

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **031047**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.11.30

(21) Номер заявки
201491996

(22) Дата подачи заявки
2013.04.29

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(54) АНТАГОНИСТЫ ST2L И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/640,238; 61/640,407; 13/798,204;
13/798,226

(32) 2012.04.30; 2012.04.30; 2013.03.13;
2013.03.13

(33) US

(43) 2015.04.30

(86) PCT/US2013/038637

(87) WO 2013/165894 2013.11.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Даффи Карен, Хили Кэтрин,
Лэмб Роберта, Малавия Рави,
Пратта Майкл, Фурсов Натали, Ло
Цзиньцюань, Насо Майкл, Торнетта
Марк, Уилер Джон, У Шэн-Дзюн,
Холл ЛеРой (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2001021641
US-A1-20030190311
US-A1-20100260770
LINGEL A et al. Structure Of IL-33 and Its
Interaction With The ST2 And IL-1RAcP Receptors -
Insight Into Heterotrimeric IL-1 Signaling Complexes.
Structure. 14 October 2009, vol. 17, pp 1398-1410;
page 1398, right column, third paragraph; page 1407,
left column, third paragraph to page 1407, right
column, first paragraph; page 1408, figure 7a. DOI
10.1016/j.str.2009.08.009.
WO-A2-2008022295
WO-A2-2006055347
WO-A2-2000069914
WO-A1-2010080833

(57) Изобретение относится к антагонистам ST2L, полинуклеотидам, кодирующим антагонисты или их фрагменты, а также к способам получения и использования указанных продуктов.

B1

031047

**031047
B1**

Перекрестные ссылки на смежные заявки

Настоящая заявка испрашивает преимущество заявки на патент США сер. № 13/798204, поданной 13 марта 2013 г., заявки на патент США сер. № 13/798226, поданной 13 марта 2013 г., предварительной заявки на патент США № 61/640407, поданной 30 апреля 2012 г., и предварительной заявки на патент США № 61/640238, поданной 30 апреля 2012 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ путем ссылки.

Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к антагонистам ST2L, полинуклеотидам, кодирующим антагонисты или их фрагменты, а также к способам получения и применения указанных продуктов.

Предпосылки создания изобретения

ST2L (IL-1RL1 или IL-33R α) входит в семейство рецепторов Toll/IL-1 и экспрессируется на поверхности широкого спектра иммунных клеток, включая Т-клетки, естественные киллерные клетки и естественные Т-киллерные клетки (NK/NKT), базофильные клетки, эозинофилы, мастоциты и недавно описанные врожденные не-В/не-Т-лимфоидные клетки 2-го типа, нециты и естественные хелперные клетки. Экспрессия ST2L также может быть индуцирована в дендритных клетках (DC), макрофагах и нейтрофилах. ST2L может снижать реакционную способность Toll-подобных рецепторов TLR2, TLR4 и TLR9, но также может индуцировать высвобождение цитокинов 2-го типа в результате активации рецептора лигандом интерлейкином-33 и связывания со вспомогательным белком IL-1RAcP. IL-33 описывают как "алармин", поскольку его полная форма находится в ядрах клеток эпителия и эндотелия в процессе гомеостаза, но может расщепляться и высвобождаться в процессе некроза.

Для ST2L-сигнализации необходимо связывание вспомогательного белка IL-1RAcP с предварительно образовавшимся комплексом ST2L/IL-33. Вспомогательный белок IL-1RAcP также входит в сигнальный комплекс IL-1 α/β . Были предложены модели взаимодействий ST2L, IL-33 и IL-1RAcP, а также взаимодействий между IL-1R1 и IL-1RAcP (Lingel et al., Cell 17:1398-1410, 2009 г.; Wang et al., Nat Immunol 11:905-11, 2010 г.). Недавно было показано, что ST2L/IL-33/IL-1RAcP образуют на мастоцитах сигнальный комплекс с c-Kit, рецептором фактора стволовых клеток (SCF). IL-33 индуцировал в первичных мастоцитах SCF-зависимую продукцию цитокинов (Drube et al., Blood 115:3899-906, 2010 г.).

Активация ST2L приводит к гипертрофированным ответам, связанным с цитокинами 2-го типа (особенно IL-5 и IL-13), активации мастоцитов и эозинофилов и гиперреактивности дыхательных путей, а также известно, что она усиливает ответы клеток Th1 и Th7 через индукцию высвобождения интерферона IFN γ из клеток NKT, а также IL-1 β и IL-6 из мастоцитов. С нарушением регуляции пути ST2L/IL-33 связаны различные иммуноопосредованные заболевания, включая астму, ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, атопический дерматит, аллергический ринит, полипоз носа и системный склероз (обзор представлен в публикациях Palmer and Gabay, Nat Rev Rheumatol 7:321-9, 2011 г., и Lloyd, Curr Opin Immunol 22:800-6, 2010 г.; Shimizu et al., Hum Molec Gen 14:2919-27, 2005 г., Kamekura et al., Clin Exp Allergy 42:218-28, 2012 г.; Manetti et al., Ann Rheum Dis 69:598-605, 2010 г.).

Таким образом, существует потребность в антагонистах ST2L, подходящих для применения при лечении ST2L-опосредованных заболеваний и расстройств.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлено ингибирование гиперреактивности дыхательных путей при помощи mAb CNTO3914, связывающихся с доменом I рецептора ST2L, на модели легочного воспаления, индуцированного интраназальным введением IL-33, в сравнении с изотипическим контролем CNTO5516. Пиковую устойчивость дыхательных путей измеряли при введении увеличивающихся доз (мг/мл) метахолина (MCH). **p<0,05 для сравнения групп CNTO3914/IL-33 и CNTO5516/IL-33; и ***p<0,001 для сравнения группы CNTO3914/IL-33 и группы, получавшей PBS и IL-33.

На фиг. 2 представлено ингибирование рекрутинга клеток бронхоальвеолярного лаважа (BAL) посредством mAb CNTO3914, связывающихся с доменом I рецептора ST2L, на модели легочного воспаления, индуцированного интраназальным введением IL-33, в сравнении с изотипическим контролем CNTO5516. ***p<0,001.

На фиг. 3 представлено дозозависимое ингибирование высвобождения мышинной протеазы мастоцитов 1 (MMCP-1) посредством mAb CNTO3914, связывающихся с доменом I рецептора ST2L, в бесклеточной текучей среде BAL на модели легочного воспаления, индуцированного интраназальным введением IL-33. **p<0,01, ***p<0,001, в сравнении с группой, получавшей CNTO5516 (изотипический контроль) и IL-33.

На фиг. 4 представлено ингибирование вызванного посредством IL-33 высвобождения GM-CSF (фиг. 4A), IL-5 (фиг. 4B) и TNF α (фиг. 4C) при помощи mAb CNTO3914, связывающихся с доменом I рецептора ST2L, в мышинных мастоцитах костномозгового происхождения *in vitro*. Используемые концентрации антител CNTO3914 показаны в мкг/мл, а концентрации IL-33 показаны в нг/мл в скобках.

На фиг. 5 представлено ингибирование вызванного IL-33 высвобождения простагландина D2 (PGD2) мастоцитами пуповинной крови человека при помощи mAb C2494 (STLM62), связывающихся с доменом I рецептора ST2L, при идентифицированных концентрациях IL-33 и C2494. MOX-PDG₂: меток-

силзамин-PGD₂.

На фиг. 6 представлено ингибирование высвобождения GM-CSF (фиг. 6А), IL-8 (фиг. 6В), IL-5 (фиг. 6С), IL-13 (фиг. 6D) и IL-10 (фиг. 6Е) при помощи идентифицированных концентраций (мкг/мл) mAb C2244 и C2494, связывающихся с доменом I рецептора ST2Ls, в мастоцитах пуповинной крови человека (hCBMC) в присутствии 1 нг/мл IL-33 в среде StemPro-34+100 нг/мл SCF (фактор стволовых клеток).

На фиг. 7 представлено влияние на высвобождение GM-CSF (фиг. 7А), IL-8 (фиг. 7В), IL-5 (фиг. 1С), IL-13 (фиг. 7D) и IL-10 (фиг. 7Е) идентифицированных концентраций (мкг/мл) mAb C2519 или C2521, связывающихся с доменом III рецептора ST2L, в мастоцитах пуповинной крови человека в присутствии 1 нг/мл IL-33 в среде StemPro-34 + 100 нг/мл SCF.

На фиг. 8 представлено влияние на высвобождение: А) GM-CSF; В) IL-8; С) IL-5; D) IL-13; и Е) IL-10 mAb C2494; связывающихся с доменом I рецептора ST2L, а также mAb ST2M48 (M48), ST2M49 (M49), ST2M50 (M50) и ST2M51 (M51), связывающихся с доменом III рецептора ST2L, в мастоцитах пуповинной крови человека (hCBMC) в присутствии 3 нг/мл IL-33 в среде RPMI/10% FCS+100 нг/мл SCF.

На фиг. 9 представлено среднее процентное (%) ингибирующее воздействие антител к ST2L, связывающихся с доменом I (D1) или доменом III (D3) ST2L, на высвобождение GM-CSF, IL-5, IL-8, IL-10 и IL-13 мастоцитами пуповинной крови человека при индукции IL-33 и SCF, как показано на фигуре, при использовании концентрации 50 или 2 мкг/мл каждого из испытуемых антител. Отрицательные значения указывают на процентную активацию.

На фиг. 10 представлены последовательности вариабельных участков тяжелых цепей (VH) и CDR-участков тяжелых цепей антител к ST2L, полученных из библиотек фаговых дисплеев и после последующих операций по созреванию аффинности.

На фиг. 11 представлены последовательности вариабельных участков легких цепей (VL) и CDR-участков легких цепей антител к ST2L, полученных из библиотек фаговых дисплеев и после последующих операций по созреванию аффинности.

На фиг. 12 представлены участки VH и VL и последовательности CDR-участков тяжелых цепей антител к ST2L, варианты STLM208, VH ST2H257, HCDR3.

На фиг. 13 представлены последовательности: А) VH и В) VL для антител к ST2L, полученных из библиотек фаговых дисплеев и после последующих операций по созреванию аффинности.

На фиг. 14 представлена картина антигенсвязывающих сайтов VH и VL антитела C2494, перенесенных на человеческие каркасы (перенесенные участки обозначены как HFA). Подчеркнуты участки Кабат CDR, а участки Чотиа HV обозначены пунктирными линиями над идентифицированными перенесенными участками HFA. Нумерация остатков VH и VL представлена в соответствии с Чотиа. Остатки, выделенные в VH серым цветом, в некоторых вариантах HFA не переносились. C2494 VH: SEQ ID NO: 48; C2494 VL: SEQ ID NO: 52.

На фиг. 15 представлены последовательности CDR-участков, адаптированных к человеческому каркасу (HFA) антител, полученных на основе C2494.

На фиг. 16 представлен: А) уровень антител CNTO3914 к ST2L в сыворотке; В) ингибирование рекутинга клеток в бронхоальвеолярном лаваже (BAL); С) ингибирование секреции IL-6 клетками цельной крови, стимулированными IL-33; D) ингибирование секреции MCP1 клетками цельной крови, стимулированными IL-33, при помощи CNTO3914 через 24 ч после введения в 6-часовой модели легочного воспаления, индуцированного интраназальным введением IL-33. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; Н/О = ниже предела детекции; @ = одна точка данных ниже предела детекции.

На фиг. 17 представлена конкуренция между различными антителами к ST2L. А) 30 нМ меченых Fab-фрагментов C2244 проверяли на конкуренцию с идентифицированными антителами за связывание с покрытием из ST2L-ECD в микролунках. Антитела C2244 конкурировали с C2494, но не с C2539. В) 10 нМ меченых антител C2494 проверяли на конкуренцию с идентифицированными антителами за связывание с покрытием из ST2L-ECD в микролунках. Антитела C2494 конкурировали с STLM208 и STLM213, но не с C2539.

На фиг. 18 представлена упрощенная карта Н/D обмена для человеческого ST2-ECD (SEQ ID NO: 119) в комплексе с Fab-фрагментами C2244. Участки, защищенные антителом, указаны обозначенной шкалой оттенков серого цвета. Сегменты, включающие остатки 18-31 (пунктирный прямоугольник) (соответствуют остаткам 35-48 полноразмерного ST2L последовательности SEQ ID NO: 1), были защищены посредством Fab-фрагментов. Участки, включающие остатки 71-100 (прямоугольник из сплошных линий) (соответствует остаткам 88-117 последовательности SEQ ID NO: 1), были сильно гликозилированы и не закрывались пептидами.

На фиг. 19 представлены константы скорости и аффинности для связывающегося с доменом I ST2L антитела применительно к вариантам ST2L, обозначенным на фигуре.

На фиг. 20 представлено ингибирование секреции: А) GM-CSF; В) IL-5; С) IL-8; D) IL-13 из первичных человеческих мастоцитов легких при помощи антитела к ST2L, называемого STLM208.

Изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложено выделенное человеческое или адаптированное к человеку антитело-антагонист или его фрагмент, специфически связывающееся с доменом I (SEQ ID NO: 9) человеческого ST2L.

В настоящем изобретении также предложены адаптированные к человеку антитела-антагонисты, специфически связывающиеся с человеческим ST2L, имеющие определенные последовательности переменных участков легких и тяжелых цепей или определенные последовательности, определяющие комплементарность участков легких и тяжелых цепей.

В настоящем изобретении также предложены человеческие или адаптированные к человеку антитела-антагонисты, специфически связывающиеся с человеческим ST2L в определенных участках-эпитопах и/или имеющие определенные характеристики, описанные в настоящем документе.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий переменные участки тяжелых цепей (VH) или переменные участки легких цепей (VL) настоящего изобретения.

В настоящем изобретении также предложен вектор, содержащий выделенный полинуклеотид настоящего изобретения.

В настоящем изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор настоящего изобретения.

