали від компанії Bioreclamation, Inc. (East Meadow, штат Нью-Джерсі), становила <1-79 мкг/мл. На додаток до цього, сендвіч-ELISA дозозалежним чином виявляв контрольний пептид, людський гепсидин-25, до рівня щонайменше 1 нг/мл. З іншого боку, ні контрольний пептид, людський гепсидин-25 (до 2 нг/мл), ні ендогенний гепсидин-25 у позитивному контрольному зразку людської сироватки, тобто попередньо визначений за результатами LC/MS аналізу як такий, що містить гепсидин-25, не виявляється у тому самому аналізі, коли Mab 5E8 замінили i) кролячою поліклональною сироваткою проти KLN-кон'югованих пептидів, які складались з амінокислот 1-7 людського та мишачого гепсидину-25 (компанія Alpha Diagnostic International, San Antonio, штат Техас; номер за каталогом Нерс13-S), або ii) очищеним препаратом IgG (компанія Alpha Diagnostic International; номер за каталогом Нерс13-A). Більш того, ні стандарт гепсидину-25, ні позитивний контрольний зразок людської сироватки не виявлялись у тому разі, коли НЕРС-13-S антисироватку або очищений препарат IgG i) застосовували для сенсibilізації окремих лунок аналітичного планшета, тобто як іммобілізовані антитіла, ii) додавали до аналітичної суміші як біотин-кон'юговані ідентифікуючі антитіла, або iii) додавали до аналітичної суміші як некон'юговані ідентифікуючі антитіла, тобто з подальшим аналізом їх зв'язування із застосуванням другого антикролячого IgG антитіла.

Контрольний пептид, людський гепсидин-25, та ендогенний гепсидин-25 у позитивному контрольному зразку людської сироватки не виявляли, якщо сендвіч-ELISA проводили із застосуванням Mab 5E8 як іммобілізованого антитіла, і спарювали з комерційно доступним кролячим поліклональним IgG, який одержали проти KLN-кон'югованого пептиду, зрілого людського С-кінцевого гепсидину з 13 амінокислот (компанія Alpha Diagnostic International, San Antonio, штат Техас; номер за каталогом НЕРС12-A).

Приклад 6: Визначення селективності антитіл проти гепсидину за допомогою MALDI-TOF

Основу клінічного звичайного діагностування біомаркерів становлять, головним чином, кількісні імунологічні методи - наприклад, ELISA. Ці методи часто є неприйнятними для невеликих антигенів або для ізоформ антигенів (Sparbier K., International Meeting of the

Association of Biomolecular Resource Facilities, Salt Lake City, UT, Poster V28-S, (2008); та Gutierrez J.A., et al., (2005)). Mabs або Fabs можна оцінювати за здатністю до селективної імунопреципітації ендogenous гепсидину-25, скоріше ніж його попередників або скорочених форм, з людської сироватки за допомогою мас-спектрометрії MALDI-TOF на поліпептидах гепсидину, зв'язаних антитілами, яку проводять після відновлення зразка.

Розчином Mabs або Fabs у карбонатно-бікарбонатному (pH 9,4) буфері (концентрація 2 мг/л) впродовж 1 год. при кімнатній температурі сенсibiliзують окремі лунки 96-лункового стандартного планшета для проведення ELISA. Після цього вміст лунок відсмоктують, і лунки тричі промивають TBST. Впродовж 1 год. при кімнатній температурі додають (100 мкл/лунка) зразки людської сироватки, які містять певну кількість гепсидину-25 (розбавленого у аналітичному буфері). Вміст лунок відсмоктують, і лунки тричі промивають TBST. Вловлені поліпептиди гепсидину елюють шляхом додання 40 мкл/лунка 0,1 % розчину мурашиної кислоти впродовж 5 хв при кімнатній температурі. Елюйовані зразки збирають, і концентрують за допомогою C4 ZipTip™ (компанія Millipore, Billerica, штат Массачусетс), 10 мкл піпетувального наконечника із шаром хроматографічного середовища для очищення та концентрування білків або пептидів (від фемтомолей до пікомолей), за ідеальних обставин, із молекулярною масою 25000-100000. 0,5 мкл зразка наносять на мішень MALDI, і таку саму кількість матричного розчину (50 % ацетонітрилу, 0,1 % TFA, насиченої альфа-ціан-4-гідроксикоричною кислотою) додають до зразка. Зразок висушують, і аналізують за допомогою мас-спектрометра 4700 TOF-TOF (компанія Applied Biosystems), який працює у лінійному режимі.

Результати експериментів, проведених з MALDI-TOF спектрометрією по суті як описано вище, показали, що Mab 3.23 зв'язувало гепсидин-25 і, набагато меншою мірою, гепсидин-20 (Фіг. 1 і Фіг. 2). Mab 3.23, як видавалось, не зв'язувало виявлених рівнів гепсидину-22 (молекулярна маса 2436 Да), гепсидину-24 (молекулярна маса 2674 Да) або прогепсидину (молекулярна маса 6929 Да), при цьому малось на увазі, звичайно, що випробувані зразки сироватки також містили очікувані кількості людського гепсидину цих форм.

Подібні експерименти були проведені із застосуванням MALDI-TOF спектрометрії для визначення, які види гепсидину у людській сироватці зв'язуються Mab 5E8. При проведенні цих експериментів встановили, що Mab 5E8 зв'язувало у людській сироватці лише гепсидин-25 (Фіг. 3 і Фіг. 4). Важливо те, що Mab 5E8 не зв'язувало ні гепсидину-20, ні гепсидину-22, ні прогепсидину або інших видів гепсидину, при цьому малось на увазі, знову ж таки, що людський гепсидин цих видів був присутнім у зразках сироватки, як очікувалось.

Таким чином, імунологічні аналізи із застосуванням Mab 5E8 або антитіл, які були одержані з нього чи є спорідненими з ним, у тому числі (але без обмеження) Mab OH4, є високоспецифічними та селективними відносно людського гепсидину-25, активної, фізіологічно відповідної форми гепсидину у людській сироватці. Подальшого поліпшення специфічності та/або селективності слід очікувати у імунологічних аналізах людського гепсидину-25, які комбінують застосування Mab 5E8 або антитіл, які були одержані з нього чи є спорідненими з ним, у тому числі (але без обмеження) Mab OH4 та Mab 3.23, Mab 3.12, або антитіл, які були одержані з них чи є спорідненими з ними.