В настоящем изобретении также предложен способ получения антитела настоящего изобретения, включающий культивирование клетки-хозяина настоящего изобретения и выделение антитела из клетки.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения или предотвращения ST2L-опосредованного заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенных антител настоящего изобретения требующему лечению пациенту в течение периода времени, достаточного для лечения или предотвращения ST2L-опосредованного заболевания.

В настоящем изобретении также предложен способ ингибирования ответа мастоцитов у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенных антител настоящего изобретения требующему лечению пациенту в течение периода времени, достаточного для ингибирования ответа мастоцитов.

В настоящем изобретении также предложен способ ингибирования у субъекта взаимодействия IL-33 и ST2L, включающий введение субъекту антитела, специфически связывающегося с доменом I ST2L, в количестве, достаточном для ингибирования взаимодействия IL-33 и ST2L.

Подробное описание изобретения

Все публикации, включая, без ограничений, патенты и патентные заявки, упоминаемые в данном описании, включены в настоящий документ путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе.

Следует понимать, что применяемые в настоящем документе термины используются только в целях описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и не являются ограничивающими. Все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой имеет отношение настоящее изобретение.

В настоящем документе описаны примеры способов и материалов, хотя для анализа настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе. При описании и изложении формулы настоящего изобретения будут использованы следующие термины.

При использовании в настоящем документе термин "антагонист" означает молекулу, которая частично или полностью ингибирует биологическую активность ST2L по любому механизму. Примерами антагонистов являются антитела, слитные белки, пептиды, пептидомиметики, нуклеиновые кислоты, олигонуклеотиды и малые молекулы. Антагонисты можно выявлять с использованием анализов биологической активности ST2L, описанных ниже. Антагонисты ST2L могут ингибировать измеренную биологическую активность ST2L на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

Термин "ST2L", или "huST2L", или "человеческий ST2L" относится к человеческому ST2L-полипептиду с аминокислотной последовательностью, представленной в GenBank Acc. № NP 057316. Последовательность SEQ ID NO: 1 демонстрирует аминокислотную последовательность полноразмерного человеческого ST2L. При использовании в настоящем документе "внеклеточный домен ST2L", "ST2L-ECD" или "huST2L-ECD" означает полипептид, имеющий аминокислоты 19-328 последовательности SEQ ID NO: 1. huST2L-ECD имеет три иммуноглобулин-подобных домена типа C2, охватывающих остатки 19-122 (домен I, SEQ ID NO: 9), остатки 123-202 (домен II, SEQ ID NO: 10) и остатки 209-324 (домен III, SEQ ID NO: 11) последовательности SEQ ID NO: 1. "Домен I", или "домен I ST2L", или "домен I huST2L", или "D1" относится к первому иммуноглобулин-подобному домену на человеческом ST2L с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 9. "Домен III" или "домен III ST2L" означает третий

иммуноглобулин-подобный домен на человеческом ST2L с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 11.

При использовании в настоящем документе термин "IL-33" включает в себя полноразмерный IL-33 (GenBank Acc. № NP 254274 SEQ ID NO: 3), его варианты и активные формы. Варианты IL-33 включают в себя белки с аминокислотными последовательностями, представленными в GenBank Acc. № NP 001186569 и GenBank Acc. № NP 001186570). Активные формы IL-33 включают в себя "зрелый IL-33", имеющий остатки 112-270 последовательности SEQ ID NO: 3. Дополнительные активные формы включают в себя фрагменты IL-33, имеющие остатки 11-270, 115-270, 95-270, 99-270 или 109-270 последовательности SEQ ID NO: 3 (LeFrancais et al., Proc Natl Acad Sci (USA) 109:1673-8, 2012 г.), или любую форму или комбинацию форм, выделенных из клеток, эндогенно экспрессирующих IL-33. "Активная форма IL-33" представляет собой фрагмент или вариант IL-33 последовательности SEQ ID NO: 3, индуцирующий биологическую активность ST2L.

При использовании в настоящем документе термин "антитела" применяется в широком смысле и включает в себя молекулы иммуноглобулина, включая поликлональные антитела, моноклональные антитела, включая мышиные, человеческие, адаптированные к человеку, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, фрагменты антител, биспецифические или мультиспецифические антитела, образованные на основе по меньшей мере двух интактных антител или фрагментов антител, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, а также одноцепочечные антитела.

Иммуноглобулины делятся на пять больших классов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоформы IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. На основе аминокислотной последовательности константных доменов легкие цепи антитела любого вида позвоночных можно отнести к одному из двух четко выделенных типов: каппа (κ) и лямбда (λ).

Термин "фрагменты антител" относится к части молекулы иммуноглобулина, сохраняющей антигенсвязывающий сайт из тяжелой цепи и/или легкой цепи, например, участки, определяющие комплементарность тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3, участки, определяющие комплементарность легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3, переменный участок тяжелой цепи (VH) или переменный участок легкой цепи (VL). Фрагменты антител включают в себя хорошо известные фрагменты Fab, F(ab')₂, Fd и Fv, а также доменные антитела (dAb), содержащие один домен VH. Домены VH и VL могут быть соединены синтетическим линкером с образованием различных типов одноцепочечных структур антител, в которых пара доменов VH/VL образуется межмолекулярным или внутримолекулярным способом в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструктами антител, с образованием одновалентного антигенсвязывающего сайта, такого как одноцепочечное антитело Fv (scFv) или диатело; описанное, например, в международной патентной публикации № WO 98/44001, международной патентной публикации № WO 88/01649; международной патентной публикации № WO 94/13804; международной патентной публикации № WO 92/01047.

Переменный участок антитела состоит из "каркасного" участка, прерываемого тремя "антигенсвязывающими сайтами". Антигенсвязывающие сайты обозначают различными терминами: (i) участки, определяющие комплементарность (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), основаны на изменчивости последовательности (Wu and Kabat, J Exp Med 132:211-50, 1970 г.; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991 г.); (ii) "гипервариабельные участки", "HVR" или "HV", три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относятся к участкам переменных доменов антитела, являющихся по своей структуре гипервариабельными, согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk, Mol. Biol 196:901-17, 1987 г.). Другие термины включают в себя "IMGT-CDR" (Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003 г.) и "задействование остатков, определяющих специфичность" (SDRU) (Almagro, Mol Recognit 17:132-43, 2004 г.). В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) представлены стандартизованная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между разграничениями CDR, HV и IMGT описано в публикации Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003 г.

При использовании в настоящем документе "остатки Чотиа" означают остатки VL и VH антитела и нумеруются в соответствии с Al-Lazikani (Al-Lazikani et al., J Mol Biol 273: 927-48, 1997 г.).

"Каркасный участок" или "каркасные последовательности" относятся к последовательностям переменного участка, которые не были определены как антигенсвязывающий сайт. Поскольку для определения антигенсвязывающего сайта могут использоваться разные термины, как описано выше, определение точной аминокислотной последовательности каркасного участка зависит от определения антигенсвязывающего сайта.

Термин "человеческое антитело" или "полностью человеческое антитело" относится к антителам, содержащим последовательности переменных участков и константных участков, полученные из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. Человеческие антитела настоящего изобретения могут включать в себя замены, т.е. они могут не быть точными копиями экспрессируемого человеческого иммуноглобулина или зародышевых генных последовательностей. Однако антитела, в которых антигенсва-

зывающие сайты получены от видов, отличных от человека, не подходят под определение "человеческих антител".

Термины "адаптированные к человеку" антитела или "адаптированные к человеческому каркасу" (HFA) антитела относятся к антителам, адаптированным в соответствии со способами, описанными в патентной публикации США № US 2009/0118127, а также относятся к антителам, в которых последовательности антигенсвязывающих сайтов получены от видов, отличных от человека, и трансплантированы на человеческие каркасы.

Термин "гуманизированные антитела" относится к антителам, у которых антигенсвязывающие сайты получены от видов, отличных от человека, а каркасы переменных участков получены от последовательностей человеческих иммуноглобулинов.

Гуманизированные антитела могут включать в себя замены в каркасных участках, так что каркас может не быть точной копией экспрессированных последовательностей человеческих иммуноглобулинов или зародышевых генных последовательностей.

При использовании в настоящем документе термин "по существу идентичный" означает, что аминокислотные последовательности двух переменных участков антител при сравнении являются идентичными или имеют "незначительные отличия". Незначительными отличиями являются замещения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 аминокислот в последовательности антитела или переменного участка антитела, которые не влияют на характеристики антитела. Аминокислотные последовательности, по существу, идентичные последовательностям переменного участка, описанным в настоящем документе, входят в объем настоящей заявки. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей может достигать 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. Идентичность, определенная в процентном соотношении, можно вычислить, например, при попарном выравнивании с помощью настройки по умолчанию в модуле AlignX программного обеспечения Vector NTI v. 9.0.0 (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния). Белковые последовательности настоящего изобретения можно использовать в качестве запроса для выполнения поиска в публичных или патентных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Примерами программ, используемых для осуществления такого поиска, являются XBLAST или BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), либо GenomeQuest™ (GenomeQuest, г. Уэстборо, штат Массачусетс) - пакет с настройками "по умолчанию".

При использовании в настоящем изобретении термин "эпитоп" означает часть антигена, с которой специфически связывается антитело. Эпитопы обычно состоят из химически активных (например, неполярных, полярных или гидрофобных), поверхностно расположенных фрагментов, таких как боковые группы аминокислот или полисахаридов, и могут иметь специфическую трехмерную структуру, а также характеристики специфического заряда. Эпитоп может состоять из смежных и/или несмежных аминокислот, которые образуют конформационное пространственное звено. В несмежном эпитопе аминокислоты из различных частей линейной последовательности антигена оказываются в непосредственной близости друг от друга в трехмерном пространстве при сворачивании белковой молекулы. Примером эпитопа является домен I huST2L, представленный в последовательности SEQ ID NO: 9.

При использовании в настоящем документе термин "паратоп" означает часть антитела, с которой специфически связывается антиген. Паратоп по своей природе может быть линейным или дискретным, образованным за счет пространственных взаимоотношений между смежными аминокислотами, в отличие от взаимодействия линейно связанных аминокислот. Термины "паратоп легкой цепи" и "паратоп тяжелой цепи" или "аминокислотные остатки паратопа легкой цепи" и "аминокислотные остатки паратопа тяжелой цепи" означают аминокислотные остатки легкой цепи и тяжелой цепи, контактирующие с антигеном соответственно.

При использовании в настоящем документе термины "специфическое связывание" или "специфически связывает" относятся к антителу, проявляющему большую аффинность при связывании с заданным антигеном по сравнению с другими антигенами или белками. Как правило, связывание антитела с заданным антигеном характеризуется константой диссоциации ($K_{дисс}$) 1×10^{-7} М или менее, например 1×10^{-8} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 1×10^{-10} М или менее, 1×10^{-11} М или менее или 1×10^{-12} М или менее, как правило, при $K_{дисс}$, по меньшей мере в десять раз меньшей, чем его $K_{дисс}$ связывания с неспецифичным антигеном (например, BSA, казеином или любым другим установленным полипептидом). Константу диссоциации можно измерить стандартными способами. Однако антитела, специфически связывающиеся с заданным антигеном, могут иметь перекрестную реактивность к другим родственным антигенам, например, к такому же заданному антигену от других биологических видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Mascaca fascicularis* (яванский макак).

При использовании в настоящем документе термин "биспецифический" относится к антителу, которое связывает два разных антигена или два разных эпитопа одного антигена.

При использовании в настоящем документе термин "моноспецифический" относится к антителу, связывающему один антиген или один эпитоп.

При использовании в настоящем документе термин "в комбинации с" означает, что описанные агенты можно вводить совместно в смеси, одновременно в качестве отдельных агентов или последова-

тельно в качестве отдельных агентов в любом порядке.

При использовании в настоящем документе термин "воспалительное состояние" относится к острому или хроническому локализованному или системному ответу на повреждающие стимулы, такие как патогены, поврежденные клетки, физические повреждения или повреждения раздражающими веществами, которые частично опосредованы активностью цитокинов, хемокинов или воспалительных клеток (например, нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов и макрофагов), и характеризуются в большинстве случаев болью, покраснением, отеком и нарушением функций тканей.

При использовании в настоящем документе термин "ST2L-опосредованное воспалительное заболевание" относится к воспалительному заболеванию, по меньшей мере, частично возникающему из-за несоответствующей активации сигнального пути ST2L. Примерами ST2L-опосредованных воспалительных состояний являются астма и аллергии.

При использовании в настоящем документе термин "ST2L-опосредованное заболевание" включает в себя все заболевания и медицинские состояния, в которых ST2L играет какую-либо роль, прямую или косвенную, включая этиологическую или патогенетическую, включая роль в развитии, прогрессировании, устойчивости или патологии заболевания или состояния.

При использовании в настоящем изобретении термин "биологическая активность ST2L" относится к любой активности, возникающей в результате связывания ST2L лиганда IL-33 с ST2L. Пример биологической активности ST2L приводит к активации сигнального пути NF-κB в ответ на IL-33. Активацию NF-κB можно анализировать путем анализа на репортерный ген при индукции ST2L с IL-33 (Fursov et al., *Hybridoma* 30: 153-62, 2011 г.). Другие примеры биологических активностей ST2L приводят к пролиферации клеток Th2 или к секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов, например, IL-5, GM-CSF, IL-8, IL-10 или IL-13. Высвобождение цитокинов и хемокинов из клеток, тканей или в циркуляционных потоках можно измерить с помощью хорошо известных иммуноанализов, таких как ИФА.

Термин "вектор" означает полинуклеотид, способный к удвоению в биологической системе или к перемещению между такими системами. Полинуклеотиды-векторы, как правило, содержат элементы, такие как точки начала репликации, сигнал полиаденилирования или маркеры выбора, обеспечивающие удвоение или сохранение данных полинуклеотидов в биологической системе. Примеры таких биологических систем могут включать в себя клетку, вирус, животное, растение и реконструированные биологические системы, использующие биологические компоненты, способные к удвоению вектора. Полинуклеотид, содержащий вектор, может представлять собой молекулы ДНК или РНК или их гибрид.

Термин "вектор экспрессии" означает вектор, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для прямой трансляции полипептида, закодированного полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в векторе экспрессии.

Термин "полинуклеотид" означает молекулу, содержащую цепочку нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную главную цепь или через другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. Двухцепочечные и одноцепочечные молекулы ДНК и РНК представляют собой типичные примеры полинуклеотидов.

Термин "полипептид" или "белок" означает молекулу, содержащую по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться "пептидами".

В настоящем изобретении использованы следующие общепринятые одно- и трехбуквенные коды обозначения аминокислот.

<u>Аминокислота</u>	<u>Трехбуквенный код</u>	<u>Однобуквенный код</u>
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота	Asp	D
Цистеин	Cys	C
Глутамат	Glu	E
Глутамин	Gln	Q
Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M

Фенилаланин	Phe	F
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y
Валин	Val	V

Композиции настоящего изобретения

В настоящем изобретении предложены антитела, специфически связывающиеся с ST2L и ингибирующие биологическую активность ST2L, а также применение таких антител. Заявители неожиданно обнаружили, что антитела, связывающиеся с доменом I человеческого ST2L (SEQ ID NO: 9), блокируют взаимодействие IL-33/ST2L и ингибируют спектр биологических активностей ST2L, включая индуцируемые IL-33 ответы мастоцитов, тогда как антитела, связывающиеся с доменом III человеческого ST2L (SEQ ID NO: 11), не блокируют взаимодействие IL-33/ST2L, хотя являются ингибиторами спектра биологических активностей ST2L. Однако антитела, связывающиеся с доменом III, проявляют сниженный ингибиторный эффект или отсутствие ингибиторного эффекта, а в некоторых случаях стимулирующий эффект в отношении индуцированных IL-33 ответов мастоцитов.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитела, которые блокируют взаимодействие IL-33/ST2L и ингибируют спектр биологических активностей ST2L, включая индуцированные IL-33 ответы мастоцитов, связываются с эпитопом в домене I человеческого ST2L (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210), и необязательно аминокислотными остатками T93 и F94 в ST2L (нумерация аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 1).

Термин "ответ мастоцитов" или "активность мастоцитов" относится к индуцированному IL-33 высвобождению цитокинов, таких как GM-CSF, IL-8, IL-5, IL-13 и IL-10, и аллергических медиаторов, таких как простагландин D₂, из мастоцитов.

В настоящем изобретении предложены новые антигенсвязывающие сайты, которые связываются с доменом I человеческого ST2L, как описано в настоящем документе. Структурой, переносимой антигенсвязывающий сайт, как правило, является антитело VH или VL.

Антитела настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, могут представлять собой выделенные человеческие или адаптированные к человеку антитела-антагонисты или их фрагменты, специфически связывающиеся с доменом I (SEQ ID NO: 9) человеческого ST2L. Примером антитела, связывающегося с доменом I человеческого ST2L (SEQ ID NO: 9), является антитело STLM15 (C2244), содержащее последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 последовательностей SEQ ID NO: 23, 27 и 31 соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательностей SEQ ID NO: 35, 39 и 43 соответственно, или антитело C2494 (STLM62), содержащее последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 последовательностей SEQ ID NO: 24, 28 и 32 соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательностей SEQ ID NO: 36, 40 и 44 соответственно (табл. 3). Дополнительными примерами антител, связывающихся с доменом I человеческого ST2L, являются антитела, показанные в табл. 16 и на фиг. 13, например, антитела STLM103, STLM107, STLM108, STLM123, STLM124, STLM208, STLM209, STLM210, STLM211, STLM212 и STLM213. Примеры человеческих антител-антагонистов представлены на фиг. 12 и фиг. 13. Примеры адаптированных к человеку антагонистов представлены в табл. 14.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, выделенное человеческое или адаптированное к человеку антитело-антагонист или его фрагмент, специфически связывающееся с доменом I (SEQ ID NO: 9) человеческого ST2L, блокирует взаимодействие IL-33/ST2L.

Антитела можно испытывать на их способность блокировать взаимодействие IL-33/ST2L с помощью стандартного метода ИФА. Например, на планшеты наносят внеклеточный домен человеческого ST2L (huST2L-ECD) и инкубируют с антителом, после чего измеряют связывание биотинилированного IL-33 с планшетами. Антитела, которые "блокируют взаимодействие IL-33/ST2L" или "ингибируют взаимодействие IL-33/ST2L", - это антитела, которые в анализе ИФА с использованием планшетов, покрытых huST2L-ECD, снижают сигнал связывания биотинилированного IL-33 с планшетами по меньшей мере на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% при концентрации антитела 50 мкг/мл по сравнению со связыванием IL-33 в отсутствие антитела.

Антитела можно испытывать на их способность ингибировать ответы мастоцитов путем анализа их ингибиторной активности в отношении секреции, например, высвобождение GM-CSF, IL-5, IL-10 или IL-13 мастоцитами пуповинной крови человека или первичными легочными мастоцитами человека, с использованием стандартных способов и способов, примеры которых приведены ниже. Антитела, которые, как описано в настоящем документе, "ингибируют ответ мастоцитов" или "ингибируют активность мастоцитов", - это антитела, которые снижают вызванную IL-33 в концентрации 1-3 нг/мл секрецию GM-CSF, IL-5, IL-13 или IL-10 по меньшей мере на 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% в концентрации 10 мкг/мл по сравнению с мастоцитами, не

обработанными антителом. Как правило, мастоциты можно получить из пуповинной крови человека или из CD34+ клеток-предшественников из паренхимы легких или малых дыхательных путей с использованием хорошо известных способов и способов, примеры которых представлены ниже. На измеренную для антитела величину % ингибирования могут влиять условия культивирования мастоцитов, и, следовательно, условия культивирования и испытаний следует стандартизировать, например, с использованием среды StemPro-34 в ходе всей 6-10 недельной процедуры дифференцировки. За 4 суток до анализа на высвобождение цитокинов мастоциты ежедневно стимулируют 10 нг/мл IL-4, 10 нг/мл IL-6 и 100 нг/мл SCF. Для анализа на высвобождение цитокинов мастоциты можно повторно растворить в свежей среде StemPro-34 или в среде RPMI, содержащей 10% FCS без антибиотиков, с 100нг/мл SCF. Подходящая плотность посева для анализа составляет от 65000 до 75000 клеток/0,16 мл/лунку. Примеры антител настоящего изобретения, которые, как описано в настоящем документе, ингибируют ответы мастоцитов, представляют собой антитела STLM15, STLM62 и STLM208. Антитело CNTO3914 связывается с доменом I мышинного ST2L без перекрестной реактивности с человеческим ST2L и ингибирует ответы мастоцитов мыши.

Специалистам в данной области будет очевидно, что ответы мастоцитов также включают в себя высвобождение IL-1 и IL-32 и хемокинов, таких как CCL1, CCL4, CCL5, CCL18 и CCL23, а также аллергических медиаторов, таких как цистеинил-лейкотриены, гистамин, а также различных протеаз мастоцитов, включая триптазы, химазы, карбоксипептидазы и катепсин G. Антитела настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, можно испытывать на их способность ингибировать данные дополнительные ответы мастоцитов при помощи стандартных способов. Можно ожидать, что антитела настоящего изобретения, связывающиеся с доменом I ST2L и блокирующие взаимодействие IL-33/ST2L, как описано в настоящем документе, будут ингибировать данные дополнительные ответы мастоцитов по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более при минимальной концентрации 10 мкг/мл и при данных условиях.

Антитела настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, связываются с человеческим ST2L с константой диссоциации ($K_{\text{дисс}}$) от приблизительно 5×10^{-12} М до приблизительно 7×10^{-10} М, с константой скорости ассоциации ($k_{\text{асс}}$) с человеческим ST2L от приблизительно 2×10^6 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до приблизительно 1×10^8 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или с константой скорости диссоциации ($k_{\text{дисс}}$) с человеческим ST2L от приблизительно $1 \times 10^{-6}\text{s}^{-1}$ до приблизительно $1 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$. Например, антитела настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, связываются с человеческим ST2L с $K_{\text{дисс}}$ менее приблизительно 7×10^{-10} М, менее приблизительно 1×10^{-10} М, менее приблизительно 5×10^{-11} М, менее приблизительно 1×10^{-11} М или менее приблизительно 5×10^{-12} М.

Антитела настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, могут иметь перекрестную реактивность с ST2L *Macaca fascicularis* (яванского макака) (SEQ ID NO: 2) и связываться с ST2L яванского макака с константой диссоциации ($K_{\text{дисс}}$) от приблизительно 3×10^{-12} М до приблизительно 2×10^{-9} М, константой скорости ассоциации ($k_{\text{асс}}$) с ST2L яванского макака от приблизительно 4×10^6 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ до приблизительно 1×10^8 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, или константой скорости диссоциации ($k_{\text{дисс}}$) с ST2L яванского макака от приблизительно $7 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ до приблизительно $1 \times 10^{-1}\text{s}^{-1}$. Например, антитела настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, связываются с ST2L яванского макака с $K_{\text{дисс}}$ менее приблизительно 2×10^{-9} М, менее приблизительно 1×10^{-9} М, менее приблизительно 1×10^{-10} М, менее приблизительно 1×10^{-11} М или менее приблизительно 3×10^{-12} М.

Аффинность антител к ST2L можно определить экспериментально с использованием любого подходящего способа. Такие способы могут включать в себя ProteOn XPR36, использование инструментов Biotec 3000 или KinExA, ИФА или способов конкурентно-связывающего анализа, известных специалистам в данной области. Измеренная аффинность взаимодействия в конкретной паре антитело/ST2L может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например, $K_{\text{дисс}}$, $k_{\text{асс}}$, $k_{\text{дисс}}$) предпочтительно осуществлять с использованием стандартизированных условий и стандартизированного буферного раствора, такого как буферный раствор, описанный в настоящем документе. Специалисту в данной области будет понятно, что внутренняя ошибка измерения аффинности, например, с использованием Biotec 3000 или ProteOn (измеряемая как стандартное отклонение, CO), как правило, может составлять 5-33% для измерений, проводимых в границах типичных пределов детекции. Следовательно, термин "приблизительно" отражает типичное стандартное отклонение в анализе. Например, типичное CO для $K_{\text{дисс}}$ 1×10^{-9} М составляет до $\pm 0,33 \times 10^{-9}$ М.

Антитела, связывающие человеческий ST2L с нужной аффинностью и необязательно проявляющие перекрестную реактивность с ST2L яванского макака, можно выбрать из библиотек вариантов или фрагментов путем пэннинга с человеческим и/или ST2L яванского макака и необязательно с использованием дополнительного созревания аффинности антител. Антитела можно идентифицировать с помощью подходящего способа на основе их способности ингибировать биологическую активность ST2L. Такие способы могут включать в себя анализы с геном-репортером или анализы с помощью хорошо известных способов получения цитокинов, как показано в настоящей заявке.

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенное антитело-антагонист, специфически связывающееся с человеческим ST2L, содержащее участок, определяющий комплементарность, тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1) последовательности SEQ ID NO: 160 ($X_1X_2X_3MX_4$); где

X_1 представляет собой S, F, D, I, G или V;

X_2 представляет собой Y или D;

X_3 представляет собой A, D или S и

X_4 представляет собой S, F или I;

HCDR 2 (HCDR2) последовательности SEQ ID NO: 161 ($X_5IX_6GX_7GGX_8TX_9YADSVKG$); где

X_5 представляет собой A, S, T, Y или D;

X_6 представляет собой S, R, E, K, G или A;

X_7 представляет собой S, E или N;

X_8 представляет собой S, R, E, G, T, D или A;

X_9 представляет собой Y, D, N, A или S;

HCDR 3 (HCDR3) последовательности SEQ ID NO: 162 ($X_{10}X_{11}WSTEGSFFVLDY$); где

X_{10} представляет собой D, A, R, N, Q, P, E, I, H, S, T или Y и

X_{11} представляет собой P, A, H, Y, E, Q, L, S, N, T, V или I.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенное антитело-антагонист, специфически связывающееся с человеческим ST2L, содержащее

участок, определяющий комплементарность, легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1) последовательности SEQ ID NO: 163 ($RASQSVDDX_{12}LA$); где

X_{12} представляет собой A или D;

LCDR 2 (LCDR2) последовательности SEQ ID NO: 90 (DASNRAT); и

LCDR 3 (LCDR3) последовательности SEQ ID NO: 164 ($QQX_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}T$); где

X_{13} представляет собой F или Y;

X_{14} представляет собой Y, I или N;

X_{15} представляет собой N, G, D или T;

X_{16} представляет собой W или A;

X_{17} представляет собой P или удален; и

X_{18} представляет собой L или I.

Антитела настоящего изобретения, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательностей SEQ ID NO: 160, 161, 162, 163, 90 и 164 соответственно, можно получить хорошо известными способами мутагенеза с использованием в качестве шаблона, например, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 последовательностей SEQ ID NO: 78, 81, 84, 87, 90 и 92 соответственно. CDR-участки тяжелой цепи и CDR-участки легкой цепи последовательностей SEQ ID NO: 160, 161, 162, 163, 90 и 164 соответственно можно перенести на человеческие каркасы, такие как каркасы, описанные ниже. Антитела можно анализировать на связывание с ST2L и на их способность блокировать взаимодействие IL-33/ST2L и другие характеристики, такие как аффинность к человеческому ST2L и/или ST2L яванского макака, и на ингибирование ответов мастоцитов с использованием способов, описанных в настоящем документе.