Приклад 7: Сендвіч-ELISA для визначення людського гепсидину-25 (без прямого мічення антитіл)

Сендвіч-ELISA здійснюють як у Прикладі 5, за виключенням того, що i) мічене кон'югатне антитіло замінюють неміченим OH4 та ii) зв'язування OH4 виявляють опосередковано із застосуванням козячого антимишачого антитіла, кон'югованого з пероксидазою хрому.

Завдяки застосуванню Mab 3.23 та неміченого Mab OH4 у сендвіч-ELISA як описано вище, людський гепсидин-25 селективно виявляли у людській сироватці з чутливістю приблизно 0,2 нг/мл.

Приклад 8: Імунологічний сендвіч-аналіз Meso Scale Discovery для визначення людського гепсидину-25

Імунологічний аналіз Meso Scale Discovery (компанія Meso Scale Discovery, Gaithersburg, штат Меріленд) (MSD) для визначення людського гепсидину-25 розробили із застосуванням реактивів, опис яких було наведено вище. Стисло, 1 мг Mab OH4 біотинілювали із застосуванням комерційно доступного набору (компанія Pierce Biotechnology, Rockville, штат Іллінойс), розбавленого у 50 % розчині гліцерину, і зберігали при температурі -20 °C до виникнення потреби. Сенсibiliзовані стрептавідином та блоковані лунки планшета для проведення ELISA інкубували впродовж 1 год. із біотинілованим Mab OH4 з концентрацією 2 мг/л. Після цього вміст лунок відсмоктували, і лунки тричі промивали TBST (забуференим TRIS фізіологічним розчином, який містить трис-буфер (10 ммоль/л), pH 7,40, NaCl (150 ммоль/л) та твін-20 (1 мл/л)). Після цього у лунки додають 100 мкл стандартних розчинів гепсидину (різні

концентрації синтезованого білка гепсидину-25 у аналітичному буфері, який містить 50 ммоль/л ГЕПЕС-буфера, pH 7,40, 150 ммоль/л NaCl, 10 мл/л Triton X-100, 5 ммоль/л EDTA та 5 ммоль/л EGTA з одержанням калібраційної кривої. У той самий час зразки сироватки розбавляють 1:20 у аналітичному буфері, додають у відповідні лунки, і планшет для проведення ELISA інкубують впродовж 1 год. при кімнатній температурі. Після відсмоктування вмісту лунки тричі промивають TBST, і у лунки додають 100 мкл розчину (1 мг/мл, розведення 1:1000) міченого рутенієм Mab 3.23 з подальшим 1 год. інкубуванням при кімнатній температурі. Після відсмоктування вмісту лунки тричі промивають TBST, і планшет для проведення ELISA проявляють із застосуванням MSD-планшет-рідера, який подає напругу на лунки і реєструє електрохемілюмінесценцію рутенію з кожної лунки. Для підгонки калібраційних кривих для ELISA застосовували комп'ютерні програми MSD та SigmaPlot, версія 8.0.

Оптимальне спарювання антитіл у імунологічному MSD сендвіч-аналізі було визначено як спарювання Mab OH4 як іммобілізованого антитіла та Mab 3.23 як кон'югатного антитіла. Синтезований білок гепсидину-25 одержали з концентрацією 10 мкг/л, і послідовно розбавляли для одержання стандартної кривої. Як показано на Фіг. 5, було встановлено, що ELISA має прийнятний динамічний діапазон, фон та чутливість. На основі трьох визначень середнього квадратичного відхилення від нульового калібратора було встановлено, що чутливість імунологічного аналізу є кращою за 0,01 мкг/л, що вказує на те, що згаданий імунологічний аналіз має більш ніж адекватну чутливість для визначення рівнів людського сироваткового гепсидину-25, виходячи з попередніх визначень рівнів людського сироваткового гепсидину-25 за допомогою LC/MS аналізу (Murphy, et al., (2007)). Дані, представлені у вигляді графіка на Фіг. 2, також вказують на те, що імунологічний MSD сендвіч-аналіз є селективним щодо гепсидину-25, оскільки він не виявляє гепсидину-20 або гепсидину-22. Крім того, було визначено, що криві розбавлення імунологічного аналізу для рекомбінантного стандарту та фактичних зразків людської сироватки були паралельними, і імунологічний аналіз продемонстрував дуже добру лінійність розбавлення для зразків людської сироватки (дані не наведені).

Селективність та чутливість імунологічного MSD сендвіч-аналізу порівняли з описаним вище золотим стандартом діагностики, LC/MS аналізом (Murphy, et al., (2007)). Конкретніше, п'ятдесят два (52) зразки людської сироватки із суміші нормальних суб'єктів та хворих на рак пацієнтів аналізували із застосуванням імунологічного MSD сендвіч-аналізу, а також описаного вище LC/MS аналізу, який, як було показано, був специфічним до гепсидину-25 (Murphy, et al., (2007)). Результати цього порівняння показали, що значення гепсидину-25, визначені із застосуванням імунологічного MSD аналізу, дуже добре корелювали зі значеннями, визначеними із застосуванням LC/MS аналізу на гепсидин-25 ($r=0,98$, $p<0,00001$), чим було підтверджено, що імунологічний MSD сендвіч-аналіз специфічно та селективно визначає рівні гепсидину-25 у зразках людської сироватки (дані не представлені).

Декілька параметрів імунологічного MSD сендвіч-аналізу оцінювали із застосуванням зразків людської сироватки. Конкретніше, стабільність при заморожуванні-відтаюванні оцінювали шляхом випробування чотирьох різних зразків сироватки. Ці результати показали, що імунологічний MSD сендвіч-аналіз мав стабільність при заморожуванні-відтаювання з постійною 80-120 % регенерацією гепсидину-25 навіть після 5 циклів заморожування-відтаювання. Окремі результати для циклів заморожування-відтаювання виглядали таким чином: зразок А - 0,16 мкг/л, 0,16 мкг/л, 0,17 мкг/л, 0,17 мкг/л, 0,17 мкг/л та 0,17 мкг/л, відповідно; зразок В - 4,5 мкг/л, 4,4 мкг/л, 4,6 мкг/л, 4,6 мкг/л та 4,4 мкг/л, відповідно; зразок С - 8,9 мкг/л, 9,6 мкг/л, 9,7 мкг/л, 9,7 мкг/л, 9,9 мкг/л та 9,6 мкг/л, відповідно; і зразок D - 15,1 мкг/л, 15,1 мкг/л, 15,4 мкг/л, 15,7 мкг/л, 15,4 мкг/л та 15,4 мкг/л, відповідно. Точність імунологічного MSD сендвіч-аналізу оцінювали із застосуванням зразків людської сироватки, які містили 0,16 мкг/л, 4,5 мкг/л та 15,1 мкг/л ендogenous гепсидину-25. Результати визначення внутрішньої точності аналізів ($n=20$) (коефіцієнти варіації) становили 3,4 %, 4,5 % та 3,5 %, відповідно, на верхніх рівнях, вказуючи на прийнятну точність при усіх випробуваних концентраціях гепсидину-25.