В одном варианте осуществления выделенное антитело-антагонист, специфически связывающееся с человеческим ST2L, как описано в настоящем документе, содержит

HCDR1 последовательностей SEQ ID NO: 78 или 95-108;

HCDR2 последовательностей SEQ ID NO: 81, 109-118 или 120-129;

HCDR3 последовательностей SEQ ID NO: 84 или 165-185;

LCDR1 последовательностей SEQ ID NO: 87 или 130;

LCDR2 последовательности SEQ ID NO: 90; и

LCDR3 последовательностей SEQ ID NO: 92 или 131-134.

В другом варианте осуществления выделенное антитело-антагонист, специфически связывающееся с человеческим ST2L, содержит последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как показано на фиг. 10, фиг. 11, и фиг. 12, как описано в настоящем документе.

В другом варианте осуществления выделенное антитело-антагонист, специфически связывающееся с человеческим ST2L, как описано в настоящем документе, содержит

HCDR1 последовательностей SEQ ID NO: 23 или 24;

HCDR2 последовательностей SEQ ID NO: 27 или 28;

HCDR3 последовательностей SEQ ID NO: 31 или 32;

LCDR1 последовательностей SEQ ID NO: 35 или 36;

LCDR2 последовательностей SEQ ID NO: 39 или 40; и

LCDR3 последовательностей SEQ ID NO: 43 или 44.

В другом варианте осуществления выделенное антитело-антагонист, специфически связывающееся с человеческим ST2L, как описано в настоящем документе, содержит последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3:

SEQ ID NO: 23, 27, 31, 35, 39 и 43 соответственно;
SEQ ID NO: 24, 28, 32, 36, 40 и 44 соответственно; (HFA CDR);
SEQ ID NO: 24, 28, 146, 36, 40 и 147 соответственно; или
SEQ ID NO: 24, 28, 146, 36, 40 и 44 соответственно.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенное человеческое или адаптированное к человеку антитело-антагонист или его фрагмент, специфически связывающееся с человеческим ST2L (SEQ ID NO: 1), как описано в настоящем документе, содержащее переменный участок тяжелой цепи (VH), содержащий каркас VH, полученный из человеческих каркасных последовательностей IGHV3-23 (SEQ ID NO: 158), IGHV1-24*01 (SEQ ID NO: 148) или IGHV1-f*01 (SEQ ID NO: 149), и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий каркас VL, полученный из человеческих каркасных последовательностей IGKV3-11 (L6) (SEQ ID NO: 159), IGKV3-15*01 (L2) (SEQ ID NO: 150), IGKV1-9*01 (L8) (SEQ ID NO: 151), IGKV1-5*01 (L12) (SEQ ID NO: 152), IGKV1-12*01 (L5) (SEQ ID NO: 153), IGKV1-39*01 (O12) (SEQ ID NO: 154), IGKV1-27*01 (A20) (SEQ ID NO: 155) или IGKV1-33*01 (O18) (SEQ ID NO: 156).

В другом варианте осуществления выделенное антитело, специфически связывающееся с доменом I человеческого ST2L, как описано в настоящем документе, содержит участок VH, содержащий каркас VH, полученный из человеческих каркасных последовательностей VH 3-23 (SEQ ID NO: 158); и переменный участок легкой цепи (VL), содержащий каркас VL, полученный из человеческих каркасных последовательностей V_κ L6 (SEQ ID NO: 159). Человеческие каркасные последовательности хорошо известны и, как правило, включают в себя последовательности переменного участка зародышевого человеческого иммуноглобулина, связанные с соединительными (J) последовательностями. Каркасная человеческая аминокислотная последовательность VH 3-23, представленная в SEQ ID NO: 158, включает в себя зародышевую человеческую последовательность VH 3-23, соединенную с IGHJ4, а каркасная человеческая аминокислотная последовательность V_κ L6, представленная в SEQ ID NO: 159, включает в себя зародышевую человеческую последовательность V_κ L6, соединенную с IGKJ1, как описано в публикациях Shi et al., J Mol Biol 397:385-96, 2010 г.; международной патентной публикации № WO2009/085462 и международной патентной публикации № US2010/0021477. Примеры антител, имеющие последовательность VH, полученную из человеческой последовательности VH 3-23, и последовательность VL, полученную из человеческой последовательности V_κ L6, показаны на фиг. 12 и фиг. 13.

Человеческие и адаптированные к человеку антитела, содержащие переменные участки тяжелой или легкой цепи, "полученные из" конкретного каркаса или зародышевой последовательности, представляют собой антитела, полученные из системы, в которой используются зародышевые гены человеческого иммуноглобулина, например, из трансгенных мышей или из библиотек фаговых дисплея, как описано ниже. Антитело, "полученное из" конкретного каркаса или зародышевой последовательности, может содержать аминокислотные отличия по сравнению с последовательностью, из которой оно получено, например, из-за естественно возникающих соматических мутаций или намеренно введенных замен.

В другом варианте осуществления выделенное человеческое или адаптированное к человеку антитело-антагонист или его фрагмент, специфически связывающееся с доменом I (SEQ ID NO: 9) человеческого ST2L, как описано в настоящем документе, конкурирует за связывание с человеческим ST2L (SEQ ID NO: 1) с выделенным антителом, содержащим переменный участок тяжелой цепи (VH) последовательности SEQ ID NO: 47 и переменный участок легкой цепи (VL) последовательности SEQ ID NO: 51 (антитело C2244).

В другом варианте осуществления выделенное антитело настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, связывается с человеческим ST2L по аминокислотным остаткам 35-48 последовательности SEQ ID NO: 1 (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210). Антитело, как описано в настоящем документе, может дополнительно связываться с человеческим ST2L по аминокислотным остаткам T93 и F94 последовательности SEQ ID NO: 1.

Конкуренцию по специфическому связыванию с человеческим ST2L между антителами настоящего изобретения, описанными в настоящем документе, которые содержат определенные аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а также LCDR1, LCDR2 и LCDR3 или содержат определенные последовательности VH и VL, можно анализировать *in vitro* с использованием хорошо известных способов. Например, связывание меченных сложным эфиром NHS под названием MSD Sulfo-Tag™ антител с человеческим ST2L в присутствии немеченных антител можно анализировать методами ИФА или Biacore, или для демонстрации конкуренции с антителами настоящего изобретения можно использовать проточную цитометрию. Способность испытуемого антитела ингибировать связывание C2244 с человеческим ST2L демонстрирует, что испытуемое антитело может конкурировать с данными антителами за связывание с человеческим ST2L. Такие примеры антител представляют собой C2494, STLM208 и STLM213, показанные в табл. 3 и на фиг. 13.

Антитела, конкурирующие с C2244 за связывание с доменом I ST2L, как описано в настоящем документе, блокируют взаимодействие IL-33/ST2L и ингибируют спектр биологических активностей ST2L, включая индуцированные IL-33 ответы мастоцитов. В домене I ST2L также присутствует не нейтрализи-

зующий (т.е. неингибирующий) эпитоп в виде второй группы конкуренции антител (которая представлена антителом C2240, связывающимся с доменом I ST2L, но не конкурирующим с C2244 и не ингибирующим сигнализацию ST2L).

Антитела настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, связывающиеся с конкретными доменами ST2L или эпитопами, можно получать путем иммунизации мышей, экспрессирующих локусы человеческого иммуноглобулина (Lonberg et al., *Nature* 368:856-9, 1994 г.; Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-51, 1996 г.; Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-56, 1997 г.; патенты США №№ 5770429, 7041870 и 5939598), или мышей Balb/c пептидами, кодирующими эпитопы, например, пептидом, имеющим аминокислотную последовательность домена I человеческого ST2L: KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQLLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVDPDYLMYSTV (SEQ ID NO: 9), или пептидом, имеющим аминокислотную последовательность RCPQGKPSYTVDW (SEQ ID NO: 210), а также с использованием гибридного метода, Kohler et al., *Nature* 256:495-97, 1975 г. Полученные антитела испытывают на их связывание с эпитопом с помощью стандартных способов. Например, когда известна структура каждого из отдельных компонентов, можно использовать анализ *in silico* прикрепления одного белка к другому для идентификации способных к взаимодействию сайтов. Можно провести водородно-дейтериевый (H/D) обмен в антигене и комплексе антитела для определения участков антигена, способных связываться с антителом. Сегментный и точечный мутагенез, модифицирующий антиген, можно использовать для локализации необходимых для связывания антитела аминокислот. Идентифицированные mAb можно дополнительно модифицировать путем включения измененных вспомогательных каркасных остатков с сохранением аффинности связывания, с использованием способов, описанных, например, в публикациях Queen et al., *Proc Natl Acad Sci (USA)* 86:10029-32, 1989 г., и Hodgson et al., *Bio/Technology* 9:421, 1991 г.

Антитела настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, могут быть человеческими или адаптированными к человеку. Антитела настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, могут относиться к типу IgA, IgD, IgE, IgG или IgM.

Антитела, у которых аминокислотные последовательности антигенсвязывающего сайта, по существу, идентичны последовательностям, представленным на фиг. 10, 11, 12, 13, 15, в табл. 3, 9 и 12, входят в объем настоящего изобретения. Как правило, они включают одно или более замещений аминокислоты аминокислотой, имеющей аналогичный заряд или гидрофобные или стереохимические характеристики, что позволяет улучшить такие свойства антитела, как, например, стабильность или аффинность. Например, консервативные замещения могут означать замещения природных аминокислотных остатков на неприродные остатки, которые сопровождаются или не сопровождаются незначительным изменением полярности в положении замещения. Более того, любой природный остаток в полипептиде может быть замещен аланином, согласно способу, описанному как аланин-сканирующий мутагенез (MacLennan et al., *Acta Physiol Scand Suppl* 643:55-67, 1998 г.; Sasaki et al., *Adv Biophys* 35:1-24, 1998 г.). При необходимости желательные замещения аминокислоты (консервативные или неконсервативные) могут быть запланированы специалистом в данной области. Например, замещения аминокислоты могут использоваться для идентификации остатков, влияющих на функционирование антител, таких как остатки, влияющие на аффинность, либо остатки, придающие нежелательные свойства, такие как способность к агрегации. Примеры замещений аминокислоты показаны на фиг. 12 и 13.

Также можно осуществить замены в каркасных участках, в отличие от антигенсвязывающих сайтов, если они отрицательно не влияют на свойства антитела. Замены в каркасных участках можно осуществить, например, в остатках вернерной зоны (патент США № 6649055) для улучшения аффинности или стабильности антитела. Замены также можно осуществить в тех каркасных участках антитела, которые отличаются последовательностью при сравнении с гомологичными человеческими зародышевыми генными последовательностями, чтобы уменьшить возможную иммуногенность. Данные модификации можно выполнить, например, для антител, полученных из новых библиотек антител, таких как pIX библиотеки.

Консервативные замещения аминокислоты также могут осуществляться путем введения в молекулу неприродных аминокислотных остатков, которое, как правило, происходит скорее при химическом синтезе пептидов, чем при синтезе в биологических системах. Замещения аминокислоты можно осуществить, например, с помощью ПЦП мутагенеза (патент США № 4683195). Можно создать библиотеки вариантов с помощью хорошо известных способов, например, применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, таких как кодоны DVK, кодирующие 11 аминокислот (ACDEGKNRSYW), а также скрининга библиотек или вариантов с желаемыми свойствами.

Хотя варианты осуществления показаны в примерах, содержащих пары переменных участков, пары полноразмерных цепей антител или пары участков CDR1, CDR2 и CDR3, один из тяжелой цепи и один из легкой цепи, специалистам будет понятно, что альтернативные варианты осуществления могут содержать одиночные переменные участки тяжелой цепи или одиночные переменные участки легкой цепи, одиночные полноразмерные цепи антител или участки CDR1, CDR2 и CDR3 из одной либо тяжелой, либо легкой цепи антитела. Одиночный переменный участок, полноразмерная цепь антител или участок CDR1, CDR2 и CDR3 одной цепи можно использовать для скрининга соответствующих доменов

в другой цепи; две цепи способны к формированию антитела, специфически связывающего ST2L. Такой скрининг может осуществляться с помощью способов фагового дисплея, например, с использованием иерархического двойного комбинаторного подхода, описанного в публикации РСТ № WO 1992/01047. Согласно данному подходу, индивидуальная колония, содержащая клон Н или L цепей, используется для инфицирования всей библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (L или Н), а полученный двухцепочечный специфический антигенсвязывающий домен выбирается в соответствии с методами фагового дисплея.

В настоящем изобретении предложены выделенные домены VH и VL антител настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, а также антитела, содержащие определенные домены VH и VL. Варибельные участки VH и VL определенных антител настоящего изобретения, описанных в настоящем документе, представлены на фиг. 13 и в табл. 12.

Одним вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенное человеческое или адаптированное к человеку антитело-антагонист или его фрагмент, специфически связывающееся с доменом I (SEQ ID NO: 9) человеческого ST2L, содержащее VH, по меньшей мере на 90% идентичный VH последовательности SEQ ID NO: 191.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенное человеческое или адаптированное к человеку антитело-антагонист или его фрагмент, специфически связывающееся с доменом I (SEQ ID NO: 9) человеческого ST2L, содержащее VL, по меньшей мере на 94% идентичный VL последовательности SEQ ID NO: 209.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, настоящее изобретение предусматривает антитело, содержащее VH последовательностей SEQ ID NO: 143, 144, 145, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 или 205.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, настоящее изобретение предусматривает антитело, содержащее VL последовательностей SEQ ID NO: 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 206, 207, 208 или 209.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, настоящее изобретение предусматривает антитело, содержащее:

VH последовательностей SEQ ID NO: 186, 187, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 или 205 и VL последовательности SEQ ID NO: 206;

VH последовательностей SEQ ID NO: 195 или 196 и VL последовательности SEQ ID NO: 207;

VH последовательностей SEQ ID NO: 188, 189 или 190 и VL последовательности SEQ ID NO: 208; или

VH последовательностей SEQ ID NO: 187, 191, 192, 193 или 194 и VL последовательности SEQ ID NO: 209.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенное человеческое или адаптированное к человеку антитело-антагонист или его фрагмент, специфически связывающееся с доменом I (SEQ ID NO: 9) человеческого ST2L, содержащее:

HCDR1 последовательности SEQ ID NO: 97;

HCDR2 последовательности SEQ ID NO: 114;

HCDR3 последовательности SEQ ID NO: 84;

LCDR1 последовательности SEQ ID NO: 130;

LCDR2 последовательности SEQ ID NO: 90;

LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 134 или

VH последовательности SEQ ID NO: 191 и VL последовательности SEQ ID NO: 209.