Для визначення регенерації синтезованого білка гепсидину-25, який додавали до людської сироватки, синтезований білок гепсидину-25 додавали до чотирьох різних зразків людської сироватки (кожен з яких містив дуже низькі концентрації ендogenous гепсидину-25) з концентрацією 250 мкг/л, 25 мкг/л, 2,5 мкг/л та 0,25 мкг/л, відповідно. Ці зразки аналізували із застосуванням імунологічного MSD сендвіч-аналізу. Середні значення (середнє квадратичне відхилення) становили 287 (6) мкг/л, 24,2 (0,2) мкг/л, 2,0 (0,1) мкг/л та 0,23 (0,01) мкг/л, відповідно, вказуючи на 80-120 % регенерацію при усіх випробуваних рівнях гепсидину-25.

Нормальний діапазон імунологічного MSD сендвіч-аналізу встановили шляхом випробування 100 зразків сироватки від нормальних здорових волонтерів (50 чоловіків і 50 жінок). Значення гепсидину-25 у цих зразках становили від $<0,02$ мкг/л до 25 мкг/л, із середнім

значенням $3,0 \pm 0,5$ мкг/л, що відповідало рівням гепсидину-25, які були встановлені для нормальних людей із застосуванням LC/MS аналізів, про які раніше повідомляли (дивись Murphy, et al., Blood, 110:1048-1054 (2007)).

Інтерес становить те, що рівні гепсидину-25 у нормальних людей, як було встановлено, були значно ($p < 0,01$) нижчими у жінок ($1,8 \pm 0,4$ мкг/л) порівняно з чоловіками ($4,2 \pm 0,8$ мкг/л). Рівні гепсидину-25 у цих нормальних суб'єктів також порівнювали з концентраціями феритину у сироватці, і було встановлено, що вони прямо корелюють із рівнями феритину у сироватці ($r = 0,71$, $p < 0,001$) (дані не представлені).

І, нарешті, рівні гепсидину-25 у сироватці хворих на рак ($n = 34$) порівнювали з рівнями гепсидину-25 у сироватці нормальних здорових волонтерів ($n = 100$), кожен з яких визначали за допомогою імунологічного MSD сендвіч-аналізу. Результати цього порівняння показали, що рівні гепсидину-25 значно ($p < 0,001$) підвищені у хворих на рак ($70,9 \pm 10,4$ мкг/л) у порівнянні з нормальними контролями ($3,0 \pm 0,5$ мкг/л) (дані не представлені). Інтерес становить те, що групи пацієнтів як з гематологічними ($83,3 \pm 11,9$ мкг/л), так і з негематологічними ($58,4 \pm 17$ мкг/л) злоякісними процесами демонстрували значно підвищені рівні гепсидину-25 у порівнянні з нормальними контролями ($p < 0,001$ для обох), що дозволяє зробити припущення про те, що підвищені рівні гепсидину-25 можуть відігравати важливу роль у разі анемії, пов'язаної з раком (дані не представлені).

Порівняно з існуючими методами ELISA, які не є специфічними для гепсидину-25 і можуть перехресно реагувати з прогепсидином та іншими неприйнятними видами гепсидину, імунологічний MSD сендвіч-аналіз, опис якого наведений вище, специфічно і селективно визначає рівні гепсидину-25 у людській сироватці і добре корелює з описаним вище золотим стандартом діагностики, аналітичним методом LC/MS для гепсидину-25. Одна з переваг імунологічного MSD сендвіч-аналізу, порівняно з методом LC/MS, для визначення рівнів гепсидину у людській сироватці полягає у тому, що імунологічний MSD сендвіч-аналіз можна застосовувати у більшості клінічних лабораторій, які, як правило, не мають ні складного обладнання, ні досвідчених операторів з вузькою спеціалізацією для повсякденного здійснення аналізів типу LC/MS. Крім того, імунологічний MSD сендвіч-аналіз має потенціал для набагато більшої пропускної здатності, ніж LC/MS аналіз. Таким чином, імунологічний MSD сендвіч-аналіз являє собою метод, який можна застосовувати у повсякденній клінічній практиці для селективного визначення рівнів гепсидину-25 у людей.

ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Eli Lilly and Company

<120> СЕЛЕКТИВНІ АНТИТІЛА ПРОТИ РЕПСИДИНУ-25 ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> X18122

<150> 61/086557

<151> 2008-08-06

<150> PCT/US2009/052044

<151> 2009-07-29

<160> 90

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg
1 5 10 15

Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr
20 25

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 2

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys Leu Phe Cys Cys Lys Cys Cys Lys Asn
1 5 10 15

Ser Ser Cys Gly Leu Cys Cys Ile Thr
20 25

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Lys Cys Cys Asn Asn
1 5 10 15

Ser Gln Cys Gly Ile Cys Cys Lys Thr
20 25

<210> 4
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> macaca sp.

<400> 4

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg
 1 5 10 15

Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Arg Thr
 20 25

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 5

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys
 1 5

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа у положенні 6 - Val або Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа у положенні 8 - Tyr або Ser

<400> 6

Ser Ala Ser Ser Ser Xaa Ser Xaa Met Tyr
 1 5 10

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

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa у положенні 4 - Asn або His

<400> 7

Leu Thr Ser Xaa Leu Ala Ser

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa у положенні 6 - Asn, Gly або Tyr

<400> 8

Gln Gln Trp Ser Ser Xaa Pro Pro Thr

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 9

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 10

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 11

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
 1 5

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 12

Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Met Tyr
 1 5 10

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 13

Leu Thr Ser His Leu Ala Ser
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 14

Gln Gln Trp Ser Ser Gly Pro Pro Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 15

Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Met	Tyr
1				5					10

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 16

Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr
1				5				

<210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Хаа у положенні 9 - Ser, Arg або Pro

<400> 17

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Xaa	Asn	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Thr
1				5					10					15	

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Хаа у положенні 7 - Ser або Pro

<400> 18

Leu Val Ser Lys Leu Asp Xaa
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa у положенні 1 - Val, His, Ile або Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa у положенні 9 - Thr або Val

<400> 19

Xaa Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Xaa
1 5

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 20

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 21

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 22

Val Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 23

His Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 24

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 25

Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro
1 5

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 26

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Pro Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 27