Человеческие mAb, в которых отсутствуют последовательности, не свойственные человеку, можно получить и оптимизировать из библиотек фаговых дисплеев с помощью способов, описанных, например, в работах Knappik et al., J Mol Biol 296:57-86, 2000 г.; и Krebs et al., J Immunol Meth 254:67-84, 2001 г. В примере способа антитела настоящего изобретения выделены из библиотек экспрессией варибельных участков тяжелой и легкой цепи антитела в виде слитных белков с белком оболочки рIX бактериофага. В библиотеках антител был проведен скрининг на связывание с человеческим ST2L-ECD, и затем полученные позитивные клоны были дополнительно охарактеризованы, из лизатов клонов были выделены Fab, и затем выполнена экспрессия полноразмерных IgG. (Примеры библиотек антител и способов скрининга представлены в публикациях Shi et al., J Mol Biol 397:385-96, 2010 г.; международной патентной публикации № WO 2009/085462, патентной публикации США № 12/546850; патентах США №№ 5223409, 5969108 и 5885793).

Полученные mAb можно дополнительно модифицировать в их каркасных участках с изменением определенных каркасных остатков до остатков, присутствующих в соответствующей человеческой зародышевой линии.

Иммуноэффекторность свойства антител настоящего изобретения можно усилить или ослабить за счет модификаций Fc-фрагмента с применением способов, хорошо известных специалистам в данной области. Например, эффекторные функции Fc-фрагмента, такие как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, пони-

жающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клетки; BCR) и т.п., могут обеспечиваться и/или контролироваться модифицирующими остатками в Fc-фрагменте, ответственными за данные действия. Мутировавшие остатки в Fc-домене, увеличивающие период полужизни антител, могут также улучшить фармакокинетические свойства (Strohl Curt Opin Biotechnol, 20: 685-91, 2009 г.). Примерами модификаций в Fc-домене являются IgG4 S228P/L234A/L235A, IgG2 M252Y/S254T/T256E (Dall'Acqua et al., J Biol Chem 281:23514-24, 2006 г.; или IgG2 V234A/G237A/P238S, V234A/G237A/H268Q, H268A/V309L/A330S/P331S или V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S в случае IgG2 (международная патентная заявка № WO 2011/066501) (нумерация в соответствии с принятой в ЕС нумерацией).

Кроме того, антитела настоящего изобретения можно модифицировать посттрансляционно за счет таких процессов, как гликозилирование, изомеризация, дегликозилирование или ненатуральная ковалентная модификация, такая как присоединение фрагментов полиэтиленгликоля (пегилирование) или липидизация. Такие модификации могут происходить *in vivo* или *in vitro*. Например, антитела настоящего изобретения можно конъюгировать с полиэтиленгликолем для усовершенствования их фармакокинетических характеристик. Конъюгацию можно выполнить с помощью способов, известных специалистам в данной области. Отмечено, что конъюгация терапевтических антител с PEG улучшает фармакодинамику, в то же время не оказывая влияния на функцию (Knigh et al., Platelets 15:409-18, 2004 г.; Leong et al., Cytokine 16:106-19, 2001 г.; Yang et al., Protein Eng 16:761-70, 2003 г.).

Антитела настоящего изобретения или их фрагменты, описанные в настоящем документе, модифицированные для улучшения стабильности, селективности, перекрестной реактивности, аффинности, иммуногенности или достижения других желательных биологических или биосептических характеристик, входят в объем настоящего изобретения. Стабильность антитела определяется рядом факторов, включая: (1) пространственную укладку индивидуальных доменов, влияющую на их естественную стабильность; (2) поверхностное взаимодействие белков, определяющее спаривание HC и LC; (3) глубину расположения полярных и заряженных остатков; (4) сеть водородных мостиков между полярными и заряженными остатками; и (5) поверхностный заряд и распределение полярных остатков наряду с другими внутри- и межмолекулярными взаимодействиями (Worn et al., J. Mol Biol 305:989-1010, 2001 г.). Остатки, способные дестабилизировать структуру, можно идентифицировать на основе кристаллической структуры антитела или путем молекулярного моделирования в определенных случаях, а эффект остатков на стабильность антитела можно испытывать путем создания вариантов мутаций в идентифицированных остатках и их оценки. Один из способов увеличения стабильности антитела заключается в увеличении срединной точки термперехода (T_m), измеряемой путем дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Как правило, T_m белка имеет положительную корреляцию с его стабильностью и отрицательную корреляцию с подверженностью к нарушениям третичной структуры и денатурации в растворах, а также дегградации, которая зависит от склонности белка к нарушению третичной структуры (Remmele et al., Biopharm 13:36-46, 2000 г.). Ряд исследований свидетельствует о корреляции между степенью физической стабильности составов, измеренной как термостабильность путем DSC, и измерениями, проведенными с помощью других способов (Gupta et al., AAPS PharmSci 5E8, 2003 г.; Zhang et al., J Pharm Sci 93:3076-89, 2004 г.; Maa et al., Int J Pharm 140:155-68, 1996 г.; Bedu-Addo et al., Pharm Res 21:1353-61, 2004 г.; Remmele et al., Pharm Res 15:200-8, 1997 г.). Результаты исследований состава позволяют предположить, что T_m Fab-фрагмента влияет на долговременную физическую стабильность соответствующего mAb. Различия в аминокислотах либо каркасного фрагмента, либо в CDR-участках могут существенно влиять на термическую стабильность домена Fab (Yasui et al., FEBS Lett 353: 143-6, 1994 г.).

Антитела настоящего изобретения, специфически связывающиеся с доменом I человеческого ST2L, описанные в настоящем документе, можно получить в виде биспецифических антител, которые также входят в объем настоящего изобретения. Из участков VL и/или VH антител настоящего изобретения с использованием опубликованных способов можно получить одноцепочечные биспецифические антитела в виде структур, таких как структуры TandAb® (международная патентная публикация № WO 1999/57150; патентная публикация США № US 2011/0206672), или биспецифические scFV в виде структур, таких как описанные в патенте США № US 5869620; международной патентной публикации № WO 1995/15388A, международной патентной публикации № WO 1997/14719 или международной патентной публикации № WO 2011/036460.

Из участков VL и/или VH антител настоящего изобретения, описанных в настоящем документе, можно получить биспецифические полноразмерные антитела, где каждое плечо антитела связывается со своим антигеном или эпитопом. Такие биспецифические антитела, как правило, получают модулированием взаимодействий CH3 между двумя тяжелыми цепями антител с образованием биспецифических антител посредством таких способов, как описанные в патенте США № US 7695936; международной патентной публикации № WO 04/111233; патентной публикации США № US 2010/0015133; патентной публикации США № US 2007/0287170; международной патентной публикации № WO 2008/119353; патентной публикации США № US 2009/0182127; патентной публикации США № US 2010/0286374; патентной публикации США № US 2011/0123532; международной патентной публикации № WO 2011/131746; международной патентной публикации № WO 2011/143545; или патентной публикации

США № US 2012/0149876. Дополнительными биспецифическими структурами, в которые могут встраиваться участки VL и/или VH антител настоящего изобретения, являются, например, иммуноглобулины с двойными переменными доменами (международная патентная публикация № WO 2009/134776) или структуры, включающие в себя различные димеризационные домены для соединения двух обладающих разной специфичностью плеч антител, например "лейциновую застежку" или коллагеновые димеризационные домены (международная патентная публикация № WO 2012/022811, патент США № US 5932448; патент США № US 6833441).

Другим аспектом настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий любой из переменных участков тяжелой цепи антитела или переменных участков легкой цепи настоящего изобретения или их фрагменты, либо их комплемент. В настоящем документе описаны определенные полинуклеотиды, однако другие

полинуклеотиды, которые, принимая во внимание вырожденность генетического кода или предпочтительность использования кодонов в данной экспрессирующей системе, кодируют антитела-антагонисты настоящего изобретения, также входят в объем настоящего изобретения. Примерами полинуклеотидов настоящего изобретения являются полинуклеотиды с SEQ ID NO: 211, 212, 213 и 214.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой вектор, содержащий полинуклеотид настоящего изобретения. Такие векторы могут быть плазмидными, вирусными, бакуловирусными экспрессионными векторами, векторами на основе транспозонов или любыми другими векторами, подходящими для интродукции полинуклеотидов настоящего изобретения в заданный организм или генетическое окружение любым способом.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой клетку-хозяина, содержащую полинуклеотид настоящего изобретения. Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические, бактериальные, растительные клетки или клетки архей. Как правило, используются эукариотические клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают в себя бессмертные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, CRL-1581), NSO (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), F0 (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580) мышинные клеточные линии. Примером клеточной линии миеломы человека является U266 (ATCC CRL-TIB-196). Другие подходящие клеточные линии включают в себя линии, полученные из яичников китайского хомячка (CHO), такие как линии CHO-K1SV (Lonza Biologies, г. Уолкерсвилл, штат Мэриленд), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является способ получения антитела, которое специфически связывается с доменом I ST2L, включающий культивирование клетки-хозяина настоящего изобретения и выделение антитела, формируемого клеткой-хозяином. Способы получения и очистки антител хорошо известны в данной области.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является способ ингибирования у субъекта взаимодействия ST2L с IL-33, включающий введение субъекту антитела, специфически связывающегося с доменом I ST2L в количестве, достаточном для ингибирования взаимодействия ST2L и IL-33.

Способы лечения

Для модуляции иммунной системы можно применять антагонисты ST2L настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, например, антитела-антагонисты ST2L, блокирующие взаимодействие IL-33/ST2L и связывающиеся с доменом I ST2L, а также антитела, конкурирующие за связывание с человеческим ST2L (SEQ ID NO: 1) с выделенным антителом, содержащим переменный участок тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 47 и переменный участок легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 51, или антитела, связывающиеся с человеческим ST2L по аминокислотным остаткам 35-48 последовательности SEQ ID NO: 1 (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210). Антитела настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, могут иметь более высокую антагонистическую эффективность в отношении биологической активности ST2L по сравнению с антителами, связывающимися с другими доменами и/или участками ST2L, поскольку антитела настоящего изобретения способны более эффективно снижать индуцированные IL-33 ответы мастоцитов. В способах настоящего изобретения можно использовать любые антитела настоящего изобретения. Примеры антител, которые можно использовать в способах настоящего изобретения, представляют собой антитела STLM62, STLM15, STLM103, STLM107, STLM108, STLM123, STLM124, STLM206, STLM207, STLM208, STLM209, STLM210, STLM211, STLM212, STLM213. Без стремления к ограничению какой-либо теорией, предполагается, что антитела-антагонисты, связывающиеся с доменом I и блокирующие взаимодействие IL-33/ST2L, могут ингибировать образование комплекса IL-1RAcP/IL-33/ST2L/cKit или расположенную ниже сигнализацию на мастоцитах, тогда как антитела, связывающиеся с доменом III, хотя и способны ингибировать рекрутинг IL-1RAcP в комплекс ST2L/IL-33, могут быть неспособны нарушать образование более крупного комплекса IL-1RAcP/IL-33/ST2L/cKit, специфичного для мастоцитов. Проведенный микропланшетный анализ подтверждает предположение, поскольку было показано, что антитела, связывающиеся с доменом I антител к ST2L, подавляли большую часть индуцированных IL-33 сигнальных путей в мастоцитах, а

антитела, связывающиеся с доменом III антител к ST2L, могли лишь ингибировать небольшую часть данных сигнальных путей. Вероятно, это объясняется тем, что, поскольку IL-33 связывается с ST2L до ассоциации вспомогательного белка IL-1RAcP, блокирование связывания IL-33 с ST2L антителами, связывающимися с доменом I, может предотвращать ассоциацию любых других вспомогательных белков, включая cKit или еще не идентифицированных корцепторов. Антитела, связывающиеся с доменом III, которые не препятствуют связыванию IL-33 с ST2L, теоретически могут блокировать ассоциацию IL-1RAcP, но не ассоциацию других корцепторов, включая еще не идентифицированные корцепторы. Было предложено множество моделей того, каким образом IL-1RAcP взаимодействует с комплексами IL-1/IL-1R или ST2L/IL-33 (Lingel et al., *Structure* 17: 1398-1410, 2009 г.; и обзор Thomas et al., *Nat Struct & Molec Biol* 19: 455-457, 2012 г.). Данные модели указывают на то, что IL-1RAcP может связываться с одной стороной комплекса, но то, какая это сторона, окончательно не показано. Следовательно, вероятно, что существует возможность того, что "другая сторона" или "свободная сторона" комплекса доступна для ассоциации с другим корцептором, не блокируемым антителом к домену III, и возможны нерасчетные эффекты, такие как повышенный рекрутинг другого корцептора, приводящего к усилению сигнализации.

В способах настоящего изобретения можно использовать любое антитело-антагонист, специфически связывающееся с доменом I человеческого ST2L, антитело-антагонист, блокирующее взаимодействие IL-33/ST2L и связывающееся с доменом I человеческого ST2L, антитела, конкурирующие за связывание с человеческим ST2L (SEQ ID NO: 1) с выделенным антителом, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 47 и вариабельный участок легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 51, или антитела, связывающиеся с человеческим ST2L по аминокислотным остаткам 35-48 последовательности SEQ ID NO: 1 (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210). Дополнительные характеристики таких антител включают в себя способность антитела блокировать взаимодействие IL-33/ST2L и ингибировать ответы человеческих мастоцитов.