Ile Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 28

Phe Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Val
1 5

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Хаа у положенні 2 - Phe, Tyr або Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Хаа у положенні 5 - Ser або Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Хаа у положенні 6 - Thr або Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)
 <223> Хаа у положенні 7 - Try або Pro

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа у положенні 9 - Ile або Phe

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Хаа у положенні 11 - Val або Ile

<400> 29

Gly Xaa Ser Leu Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Gly Xaa Gly
 1 5 10

<210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа у положенні 6 - Asp або Gly

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа у положенні 7 - Ala або Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа у положенні 9 - Ser або Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Хаа у положенні 13 - Ala або Thr

<400> 30

His Ile Trp Trp Asn Xaa Xaa Lys Xaa Tyr Asn Thr Xaa Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність


```

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Хаа у положенні 2 - Gly або His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Хаа у положенні 6 - Ser або Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Хаа у положенні 7 - Thr або Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Хаа у положенні 8 - Ser, Ala або Try
^
<400> 31

Ile Xaa Tyr Tyr Gly Xaa Xaa Xaa Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 32

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly Ile Gly Val Gly
1 5 10

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 33

His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Ser Tyr Asn Thr Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 34
<211> 12

```

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 34

Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 35

Gly Tyr Ser Leu Ser Thr Pro Gly Ile Gly Val Gly
1 5 10

<210> 36
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 36

His Ile Trp Trp Asn Asp Ala Lys Ser Tyr Asn Thr Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 37

Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ala Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 38

Gly Leu Ser Leu Ser Thr Pro Gly Ile Gly Val Gly
1 5 10

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 39

Gly Phe Ser Leu Asn Ser Tyr Gly Phe Gly Ile Gly
1 5 10

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 40

His Ile Trp Trp Asn Gly Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 41

Ile His Tyr Tyr Gly Asn Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 42

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser
1 5 10

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 43

Thr Ile Ile Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 44

Asp Gly Tyr Ile His
1 5

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 45

Ser Ala Ser Pro Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 46
<211> 106
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)

<223> Хаа у положенні 1 - Asp або Gln

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Хаа у положенні 3 - Leu або Gln

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Хаа у положенні 4 - Leu або Met

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Хаа у положенні 5 - Thr або Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Хаа у положенні 27 - Ser або Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Хаа у положенні 29 - Val або Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Хаа у положенні 31 - Tyr або Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (52)..(52)

<223> Хаа у положенні 52 - Asn або His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (59)..(59)

<223> Хаа у положенні 59 - Ala або Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (76)..(76)

<223> Хаа у положенні 76 - Ser або Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (93)..(93)

<223> Хаа у положенні 93 - Asn, Tyr або Gly

<400> 46

Xaa	Ile	Xaa	Xaa	Xaa	Gln	Ser	Pro	Ala	Leu	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Xaa Ser Xaa Ser Xaa Met
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Xaa Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Xaa Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 47
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa у положенні 1 - Glu або Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa у положенні 3 - Lys або Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa у положенні 5 - Lys або Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa у положенні 6 - Gln або Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> Xaa у положенні 27 - Phe, Tyr або Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> Xaa у положенні 30 - Ser або Asn

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> Хаа у положенні 31 - Thr або Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> Хаа у положенні 32 - Tyr або Pro

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> Хаа у положенні 34 - Ile або Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (36)..(36)
<223> Хаа у положенні 36 - Val або Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> Хаа у положенні 43 - Ala або Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(51)
<223> Хаа у положенні 51 - Ala або Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> Хаа у положенні 57 - Asp або Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58)..(58)
<223> Хаа у положенні 58 - Asn або Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (60)..(60)
<223> Хаа у положенні 60 - Ser або Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (64)..(64)
<223> Хаа у положенні 64 - Ala або Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (87)..(87)
<223> Хаа у положенні 87 - Val або Leu

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89)..(89)
<223> Хаа у положенні 89 - Thr або Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (90)..(90)
<223> Хаа у положенні 90 - His або Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (97)..(97)
<223> Хаа у положенні 97 - Val або Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (98)..(98)
<223> Хаа у положенні 98 - Leu або Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (100)..(100)
<223> Хаа у положенні 100 - Gly або His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (104)..(104)
<223> Хаа у положенні 104 - Ser або Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (105)..(105)
<223> Хаа у положенні 105 - Thr або Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (106)..(106)
<223> Хаа у положенні 106 - Ser, Ala або Tyr

<400> 47

Xaa Val Xaa Leu Xaa Xaa Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1          5          10          15

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

Gly Xaa Gly Xaa Gly Trp Ile Arg Gln Pro Xaa Gly Lys Gly Leu Glu
35          40          45

Trp Leu Xaa His Ile Trp Trp Asn Xaa Xaa Lys Xaa Tyr Asn Thr Xaa
50          55          60

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

```


Phe Leu Lys Ile Ala Ser Xaa Asp Xaa Xaa Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Xaa Xaa Ile Xaa Tyr Tyr Gly Xaa Xaa Xaa Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 48

<211> 106

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 48

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 49

<211> 122

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 49

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

<210> 50
<211> 106
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетичний конструкт
<400> 50

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

<210> 51
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>

<223> Синтетичний конструктор

<400> 51

```

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

```

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструктор

<400> 52

```

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

```

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 53
<211> 106
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 53

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

<210> 54
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 54

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

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
65 70 75 80
Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr His Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Val Val Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ala Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 55
<211> 106
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 55

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

<210> 56
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 56

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

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

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

Trp Leu Thr His Ile Trp Trp Asn Gly Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Thr
50 55 60

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

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Leu Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Leu Ile His Tyr Tyr Gly Asn Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 57
<211> 112
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> Хаа у положенні 32 - Ser, Arg або Pro

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (61)..(61)
<223> Хаа у положенні 61 - Ser або Pro

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (94)..(94)
<223> Хаа у положенні 94 - Val, His, Ile або Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (102)..(102)
<223> Хаа у положенні 102 - Thr або Val

<400> 57

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Xaa
20 25 30

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

<210> 58
<211> 114
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 58

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

Ser Ala

<210> 59
<211> 112
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструктор

<400> 59

```

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

```

<210> 60

<211> 112

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструктор

<400> 60

```

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

```


<210> 61
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 61

```

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

<210> 62
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 62

```

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Ile Gln Gly
85 90 95

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 63
<211> 112
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 63

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Pro
20 25 30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Phe Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 64
<211> 213
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Хаа у положенні 1 - Asp або Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Хаа у положенні 3 - Leu або Gln

<220>

<221> MISC FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Хаа у положенні 4 - Leu або Met

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа у положенні 5 - Thr або Asn

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Хаа у положенні 27 - Ser або Pro

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Хаа у положенні 29 - Val або Ala

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Хаа у положенні 31 - Tyr або Ser

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (52)..(52)
 <223> Хаа у положенні 52 - Asn або His

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (59)..(59)
 <223> Хаа у положенні 59 - Ala або Pro

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (76)..(76)
 <223> Хаа у положенні 76 - Ser або Asn

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (93)..(93)
 <223> Хаа у положенні 93 - Asn, Tyr або Gly

<400> 64

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

Leu Thr Ser Xaa Leu Ala Ser Gly Val Pro Xaa Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Xaa Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Xaa Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 100 105 110
 Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
 130 135 140
 Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
 145 150 155 160
 Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
 180 185 190
 Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 65
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа у положенні 1 - Glu або Gln

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Хаа у положенні 3 - Lys або Gln

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа у положенні 5 - Lys або Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Хаа у положенні 6 - Gln або Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> Хаа у положенні 27 - Phe, Tyr або Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> Хаа у положенні 30 - Ser або Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> Хаа у положенні 31 - Thr або Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> Хаа у положенні 32 - Tyr або Pro

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> Хаа у положенні 34 - Ile або Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (36)..(36)
<223> Хаа у положенні 36 - Val або Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> Хаа у положенні 43 - Ala або Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(51)
<223> Хаа у положенні 51 - Ala або Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> Хаа у положенні 57 - Asp або Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58)..(58)
<223> Хаа у положенні 58 - Asn або Ala

<220>

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (60)..(60)
<223> Хаа у положенні 60 - Ser або Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (64)..(64)
<223> Хаа у положенні 64 - Ala або Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (87)..(87)
<223> Хаа у положенні 87 - Val або Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89)..(89)
<223> Хаа у положенні 89 - Thr або Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (90)..(90)
<223> Хаа у положенні 90 - His або Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (97)..(97)
<223> Хаа у положенні 97 - Val або Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (98)..(98)
<223> Хаа у положенні 98 - Leu або Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (100)..(100)
<223> Хаа у положенні 100 - Gly або His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (104)..(104)
<223> Хаа у положенні 104 - Ser або Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (105)..(105)
<223> Хаа у положенні 105 - Thr або Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (106)..(106)
<223> Хаа у положенні 106 - Ser, Ala або Try

<400> 65

```

Xaa	Val	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Xaa	Ser	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	20	25	30	
Gly	Xaa	Gly	Xaa	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Xaa	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	35	40	45	
Trp	Leu	Xaa	His	Ile	Trp	Trp	Asn	Xaa	Xaa	Lys	Xaa	Tyr	Asn	Thr	Xaa	50	55	60	
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Asn	Asn	Gln	Val	65	70	75	80
Phe	Leu	Lys	Ile	Ala	Ser	Xaa	Asp	Xaa	Xaa	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Xaa	Xaa	Ile	Xaa	Tyr	Tyr	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	100	105	110	
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	115	120	125	
Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	130	135	140	
Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	145	150	155	160
Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	165	170	175	
Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	180	185	190	
Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	195	200	205	
Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	210	215	220	
Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	225	230	235	240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	245	250	255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	260	265	270	
Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	275	280	285	
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	290	295	300	

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
 305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
 340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
 355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
 405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
 420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 66
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 66

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 67
<211> 446
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 67

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Ser Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

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

Cys Val Val Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro				
		115					120					125							
Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met				
	130					135					140								
Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr				
145					150					155					160				
Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro				
				165					170					175					
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val				
			180					185					190						
Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His				
		195					200					205							
Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys				
	210					215					220								
Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe				
225					230					235					240				
Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro				
				245					250					255					
Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val				
			260					265					270						
Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr				
		275					280					285							
Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu				
	290					295					300								
Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys				
305					310					315					320				
Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser				
				325					330					335					
Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro				
			340					345					350						
Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile				
		355					360					365							
Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly				
	370					375					380								
Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asp	Thr	Asp				
385					390					395					400				
Gly	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp				
				405					410					415					

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 68

<211> 213

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 68

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 69
<211> 446
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 69

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr	Ser	Leu	Ser	Thr	Pro	20	25	30	
Gly	Ile	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ala	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	35	40	45	
Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asn	Asp	Ala	Lys	Ser	Tyr	Asn	Thr	Ala	50	55	60	
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Asn	Asn	Gln	Val	65	70	75	
Phe	Leu	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Asp	Thr	Thr	His	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	85	90	95	
Cys	Val	Val	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Thr	Ala	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	100	105	110	
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	115	120	125	
Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	130	135	140	
Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	145	150	155	
Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	165	170	175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	180	185	190	
Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	195	200	205	
Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	210	215	220	

Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe
225					230					235					240
Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro
				245					250					255	
Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val
			260					265					270		
Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr
		275					280					285			
Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu
	290					295					300				
Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys
305					310					315					320
Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
				325					330					335	
Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro
			340					345					350		
Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile
		355					360					365			
Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly
	370					375					380				
Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asp	Thr	Asp
385					390					395					400
Gly	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp
			405						410					415	
Glu	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His
			420					425					430		
Asn	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Lys		
		435					440					445			
<210>	70														
<211>	213														
<212>	PRT														
<213>	Штучна послідовність														
<220>															
<223>	Синтетичний конструкт														
<400>	70														
Gln	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Leu	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Pro Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Leu Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Gly Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 100 105 110
 Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
 130 135 140
 Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
 145 150 155 160
 Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
 180 185 190
 Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 71
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 71

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

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Leu Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Gly Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 100 105 110
 Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
 130 135 140
 Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
 145 150 155 160
 Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
 180 185 190
 Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 72
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 72

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

Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asn	Asp	Ala	Lys	Ser	Tyr	Asn	Thr	Ala	50	55	60
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Asn	Asn	Gln	Val	65	70	75
Phe	Leu	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Asp	Thr	Thr	His	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	85	90	95
Cys	Val	Val	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Thr	Ala	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	100	105	110
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	115	120	125
Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	130	135	140
Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	145	150	155
Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	165	170	175
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	180	185	190
Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	195	200	205
Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	210	215	220
Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	225	230	235
Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	245	250	255
Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	260	265	270
Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	275	280	285
Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	290	295	300
Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	305	310	315
Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	325	330	335
Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	340	345	350

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
355 360 365

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
405 410 415

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 73
<211> 213
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 73

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Met
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
 145 150 155 160
 Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
 180 185 190
 Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 74
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 74

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Phe Gly Ile Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Thr His Ile Trp Trp Asn Gly Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Thr
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Lys Ile Ala Ser Leu Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Leu Ile His Tyr Tyr Gly Asn Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro
 115 120 125
 Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met
 130 135 140
 Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

[illegible]