Следовательно, антитела настоящего изобретения подходят для лечения ряда ST2L-опосредованных заболеваний, ST2L-опосредованных воспалительных заболеваний и заболеваний, при которых желательным является ингибирование ответов мастоцитов.

Способы настоящего изобретения можно использовать для лечения любого животного. Примеры таких животных включают в себя млекопитающих, таких как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные. Например, антитела настоящего изобретения подходят для использования при профилактике и лечении ST2L-опосредованных заболеваний, таких как воспалительные заболевания, включая астму, гиперреактивность дыхательных путей, саркоидоз, хроническое обструктивное легочное заболевание (COPD), идиопатический легочный фиброз (IPF), муковисцидоз, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), ревматоидный артрит, эозинофильный эзофагит, склеродерму, атопический дерматит, аллергический ринит, буллезный пемфигоид, хроническую крапивницу, диабетическую нефропатию, интерстициальный цистит или реакцию "трансплантат против хозяина" (GVHD). Антитела настоящего изобретения подходят для использования при профилактике и лечении иммунных заболеваний, опосредованных по меньшей мере частично мастоцитами, таких как астма, экзема, кожный зуд, аллергический ринит, аллергический конъюнктивит, а также аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, буллезный пемфигоид и рассеянный склероз.

Антитела настоящего изобретения также подходят для получения лекарственных средств для лечения таких состояний, причем лекарственные средства готовят для введения в дозировках, определенных в настоящем документе.

Мастоциты играют центральную роль в аллергическом воспалении и астме благодаря высвобождению различных медиаторов (обзор Amin, *Respir Med* 106:9-14, 2012 г.). ST2L в большом количестве экспрессируется в мастоцитах, и его активация приводит к экспрессии многих провоспалительных цитокинов и других медиаторов. Предполагается, что ингибирование активности ST2L препятствует опосредованному мастоцитами рекрутингу воспалительных клеток и модулирует хроническое воспаление.

Мастоциты быстро реагируют на стимуляцию, включая аллергены, холодный воздух и патогены; повреждение эпителия данными стимулами может приводить к высвобождению IL-33 (обзор Zhao и Hu, *Cell & Molec Immunol* 7: 260-2, 2012 г.). Мастоциты выделяют лейкотриены, гистамин, простагландины и цитокины, повышая проницаемость сосудов и вызывая бронхостеноз, а также рекрутируют в сайт другие иммунные клетки, такие как нейтрофилы, эозинофилы и Т-лимфоциты (Henderson et al., *JEM* 184:1483-94, 1996 г.; White et al., *JACI* 86:599-605, 1990 г.). Кроме того, они усиливают иммунные ответы, увеличивая экспрессию адгезивных молекул на клетках эпителия и усиливая направленную миграцию иммунных клеток (Meng et al., *J Cell Physiol* 165:40-53, 1995 г.). Мастоциты играют важную роль в перестройке дыхательных путей; у больных астмой обнаруживается повышенное число мастоцитов в слое гладкой мускулатуры дыхательных путей (ASM), и они секретируют медиаторы, стимулирующие пролиферацию ASM (обзор Okuyama et al., *Curr Opin Immunol* 19:687-93, 2007 г.).

Воспалительное заболевание легких является примером воспалительного заболевания. Примеры воспалительных заболеваний легких включают в себя инфекционные болезни легких, вызванные вирусами, бактериальными, грибковыми, паразитарными или прионными инфекциями; заболевания легких,

вызванные аллергенами; заболевания легких, вызванные загрязняющими факторами, такие как асбестоз, силикоз или бериллиоз; заболевания легких, вызванные аспирацией желудочного содержимого, нарушением иммунной регуляции, воспалительные заболевания с генетической предрасположенностью, такие как муковисцидоз, и заболевания легких, вызванные физической травмой, такие как травмы дыхательных путей. Данные воспалительные заболевания также включают в себя астму, эмфизему, бронхит, хроническое обструктивное легочное заболевание (COPD), саркоидоз, гистиоцитоз, лимфангиомиоматоз, острое повреждение легких, синдром острого нарушения дыхания, хроническое заболевание легких, бронхопальмональную дисплазию, внебольничную пневмонию, госпитальную пневмонию, вызванную искусственной вентиляцией легких пневмонию, сепсис, вирусную пневмонию, инфекцию гриппа, парагриппозные инфекции, инфекцию ротавируса, инфекцию человеческого метапневмовируса, респираторно-синцитиальную инфекцию, *Aspergillus* и другие грибковые инфекции. Как правило, связанные с инфекцией воспалительные заболевания могут включать в себя вирусную или бактериальную пневмонию, включая тяжелую пневмонию, муковисцидоз, бронхит, обострения заболеваний дыхательных путей и синдром острого нарушения дыхания (ARDS). Такие связанные с инфекцией заболевания могут вовлекать множество инфекций, таких как первичная вирусная и вторичная бактериальная инфекция. Нарушение подачи сигналов ST2L может играть роль в патогенезе легочных заболеваний, таких как астма и хроническое обструктивное легочное заболевание (COPD) (обзор Alcorn et al., *Annu. Rev Physiol* 72:495-516, 2010 г.). Часто применяемые модели астмы и воспалений дыхательных путей включают в себя модель со стимуляцией овальбумином, модели с метахолиновой сенсibilизацией и сенсibilизацией *Aspergillus fumigatus* (Hessel et al., *Eur J Pharmacol* 293:401-12, 1995 г.). Ингибирование продукции цитокинов и хемокинов в культурах человеческих бронхиальных клеток эпителия, бронхиальных фибробластов или клеток гладкой мускулатуры дыхательных путей также можно использовать в качестве моделей *in vitro*. Введение антагонистов настоящего изобретения в любую из данных моделей можно использовать для оценки эффективности применения данных антагонистов для облегчения симптомов и изменения течения астмы, воспалений дыхательных путей, COPD и т.п.

Астма является воспалительным заболеванием легких, которое характеризуется гиперчувствительностью дыхательных путей (AHR), бронхостенозом, хрипами в легких, эозинофильным или нейтрофильным воспалением, гиперсекрецией слизи, субэпителиальным фиброзом и повышенным уровнем иммуноглобулина IgE. Больные астмой пациенты испытывают "приступы", ухудшение симптомов, чаще всего из-за микробиологических инфекций респираторного тракта (например, риновирус, вирус гриппа, гемофильная палочка *Haemophilus influenzae* и т.п.). Астматические атаки могут провоцироваться факторами окружающей среды (например, аскариды, насекомые, животные (например, кошки, собаки, кролики, мыши, крысы, хомячки, морские свинки и птицы), грибки, загрязнение воздуха (например, табачный дым), раздражающие газы, запахи, испарения, аэрозоли, химикаты, пыльца, физические упражнения или холодный воздух). Кроме астмы некоторые хронические, поражающие легкие воспалительные заболевания характеризуются нейтрофильной инфильтрацией дыхательных путей, например, хроническое обструктивное легочное заболевание (COPD), бактериальная пневмония и муковисцидоз (Linden et al., *Eur Respir J* 15:973-7, 2000 г.; Rahman et al., *Clin Immunol* 115:268-76, 2005 г.), а заболевания, такие как хроническое обструктивное легочное заболевание (COPD), аллергические риниты и муковисцидоз, характеризуются гиперчувствительностью дыхательных путей (Fahy и O'Byrne, *Am. J Respir Crit Care Med* 163:822-3, 2001 г.). Часто применяемые модели астмы и воспалений дыхательных путей включают в себя модель со стимуляцией метахолином после сенсibilизации и стимуляции овальбумином (Hessel et al., *Eur J Pharmacol* 293:401-12, 1995 г.). Ингибирование продукции цитокинов и хемокинов в культурах человеческих бронхиальных клеток эпителия, бронхиальных фибробластов или клеток гладкой мускулатуры дыхательных путей можно использовать в качестве моделей *in vitro*. Введение антител-антагонистов настоящего изобретения в любую из данных моделей можно использовать для оценки эффективности применения данных антагонистов для облегчения симптомов и изменения течения астмы, воспалений дыхательных путей, COPD и т.п.

Сигнализация IL-33 через рецептор ST2L на клетках TH2, базофильных клетках, мастоцитах и недавно описанных лимфоидных клетках врожденного иммунитета 2-го типа приводит к секреции IL-5 и IL-13 (цитокинов 2-го типа) (обзор ILC представлен в публикации Spits et al., *Nature Reviews Immunology* 13:145-149, 2013 г.). Благоприятные эффекты терапевтического воздействия, ориентированного на IL-5 или IL-13, при астме подтверждает значимость данных сигнальных путей. IL-5 активирует эозинофилы, и лечение подгруппы пациентов с тяжелой астмой и эозинофилией в слюне моноклональным антителом, нейтрализующим IL-5, приводило к меньшему числу обострений (Nair et al. *N. Engl. J. Med.* 2009 г.; 360(10):985-93). Для IL-13 показано участие в синтезе IgE, секреции слизи и фиброзе. Лечение пациентов с тяжелой астмой моноклональным антителом к IL-13 приводило к улучшению легочной функции, и в данной подгруппе было продемонстрировано более значительное улучшение (Cogen et al., *N. Engl. J. Med.*, 365:1088-1098, 2011 г.). Также в патогенезе астмы участвуют другие медиаторы различных иммунологических путей, и блокирование данных путей наряду с ST2L может обеспечить дополнительный терапевтический эффект. Терапии, ориентированные на множество цитокинов 2-го типа, или на сигнальные пути, расположенные выше продукции цитокинов 2-го типа, могут обеспечивать благоприятный

эффект при лечении тяжелого заболевания.

Домены VH и VL антител к ST2L настоящего изобретения могут встраиваться в биспецифические антитела и молекулы, описанные в настоящем документе, причем биспецифические антитела специфически связываются с доменом I ST2L и со вторым антигеном, таким как TSLP (тимусный стромальный лимфопоэтин), IL-25, IL-17RB или TSLPR.

IL-25 и TSLP, подобно IL-33, активируют высвобождение цитокинов 2-го типа через разные сигнальные комплексы: IL-25 (IL-17E) входит в семейство IL-17 и активирует сигнализацию через IL-17RA/IL-17RB, а TSLP входит в семейство IL-7 и активирует сигнализацию через гетеродимеры TSLPR/IL-7R α (обзор Koyasu et al., *Immunol* 132:475-481, 2011 г.). Животные, лишенные IL-33, ST2L, IL-25, IL-17RB, TSLP или TSLPR, демонстрируют меньшую тяжесть воспалений дыхательных путей по меньшей мере в одном из множества типов моделей астмы на мышах; однако в большинстве данных животных моделей продемонстрирована недостаточность защиты от воспаления дыхательных путей, повышающая вероятность того, что воздействие на эпителий различных аллергенов или патогенов приведет к параллельному высвобождению IL-33, IL-25 и TSLP. В публикации Hammad et al. отмечено, что введение мышам экстракта из домашних пылевых клещей приводило к увеличению высвобождения IL-25, TSLP и IL-33 (а также IL-5 и IL-13 после IL-33) в дыхательных путях (Hammad et al., *Nat Med* 15:210-216, 2009 г.). Предполагается, что блокирование ST2L и TSLP и/или IL-25 может оказывать благоприятные эффекты, особенно при тяжелом заболевании дыхательных путей.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело-антагонист, специфически связывающееся с доменом I человеческого ST2L, можно использовать для получения биспецифических молекул, связывающихся с ST2L и TSLP, ST2L и IL-25, ST2L и TSLPR, ST2L и IL-17RA, или ST2L и IL-17RB.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело-антагонист, специфически связывающееся с доменом I человеческого ST2L, представляет собой биспецифическое антитело, причем антитело дополнительно связывается с TSLP, IL-25, TSLPR, IL-17RA или IL-17RB.

Антитела, связывающиеся с TSLP, IL-25, TSLPR, IL-17RA и IL-17RB, можно получать с использованием способов, описанных в настоящем документе, таких как иммунизация мышей, экспрессирующих локусы человеческого иммуноглобулина (Lonberg et al., *Nature* 368:856-9, 1994 г.; Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-51, 1996 г.; Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-56, 1997 г., патенты США №№ 5770429, 7041870 и 5939598), или мышей Balb/c соответствующими белками или внеклеточными доменами белков, или с использованием библиотек фаговых дисплеев, как описано в настоящем документе. В альтернативном варианте осуществления существующие антитела к TSLP, IL-25, TSLPR, IL-17RA и IL-17RB можно использовать для получения биспецифических молекул. Примеры пригодных для использования антител к IL-25 описаны, например, в международной патентной публикации № WO 2011/123507.

Артриты, включая остеоартрит, ревматоидный артрит, артрит суставов, возникший в результате повреждения, и т.п., являются обычными воспалительными состояниями, лечение которых можно улучшить за счет терапевтического применения таких противовоспалительных белков, как антагонисты, представленные в настоящем изобретении. Активация сигнального ST2L-пути может приводить к непрекращающемуся воспалению и дополнительному повреждению тканей в воспаленном суставе. Известно несколько животных моделей для изучения ревматоидного артрита. Например, при моделировании коллагениндуцированного артрита (CIA) у мыши развивается хронический воспалительный артрит, который очень напоминает человеческий ревматоидный артрит. У мышей с отсутствием ST2L (ST2KO) в данной модели развивалось ослабленное заболевание, и патология при данной модели зависела от экспрессии ST2L мастоцитами (Xu et al., *PNAS* 105:10913-8, 2008 г.). В данной модели наблюдали сниженную инфильтрацию моноядерных и полиморфноядерных клеток и сниженную синовиальную гиперплазию суставов у мышей с ST2KO. При культивации дренирующих лимфоузлов ST2KO с коллагеном (CII) было показано существенное снижение продукции IL-17, IFN γ и TNF α . У мышей с отсутствием ST2L, которым перед индукцией CIA были адоптивно пересажены мастоциты костномозгового происхождения (BMMC) дикого типа (WT), развивался более тяжелый CIA, чем у мышей, которым пересаживали BMMC от мышей ST2KO. Следовательно, ST2L-сигнализация в мастоцитах была критичной для развития артрита в мышинной модели, напоминающей человеческий ревматоидный артрит. Введение антител ST2L настоящего изобретения, что ингибирует ответы мастоцитов, в мышинной модели с CIA можно использовать для оценки эффективности применения данных антагонистов для облегчения симптомов и изменения течения болезни.