<212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетичний конструкт

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Хаа у положенні 32 - Ser, Arg або Pro

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (61)..(61)
 <223> Хаа у положенні 61 - Ser або Pro

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94)..(94)
 <223> Хаа у положенні 94 - Val, His, Ile або Phe

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (102)..(102)
 <223> Хаа у положенні 102 - Thr або Val

 <400> 75

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

 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Xaa
 20 25 30

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

 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Xaa Gly Val Pro
 50 55 60

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

 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Xaa Gln Gly
 85 90 95

 Ser His Phe Pro Trp Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215
 <210> 76
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 76
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ile Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Asn
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asp Asp Gly Tyr Ile His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly
 115 120 125
 Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
 130 135 140
 Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu
 145 150 155 160

Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr
165 170 175

Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu
180 185 190

Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
210 215 220

Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
225 230 235 240

Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp
245 250 255

Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp
260 265 270

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
275 280 285

Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp
290 295 300

Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro
305 310 315 320

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala
325 330 335

Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp
340 345 350

Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile
355 360 365

Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn
370 375 380

Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys
385 390 395 400

Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys
405 410 415

Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu
420 425 430

Ser His Ser Pro Gly Lys
435

<210> 77
<211> 219

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 77

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1          5          10          15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20          25          30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35          40          45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50          55          60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Val Gln Gly
85          90          95
Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100         105         110
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115         120         125
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
130         135         140
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145         150         155         160
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165         170         175
Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
180         185         190
Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195         200         205
Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210         215

```

<210> 78
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 78

```

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
          20          25          30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
          50          55          60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys His Gln Gly
          85          90          95

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
          100          105          110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
          115          120          125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
          130          135          140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145          150          155          160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          165          170          175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
          180          185          190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
          195          200          205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
          210          215

```

<210> 79

<211> 219

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 79


```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1           5           10           15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20           25           30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35           40           45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Val Pro
50           55           60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys His Gln Gly
85           90           95
Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100          105          110
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115          120          125
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
130          135          140
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145          150          155          160
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165          170          175
Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
180          185          190
Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195          200          205
Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210          215

<210> 80
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 80
Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1           5           10           15

```

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Pro
 20 25 30
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Ile Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 81
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 81

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

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Phe Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 82
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 82

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 Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Leu Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

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

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

Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

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

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

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

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

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 83
<211> 443
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 83

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

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

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

Gly Asn Phe His Pro Tyr Leu Gly Val Thr Asn Tyr Val Glu Lys Phe
50 55 60

Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	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	Gly	Gly	Thr	Gly	Ser	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	100	105	110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	115	120	125	
Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	130	135	140	
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	145	150	155	160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	165	170	175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	180	185	190	
Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	195	200	205	
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	210	215	220	
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	225	230	235	240
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	245	250	255	
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	260	265	270	
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	275	280	285	
Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	290	295	300	
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	305	310	315	320
Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	325	330	335	
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	340	345	350	
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	355	360	365	

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<210> 84
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 84

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 Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Leu Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Arg Thr Ser Thr Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro
 85 90 95
 Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

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

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 85

<211> 443

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 85

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

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

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

Gly Asn Phe His Pro Tyr Leu Gly Val Thr Asn Tyr Leu Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala 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 Gly Gly Thr Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

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

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

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

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 86

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys
1 5

<210> 87
<211> 26
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 87

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Gly Pro Gly Pro Gly Ile Ser Gln Ala
1 5 10 15

Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu
20 25

<210> 88
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met
1 5 10 15

Cys Cys Lys Thr
20

<210> 89
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys
1 5 10 15

Gly Met Cys Cys Lys Thr
20

<210> 90
<211> 61
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

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

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Моноклональне антитіло, яке селективно зв'язує людський гепсидин-25, що складається з амінокислотної послідовності, представленої послідовністю SEQ ID NO:1, та яке містить шість CDR, що вибрані з групи, яку складають:
 - (i) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 9, 10, 11, 32, 33 та 34, відповідно;
 - 10 (ii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 12, 13, 14, 35, 36 та 37, відповідно;
 - (iii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 45, 13, 14, 35, 36 та 37, відповідно;
 - (iv) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 12, 13, 14, 38, 36 та 37, відповідно;
 - 15 (v) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 15, 10, 16, 39, 40 та 41, відповідно;
 - (vi) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 20, 21, 22, 42, 43 та 44, відповідно;
 - 20 (vii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 20, 21, 23, 42, 43 та 44, відповідно;
 - (viii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 24, 25, 23, 42, 43 та 44, відповідно;
 - (ix) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 26, 25, 27, 42, 43 та 44, відповідно;
 - 25 (x) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDK3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 26, 25, 28, 42, 43 та 44, відповідно;
 - (xi) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 6, 7, 8, 29, 30 та 31, відповідно; та
 - 30 (xii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 17, 18, 19, 42, 43 та 44, відповідно.
2. Антитіло за п. 1, яке селективно зв'язує людський гепсидин-25, що складається з амінокислотної послідовності, представленої послідовністю SEQ ID NO: 1, з K_D від приблизно 50 nM до приблизно 800 pM при визначенні засобами поверхневого плазмонного резонансу (SPR) при температурі 25 °C.