Примеры воспалительных состояний включают в себя воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), язвенный колит (UC) и болезнь Крона (CD), колит, индуцированный внешними воздействиями (например, желудочно-кишечное воспаление (например, колит), вызванные терапевтическими режимами или сопутствующие им (например, в качестве побочного эффекта), таким как химиотерапия, радиотерапия и т.п.), инфекционный колит, ишемический колит, коллагеновый или лимфоцитарный колит, некротический энтероколит, колиты, вызванные другими состояниями, такими как хроническая гранулематозная болезнь или целиакия, пищевые аллергии, гастриты, инфекционные гастриты или энтероколиты (на-

пример, хронический активный гастрит, вызванный инфекцией *Helicobacter pylori*), а также другие формы желудочно-кишечного воспаления, вызванные возбудителем инфекции. Известно несколько моделей воспалительных состояний желудочно-кишечного тракта на животных. Одни из самых распространенных моделей представляют собой модель колита, индуцированного введением 2, 4, 6-тринитробензолсульфоновой кислоты/этанола (TNBS), и модель с применением оксазолон, который индуцирует хроническое воспаление и возникновение язвы толстой кишки (Neurath et al., *Intern Rev Immunol* 19:51-62, 2000 г.). В другой модели используется декстран сульфата натрия (DSS), который индуцирует острый колит, сопровождающийся такими симптомами, как кровавая диарея, потеря веса, сокращение толстой кишки и вызываемое инфильтрацией нейтрофилов возникновение язвы слизистой оболочки. Другая модель основана на адоптивном переносе интактных CD45RB^{high} CD4 T-клеток мышам линий RAG или SCID. В данной модели интактные T-клетки донора атакуют кишечник реципиента, вызывая хроническое воспаление пищеварительного тракта и симптомы, сходные с воспалительным заболеванием кишечника человека (Read и Powrie, *Curr. Protoc Immunol*, глава 15, раздел 15.13, 2001 г.). Введение антагонистов настоящего изобретения в любую из данных моделей можно использовать для оценки потенциальной эффективности данных антагонистов в облегчении симптомов и изменении течения болезней, связанных с воспалительным процессом в пищеварительном тракте, таким как воспалительное заболевание кишечника.

Фиброз почек может развиваться из-за острого инсульта, такого как ишемия, спровоцированная трансплантатом/реперфузией (Freese et al., *Nephrol Dial Transplant* 16:2401-6, 2001 г.), или хронического заболевания, такого как диабет (Ritz et al., *Nephrol Dial Transplant* 11 Suppl 9:38-44, 1996 г.). Как правило, патогенез характеризуется исходной воспалительной реакцией с последующим устойчивым фиброгенезом аппарата клубочковой фильтрации и канальцевого интерстиция (Liu, *Kidney Int* 69: 213-7, 2006 г.). Было показано, что тубулоинтерстициальный фиброз играет критическую роль в патогенезе поражения почек до развития терминальной почечной недостаточности, также было выявлено, что клетки проксимальных канальцев являются основным медиатором (Phillips and Steadman, *Histol Histopathol* 17: 247-52, 2002 г.; Phillips, *Chang Gung Med J* 30: 2-6, 2007 г.). Фиброгенез в тубулоинтерстициальном отделе частично опосредуется активацией находящихся там фибробластов, которые выделяют провоспалительные цитокины, стимулирующие эпителий проксимальных канальцев к выделению местных медиаторов воспаления и фиброгенеза. Кроме того, фибробласты и клетки эпителия выделяют хемотаксические цитокины, которые обеспечивают направленный градиент, направляющий проникновение моноцитов/макрофагов и T-клеток в тубулоинтерстиций. Воспалительный инфильтрат продуцирует дополнительные фиброгенные и провоспалительные цитокины, что ведет к дополнительной активации высвобождения цитокинов из фибробластов и эпителия, тогда как в эпителии происходит изменение фенотипа, при котором клетки накапливают избыточное количество компонентов внеклеточного матрикса (Simonsen, *Kidney Int* 71: 846-54, 2007 г.).

Другие примеры фиброзных заболеваний могут включать в себя фиброз печени (включая, без ограничений, алкогольный цирроз, вирусный цирроз, аутоиммунный гепатит); фиброз легких (включая, без ограничений, склеродерму, идиопатический легочный фиброз); фиброз почек (включая, без ограничений, склеродерму, диабетический нефрит, гломерулярный нефрит, волчаночный нефрит); кожный фиброз (включая, без ограничений, склеродерму, гипертрофические и келоидные рубцы, ожоги); миелофиброз; нейрофиброматоз; фиброму; кишечный фиброз; и фиброзные спайки в результате хирургических вмешательств. Фиброз может быть органоспецифическим или системным. Органоспецифический фиброз может быть связан с одним из следующих заболеваний: фиброз легких, фиброз печени, фиброз почек, фиброз сердца, фиброз сосудов, фиброз кожи, фиброз глаза или фиброз костного мозга.

Фиброз легких может быть связан с одним из следующих заболеваний: идиопатический легочный фиброз, медикаментозный легочный фиброз, астма, саркоидоз или хроническое обструктивное легочное заболевание. Фиброз печени может быть связан с одним из следующих заболеваний: цирроз, шистосомоз или холангит. Цирроз может быть либо алкогольным, возникшим после гепатита С или первичным билиарным циррозом. Холангит может быть склерозирующим холангитом. Фиброз почек может быть связан с диабетической нефропатией или с вызванным системной красной волчанкой гломерулосклерозом. Фиброз сердца может быть связан с инфарктом миокарда. Фиброз сосудов может быть связан с повторным сужением артерий после ангиопластики или атеросклерозом. Фиброз кожи может быть связан с возникшими в результате ожога рубцами, гипертрофическими рубцами, келоидными рубцами или нефрогенной фиброзирующей дермопатией. Фиброз глаза может быть связан с ретро-орбитальным фиброзом, с хирургическим вмешательством при лечении катаракты или пролиферативной витреоретинопатией. Фиброз костного мозга может быть связан с идиопатическим миелофиброзом или медикаментозным миелофиброзом. Системные фиброзы могут быть системными склерозами или реакцией "трансплантат против хозяина".

Другие воспалительные заболевания и нейропатии, которые можно предотвратить или вылечить способами настоящего изобретения, вызываются аутоиммунными заболеваниями. Данные заболевания и нейропатии включают в себя рассеянный склероз, системную красную волчанку и нейродегенеративные заболевания и расстройства центральной нервной системы (CNS), включая болезнь Альцгеймера, бо-

лезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, биполярное аффективное расстройство и амиотрофический боковой склероз (ALS), болезни печени, включая первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, неалкогольную жировую инфильтрацию (жировой метаморфоз) печени/стеатогепатит, фиброз, вирус гепатита С (ВГС) и вирус гепатита В (ВГВ), диабет и резистентность к инсулину, сердечнососудистые расстройства, включая атеросклероз, церебральные кровотечения, инсульт и инфаркт миокарда, артрит, ревматоидный артрит, псориатический артрит и ювенильный ревматоидный артрит (JRA), остеопороз, остеоартрит, панкреатит, фиброз, энцефалит, псориаз, гигантоклеточный артериит, анкилозирующий спондилит, аутоиммунный гепатит, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), воспалительные заболевания кожи, трансплантат, рак, аллергии, эндокринные заболевания, заживление ран, другие аутоиммунные расстройства, гиперчувствительность дыхательных путей, а также клеточные, вирусные или опосредованные прионами инфекции или расстройства.

Одним вариантом осуществления настоящего изобретения является способ лечения или предотвращения ST2L-опосредованного заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного человеческого или адаптированного к человеку антитела-антагониста, которое специфически связывается с доменом I (SEQ ID NO: 9) человеческого ST2L, блокирует взаимодействие IL-33/ST2L, конкурирует за связывание с человеческим ST2L (SEQ ID NO: 1) с выделенным антителом, содержащим переменный участок тяжелой цепи (VH) последовательности SEQ ID NO: 47 и переменный участок легкой цепи (VL) последовательности SEQ ID NO: 51, и/или связывается с человеческим ST2L по аминокислотным остаткам 35-48 последовательности SEQ ID NO: 1 (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210), требующему лечения пациенту в течение периода времени, достаточного для лечения или предотвращения ST2L-опосредованного заболевания.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является способ ингибирования ответа мастоцитов у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного человеческого или адаптированного к человеку антитела-антагониста, которое специфически связывается с доменом I (SEQ ID NO: 9) человеческого ST2L, блокирует взаимодействие IL-33/ST2L, конкурирует за связывание с человеческим ST2L (SEQ ID NO: 1) с выделенным антителом, содержащим переменный участок тяжелой цепи (VH) последовательности SEQ ID NO: 47 и переменный участок легкой цепи (VL) последовательности SEQ ID NO: 51, и/или связывается с человеческим ST2L по аминокислотным остаткам 35-48 последовательности SEQ ID NO: 1 (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210), требующему лечения пациенту в течение периода времени, достаточного для ингибирования ответа мастоцитов.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является способ ингибирования взаимодействия IL-33 и ST2L у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного человеческого или адаптированного к человеку антитела-антагониста, которое специфически связывается с доменом I (SEQ ID NO: 9) человеческого ST2L, блокирует взаимодействие IL-33/ST2L, конкурирует за связывание с человеческим ST2L (SEQ ID NO: 1) с выделенным антителом, содержащим переменный участок тяжелой цепи (VH) последовательности SEQ ID NO: 47 и переменный участок легкой цепи (VL) последовательности SEQ ID NO: 51, и/или связывается с человеческим ST2L по аминокислотным остаткам 35-48 последовательности SEQ ID NO: 1 (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210), в количестве, достаточном для ингибирования взаимодействия IL-33 и ST2L.

В другом варианте осуществления ST2L-опосредованное заболевание представляет собой астму, гиперреактивность дыхательных путей, саркоидоз, хроническое обструктивное легочное заболевание (COPD), идиопатический легочный фиброз (IPF), муковисцидоз, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), эозинофильный эзофагит, склеродерму, атопический дерматит, аллергический ринит, буллезный пемфигоид, хроническую крапивницу, диабетическую нефропатию, ревматоидный артрит, интерстициальный цистит или реакцию "трансплантат против хозяина" (GVHD).

В другом варианте осуществления ST2L-опосредованное заболевание связано с рекрутингом воспалительных клеток в легкие, гиперплазией бокаловидных клеток и повышенной секрецией слизи.

В другом варианте осуществления ST2L-опосредованное заболевание связано с ответом мастоцитов.

В другом варианте осуществления ингибирование ответа мастоцитов включает ингибирование уровня высвобождения GM-CSF, IL-5, IL-8, IL-10 или IL-13 мастоцитами пуповинной крови человека по меньшей мере на 50% антителом в концентрации 50 мкг/мл.

В другом варианте осуществления антитело-антагонист, вводимое требующему лечения пациенту, представляет собой биспецифическое антитело, которое специфически связывается с доменом I (SEQ ID NO: 9) человеческого ST2L, блокирует взаимодействие IL-33/ST2L, конкурирует за связывание с человеческим ST2L (SEQ ID NO: 1) с выделенным антителом, содержащим переменный участок тяжелой цепи (VH) последовательности SEQ ID NO: 47 и переменный участок легкой цепи (VL) последовательности SEQ ID NO: 51, и/или связывается с человеческим ST2L по аминокислотным остаткам 35-48 последовательности SEQ ID NO: 1 (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210), а также связывается с TSLP, IL-25, TSLPR, IL-17RA или IL-17RB.

Введение/фармацевтические композиции

"Терапевтически эффективное количество" антител к ST2L, эффективных в лечении заболеваний, при которых желательна биологическая активность модуляции ST2L, может быть определено путем стандартных исследовательских способов. Например, дозу антител к ST2L, эффективную при лечении воспалительного заболевания, такого как астма или ревматоидный артрит, можно определить введением антител к ST2L в соответствующие модели животных, такие как модели, описанные в настоящем документе.

Кроме того, для идентификации оптимальных диапазонов дозы можно использовать анализы *in vitro*. Выбор конкретной эффективной дозы (например, с помощью клинических испытаний) может осуществляться специалистами в данной области на основе нескольких факторов. Такие факторы включают в себя подлежащее лечению или предотвращению заболевание, симптомы заболевания, массу тела пациента, иммунологический статус пациента и другие факторы, известные специалистам в данной области. Точная доза, предназначенная для применения в составе, также зависит от способа введения и от тяжести болезни, и она должна определяться на основе решения медработника и состояния каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать на основе кривой динамики доза-ответ, полученной в испытываемых системах моделей животных *in vitro*.

Для введения предназначенных для терапевтического применения антител можно использовать любой подходящий путь введения, который обеспечивает доставку агента пациенту. Фармацевтические композиции данных антител являются особенно подходящими для парентерального введения, например, внутривенного, внутримышечного, внутривенного, подкожного или интраназального введения.

Антитела настоящего изобретения можно получить в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество агента в качестве активного компонента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин "носитель" относится к растворителю, адъюванту, эксципиенту или несущей среде, вместе с которыми будет вводиться соединение. Такие фармацевтические несущие среды могут представлять собой жидкости, такие как вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла растительного, животного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Например, можно использовать 0,4% солевой раствор и 0,3% раствор глицина. Данные растворы стерильны и, по существу, свободны от твердых примесей. Стерилизацию проводят с использованием стандартных, хорошо известных способов стерилизации (например, фильтрования). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для соответствующих физиологических условий, такие как агенты, необходимые для контроля и изменения pH, стабилизаторы, загустители, увлажнители и красители и т.п. Концентрация антитела настоящего изобретения в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т.е. от менее приблизительно 0,5%, обычно от не менее или равной приблизительно 1%, и до 15-20 вес.% и будет определяться преимущественно на основе необходимой дозы, объемов текучей среды, вязкости и т.п., в соответствии с конкретным выбранным способом введения.