- 35 3. Антитіло за будь-яким із пп 1-2, яке зв'язує прогепсидин та людський гепсидин-20 зі значенням K_D , яке є у щонайменше приблизно 10 разів більшим за значення, з яким згадане антитіло зв'язує людський гепсидин-25, при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C.
4. Антитіло за будь-яким із пп. 1-3, яке зв'язує прогепсидин та людський гепсидин-20 зі значенням K_D , яке є у щонайменше 50 разів більшим за значення, з яким згадане антитіло зв'язує людський гепсидин-25, при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C.
- 40 5. Антитіло за будь-яким із пп. 1-4, яке зв'язує прогепсидин та людський гепсидин-20 зі значенням K_D , яке є у щонайменше 100 разів більшим за значення, з яким згадане антитіло зв'язує людський гепсидин-25, при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C.
- 45 6. Антитіло за будь-яким із пп. 1-5, яке зв'язує людський гепсидин-22 зі значенням K_D , більшим за приблизно 200 nM, при визначенні засобами SPR при температурі 25 °C.
7. Антитіло за будь-яким із пп. 1-6, яке зв'язує мишачий або пацючий гепсидин-25, що складається з амінокислотної послідовності, представленої, відповідно, послідовністю SEQ ID

NO: 3 або 2, зі значенням K_D , меншим за приблизно 500 нМ, при визначенні засобами SPR при температурі 25 °С.

8. Антитіло за будь-яким із пп. 1-7, яке являє собою фрагмент антитіла, який містить антигензв'язувальну частину та зберігає антигензв'язувальну здатність.

5 9. Антитіло за будь-яким із пп. 1-8, яке містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR) та варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), де:

(i) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності,

представлені послідовностями SEQ ID NO: 48 та 49, відповідно;

10 (ii) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 50 та 51, відповідно;

(iii) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 52 та 51, відповідно;

(iv) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 53 та 54, відповідно;

15 (v) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 55 та 56, відповідно;

(vi) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 59 та 58, відповідно;

(vii) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 60 та 58, відповідно;

20 (viii) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 61 та 58, відповідно;

(ix) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 62 та 58, відповідно;

25 (x) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 63 та 58, відповідно;

(xi) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 46 та 47, відповідно; або

(xii) поліпептиди LCVR та HCVR мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 57 та 58, відповідно.

30 10. Антитіло за будь-яким з пп. 1-9, яке містить важкий ланцюг та легкий ланцюг, які мають (i) амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 67 та 66, відповідно; (ii)

амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 69 та 68, відповідно; (iii) амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 69 та 70, відповідно;

35 (iv) амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 72 та 71, відповідно; (v) амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 74 та 73, відповідно; (vi) амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 76 та 77, відповідно; (vii) амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 76

та 78, відповідно; (viii) амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 76 та 79, відповідно; (ix) амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID

40 NO: 76 та 80, відповідно; або (x) амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 76 та 81, відповідно.

11. Антитіло за будь-яким із пп. 1-10 для застосування у терапії.

12. Застосування антитіла за будь-яким із пп. 1-10 для виготовлення лікарського засобу для

45 лікування або запобігання анемії.

13. Антитіло за будь-яким із пп. 1-10 для застосування у способі підвищення рівнів заліза у сироватці, кількості ретикулоцитів, кількості еритроцитів, рівнів гемоглобіну та/або гематокриту у людини.

14. Застосування антитіла за будь-яким із пп. 1-10 для виготовлення лікарського засобу для

50 підвищення рівнів заліза у сироватці, кількості ретикулоцитів, кількості еритроцитів, рівнів гемоглобіну та/або гематокриту у людини.

15. Спосіб кількісного визначення білка гепсидину-25 у зразку тканини або біологічної рідини, який включає:

55 (i) сенсibiliзацію твердої основи (а) першим антитілом за будь-яким із підпунктів (vi)-(x) будь-яких з пп. 1, 9 та 10 або (b) першим антитілом, що зв'язує антигенну детермінанту, яка міститься між амінокислотами 5 та 25, включно, послідовності SEQ ID NO: 1;

(ii) нанесення зразка на згадану сенсibiliзовану антитілом тверду основу;

(iii) видалення незв'язаного зразка;

60 (iv) якщо першим антитілом на етапі (i) є (а), нанесення на тверду основу другого антитіла, що зв'язує антигенну детермінанту, яка міститься між амінокислотами 5 та 25, включно,

послідовності SEQ ID NO: 1, або, якщо першим антитілом на етапі (i) є (b), нанесення на тверду основу другого антитіла за будь-яким із підпунктів (vi)-(x) будь-яких з пп. 1, 9 та 10;

(v) видалення незв'язаного другого антитіла; та

(vi) виявлення кількості гепсидину-25, зв'язаного з другим антитілом у згаданому зразку, кількісним, напівкількісним або якісним способом.

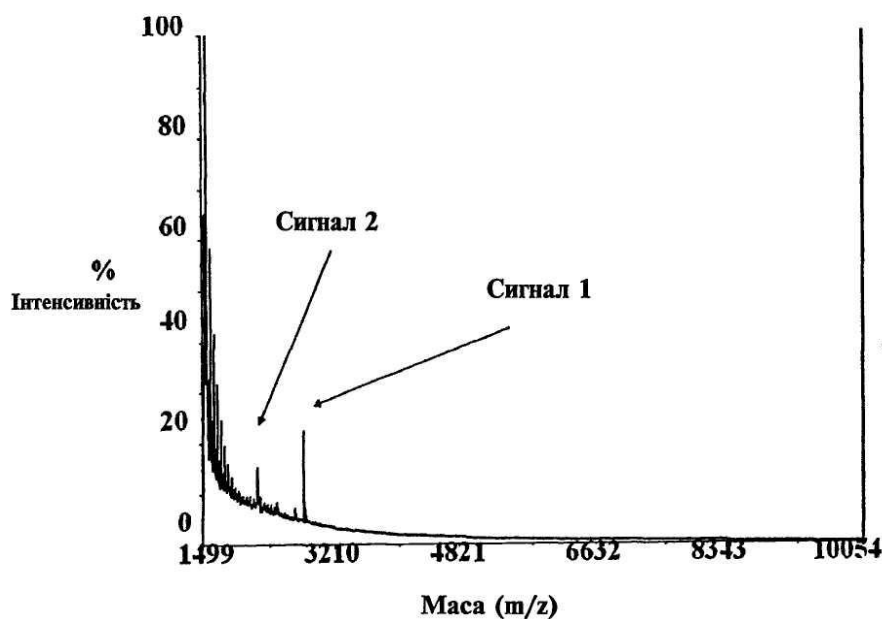
16. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що перше антитіло містить LCVR та HCVR, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 82 та 83, відповідно.

17. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що друге антитіло містить LCVR та HCVR, які мають амінокислотні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 82 та 83, відповідно.

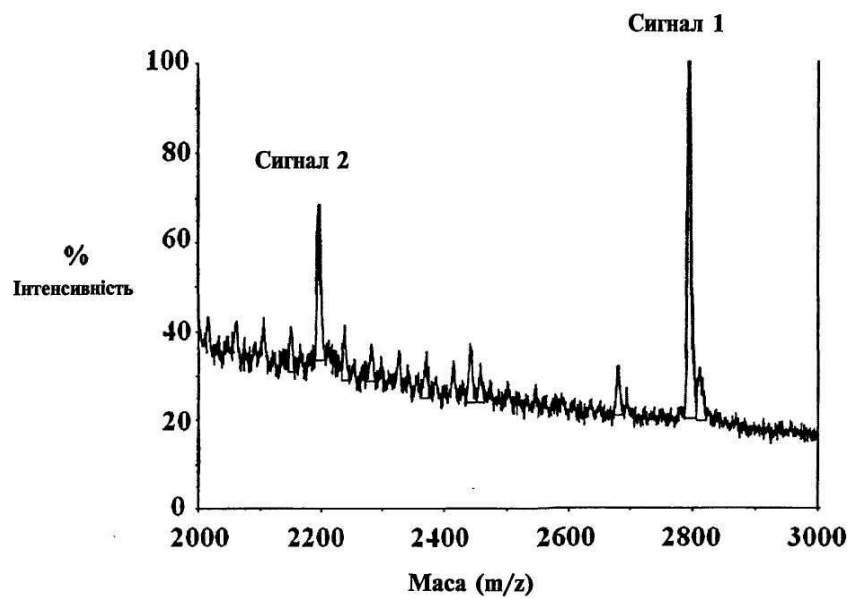
18. Спосіб за будь-яким із пп. 15-17, який **відрізняється** тим, що лише перше або друге антитіло мітять виявною міткою.

19. Спосіб за будь-яким із пп. 15-18, який **відрізняється** тим, що згадане виявлення є непрямим.

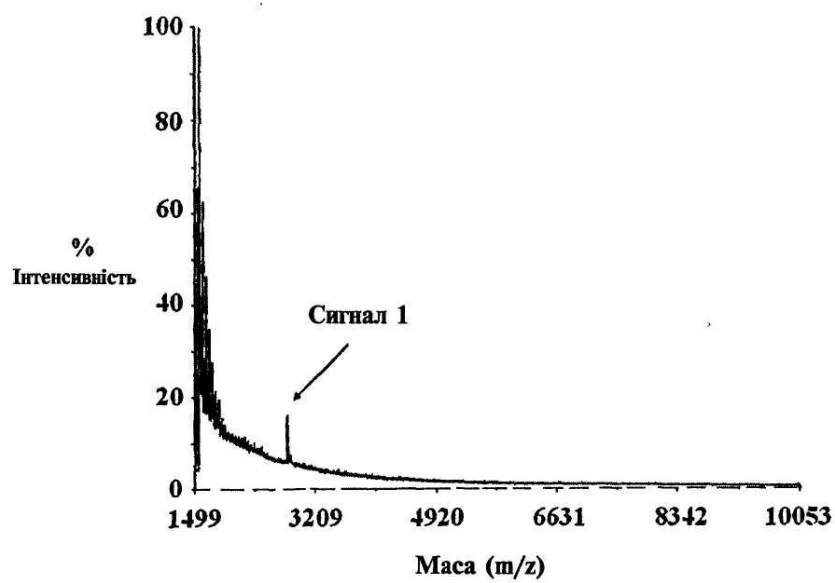
20. Спосіб за будь-яким із пп. 15-19, який **відрізняється** тим, що згаданим зразком є кров, плазма, сироватка, сеча, цереброспінальна рідина (CSF), амніотична рідина, слина, піт, асцитична рідина, лімфа, вміст кістки, грудне молоко, ранева рідина або їх похідні, і тим, що згаданий зразок вводять в контакт зі згаданим антитілом у імуноферментному аналізі (EIA), твердофазному імуноферментному аналізі (ELISA), сендвіч-ELISA, радіоімуноаналізі, реакції преципітації або імунофлуоресцентному аналізі.



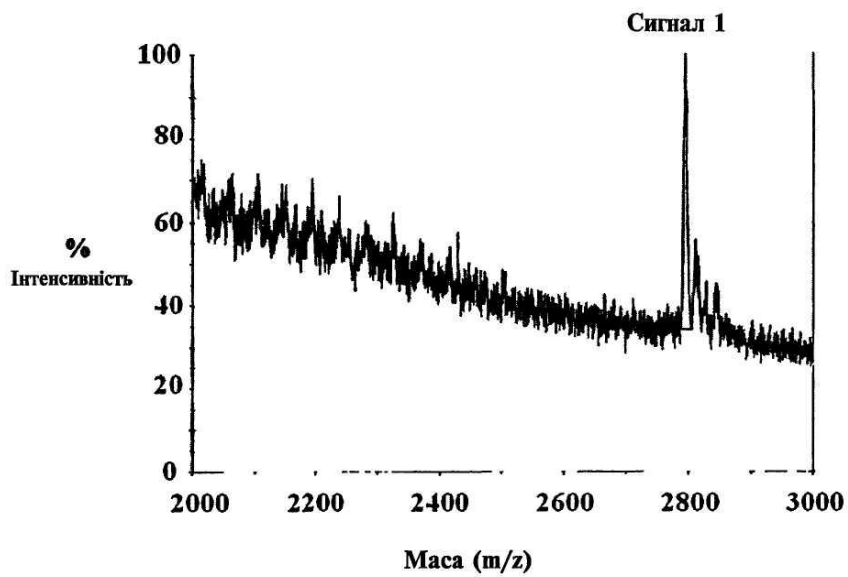
ФІГ. 1



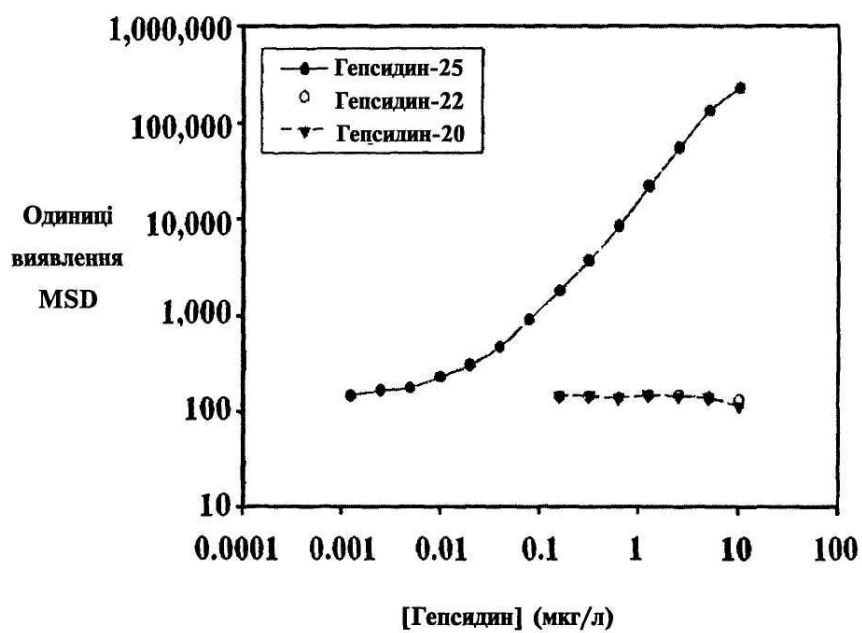
ФІГ. 2



ФІГ. 3



ФІГ. 4



ФІГ. 5

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601