Таким образом, фармацевтическая композиция настоящего изобретения для внутримышечной инъекции может содержать 1 мл стерильной воды буфера, а также от приблизительно 1 нг до приблизительно 100 мг, например, от приблизительно 50 нг до приблизительно 30 мг, или более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 25 мг антитела к ST2L настоящего изобретения. Аналогичным образом фармацевтическая композиция настоящего изобретения для внутривенной инфузии может содержать приблизительно 250 мл стерильного раствора Рингера и от приблизительно 1 до приблизительно 30 мг, предпочтительно приблизительно от 5 до приблизительно 25 мг антагониста настоящего изобретения. Действительные способы получения парентерально вводимых композиций хорошо известны и более подробно описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Science, 15-е изд., Mack Publishing Company, Easton, PA.

Антитела настоящего изобретения можно лиофилизировать для хранения и восстановить в подходящем носителе перед применением. Было показано, что данный способ является эффективным для стандартных иммуноглобулинов и белковых препаратов, причем можно использовать способы лиофилизации и восстановления, известные в данной области.

Настоящее изобретение описано со ссылкой на следующие конкретные, но не имеющие ограничительного характера примеры.

Материалы и способы (общие)

Анализ ингибирования связывания рецептора с лигандом у человека и яванского макака (*Macaca fascicularis*, cyno) (RLB-анализ)

На 96-луночный планшет наносили 50 мкл 4 мкг/мл человеческого ST2L-ECD (аминокислоты 19-328 последовательности SEQ ID NO: 1) или 2 мкг/мл ST2L-ECD яванского макака (аминокислоты 19-321 последовательности SEQ ID NO: 2), содержащих C-концевую метку His6, в бикарбонатном буфере при 4°C на 16 часов. Все последующие стадии выполняли при комнатной температуре. Планшет блокировали блокирующим буфером, 200 мкл, и промывали трижды промывочным буфером, 300 мкл, содержащим PBS+0,05% Tween. 30 мкл mAb к ST2L в различных разведениях добавляли в лунки и культивировали в

течение 1 ч. Для анализа связывания человеческого рецептора с лигандом добавляли 20 мкл биотинилированного человеческого IL-33 (остатки 112-270 последовательности SEQ ID NO: 3) с конечной концентрацией 100 нг/мл и культивировали в течение 30 мин. Для анализа связывания рецептора с лигандом яванского макака добавляли 20 мкл биотинилированного IL-33 яванского макака (остатки 112-269 последовательности SEQ ID NO: 4) с конечной концентрацией 200 нг/мл и культивировали в течение 30 мин. Планшет трижды промывали, используя 300 мкл промывочного буфера. Добавляли 50 мкл 0,2 мкг/мл раствора комплекса стрептавидин-пероксидаза хрена (Streptavidin-HRP) (Jackson ImmunoResearch) и культивировали в течение 30 минут. Планшет трижды промывали, используя 300 мкл промывочного буфера, содержащего PBS+0,05% Tween. В каждую лунку добавляли 50 мкл субстрата TMB (EMD Biosciences). Реакцию останавливали, добавляя 100 мкл 0,2 Н серной кислоты. OD450 измеряли с использованием спектрофотометра для прочтения планшетов Envision (Perkin Elmer).

Получение химерных конструкторов ST2L

Различные конструкторы с заменами человеческих и мышинных доменов I, II или III ST2L были разработаны и созданы с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Конструкторы перечислены в табл. 1. Нумерация аминокислот соответствует человеческому ST2L (hST2L)(SEQ ID NO: 1; NP 057316) и мышинному ST2L (mST2L)(SEQ ID NO: 5; NP 001020773).

Таблица 1

Название конструктора	Происхождение аминокислотных остатков для каждого домена в химерных конструкторах		
	Домен I	Домен II	Домен III
ННМ-ST2L	hST2L aa. 19-122	hST2L aa. 123-202	mST2L aa. 209-324
МНМ-ST2L	mST2L aa. 28-128	hST2L aa. 123-202	mST2L aa. 209-324
НМН-ST2L	hST2L aa. 19-122	mST2L aa. 129-208	hST2L aa. 203-321
НН-ST2L	hST2L aa.19-122	hST2L aa. 123-205	N/A
	hST2L: человеческий ST2L SEQ ID NO: 1		
	mST2L: мышинный ST2L SEQ ID NO: 5		

Анализ для определения связывания с доменом

Антитело, связывающееся с доменом I, II или III ST2L, определяли с использованием стандартного метода ИФА с захватом и с электрохемилюминесцентным форматом детекции (технология Meso-Scale Discovery (MSD)). На каждую лунку планшета MSD HighBind (5 мкл/лунка) наносили 10 мкг/мл каждого антитела на 2 ч при комнатной температуре. Планшет блокировали 150 мкл 5% блокирующего буфера MSD в течение 2 ч при комнатной температуре и трижды промывали промывочным буфером с HEPES с последующим добавлением 25 мкл меченого сульфо-меткой человеческого белка huST2L-ECD или мышинного белка ST2L-ECD (аминокислоты 28-326 последовательности SEQ ID NO: 5), или химер ННМ-ST2L (SEQ ID NO:6) или НМН-ST2L (SEQ ID NO: 8), или НН-ST2L (остатки 19-205 последовательности SEQ ID NO: 1) на планшет, в концентрациях, возрастающих в диапазоне от 5 до 40 нМ. Планшет закрывали алюминиевой фольгой и культивировали в течение 1 ч при комнатной температуре с осторожным покачиванием. Затем планшет трижды промывали промывочным буфером с HEPES. В каждую лунку добавляли буфер считывания MSD (150 мкл) и проводили сканирование с помощью сканера MSD Sector Imager 6000.

Антитела, связавшиеся с человеческим ST2L-ECD, ННМ-ST2L и НМН-ST2L, но не с мышинным ST2L-ECD, распознают домен I человеческого ST2L-ECD. Антитела, связавшиеся с человеческим ST2L-ECD, НМН-ST2L, но не с ННМ-ST2L и не с мышинным ST2L-ECD, распознают домен III человеческого ST2L-ECD. Антитела, связавшиеся с человеческим и мышинным ST2L-ECD, но не с НН-ST2L, распознают домен III человеческого и мышинного ST2L-ECD.

Измерение аффинности mAb к ST2L

MAb к ST2L, huST2L-ECD и ST2L-ECD яванского макака экспрессировали с использованием стандартных способов. Козьи антитела против IgG Fc γ человека, специфичные к фрагменту (номер по каталогу 109-005-098), приобрели в Jackson ImmunoResearch (г. Вест Гроув, штат Пенсильвания). Сенсорные чипы GLC (Bio-Rad, номер по каталогу 176-5011), сенсорные чипы CM-5 (GE Healthcare, номер по каталогу BR100014) и реагенты для подготовки захватной поверхности приобрели в Biacore (GE Healthcare, г. Пискатауэй, штат Нью-Джерси) или в Bio-Rad Life Sciences (Bio-Rad, г. Геркулес, штат Калифорния).

Взаимодействие антител к ST2L с меченым His₆ человеческим ST2L-ECD и меченым His₆ ST2L-

ECD яванского макака исследовали при помощи ProteOn с использованием ProteOn XPR36 при 25°C. Биосенсорную поверхность готовили, связывая козьи антитела против IgG Fc γ человека, специфичные к фрагменту, с поверхностью сенсорного чипа GLC в соответствии с инструкциями производителя по химии аминного связывания. Буфер соединения представлял собой 10 мМ ацетата натрия, pH 4,5. Козьи антитела против IgG Fc γ человека (приблизительно 4500 единиц ответа) иммобилизовали в горизонтальной ориентации. Антитела к ST2L получали в очищенном виде или в неочищенных надосадочных жидкостях. В любом случае антитела разводили в буфере PRB (PBS, pH 7,4, с добавлением 3 мМ ЭДТА и 0,005% Tween 20) в концентрации приблизительно 0,5 мкг/мл. Антитела захватывались (60-130 RU) в вертикальной ориентации чипом GLC, измененными антителами против Fc γ человека. После захвата mAb к ST2L делали инъекцию huST2L ECD в растворе (0,024-15 нМ в 5-кратных разведениях) или ST2L ECD яванского макака в растворе (0,020-5 нМ в 4-кратных разведениях) в горизонтальной ориентации. Во всех экспериментах за ассоциацией наблюдали в течение 4 мин (делали инъекцию 200 мкл со скоростью 50 мкл/мин). За диссоциацией наблюдали в течение 30 мин. Регенерации сенсорной поверхности добивались при помощи трех 15-секундных подач 10 мМ глицина, pH 1,5. Данные аппроксимировали с использованием программного обеспечения ProteOn с использованием модели связывания 1:1 с переносом массы.

Эксперименты на оборудовании Biacore проводили с использованием оптического биосенсора Biacore 2000 или Biacore 3000 (BiacoreAB). Все эксперименты проводили в буфере BRB (PBS, pH 7,4, с добавлением 3 мМ ЭДТА и 0,005% Tween 20) с добавлением или без добавления 0,1% BSA при 25°C.

Биосенсорную поверхность Biacore готовили, связывая фрагменты специфических козьих антител против IgG Fc γ человека с карбоксиметилированным декстраном на поверхности чипа CM-5 Biacore в соответствии с инструкциями производителя по химии аминного связывания. Буфер соединения представлял собой 10 мМ ацетата натрия, pH 4,5. В среднем в каждой из четырех проточных ячеек иммобилизовали 6000 единиц ответа (RU) антител. mAb к ST2L захватывались (приблизительно 33 RU) на поверхность сенсорного чипа, измененного антителами против Fc γ человека. После захвата mAb к ST2L делали инъекцию huST2L ECD в растворе (от 0,2 до 15 нМ в 3-кратных разведениях) или ST2L ECD яванского макака в растворе (от 0,2 до 15 нМ или 0,020-5 нМ в 3-кратных разведениях). За ассоциацией наблюдали в течение 4 или 8 мин (делали инъекцию 200 мкл со скоростью 50 или 20 мкл/мин для C2521 и C2519). За диссоциацией наблюдали в течение 10 мин или до 2,5 ч. Регенерации сенсорной поверхности добивались путем инъекции 50 мМ NaOH и/или инъекции 100 мМ H₃PO₄.

Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Scrubber, версия 1.1g (BioLogic Software). Выполняли двойное вычитание эталона из данных путем вычитания кривых, сгенерированных путем инъекции буфера, из кривых, полученных после вычитания кривой эталона из кривых инъекций аналита, для поправки на вклад в сигнал буфера и шума инструмента (Myszka, Journal of Mol Recogn 12:279-84, 1999 г.).

После обработки данных полученные результаты определения кинетики и аффинности анализировали с помощью программного обеспечения Scrubber или программного обеспечения BIAevaluation, версия 4.0.1 (Biacore, AB). Данные кинетики анализировали с использованием простой модели связывания 1:1, включая элемент, учитывающий перенос массы.

Измерение аффинности mAb (C1999/CNTO3914) к мышинному белку ST2L ECD

mAb к ST2L (C1999/CNTO3914) и экстраклеточный домен мышинного ST2L (muST2L-ECD) экспрессировали и очищали стандартными способами. Антитела, специфичные к фрагменту IgG Fc γ мышей, приобрели в Jackson ImmunoResearch laboratories (г. Вест Гроув, штат Пенсильвания). Сенсорные чипы и реагенты для подготовки поверхности захвата приобрели в Biacore (GE healthcare, г. Пискаатауэй, штат Нью-Джерси). В эксперименте использовали рабочий буфер Biacore running buffer (BRB), содержащий PBS pH 7,4 с 0,005% Tween 20 и 0,1 мг/мл BSA, данные регистрировали при 25°C.

Взаимодействие антител к ST2L с белком muST2L-ECD исследовали на приборе Biacore2000 при 25°C. Биосенсорную поверхность готовили, связывая антитела, специфичные к мышинному Fc γ , с поверхностью сенсорного чипа CM4, в соответствии с инструкциями производителя, относящимся к химии аминного связывания. Антитела C1999/CNTO3914 и muST2L-ECD разводили в буфере BRB. C1999 связывали, используя антитела к мышинному Fc γ (приблизительно 85 RU). После связывания делали инъекцию muST2L ECD (остатки 28-326 последовательности SEQ ID NO: 5) в растворе (начиная с 15 нМ, 5 концентраций, 3-кратное последовательное разведение). За ассоциацией наблюдали в течение 8 мин. За диссоциацией наблюдали до 6000 с. Регенерацию выполняли с помощью разведенной 1/100 фосфорной кислоты. Данные аппроксимировали в модели связывания 1:1.

Анализ на линии человеческих базофильных клеток (анализ высвобождения цитокинов базофильными клетками)

Клетки KU812 (линия человеческих базофильных клеток; ATCC, CRL-2099) высевали на стерильные 96-луночные культуральные планшеты с U-образным дном по 25000 или 50000 клеток на лунку, всего в общий объем 40 мкл питательной среды RPMI 1640 (Invitrogen) с добавлением 10% FBS и пенициллина/стрептомицина. Добавляли в различных концентрациях mAb против ST2L человека и контрольные

образцы (50 мкл/лунку) и культивировали при 37°C. Через 1 ч культивирования добавляли рекомбинантный "зрелый" IL-33 (аминокислоты 111-270 последовательности SEQ ID NO: 3) с конечной концентрацией 10 нг/мл в 10 мкл питательной среды RPMI. Затем клетки культивировали при 37°C в течение 18-24 ч, чтобы обеспечить IL-33-опосредуемую индукцию IL-5 и IL-6. После культивирования выбирали клетки, а надосадочную жидкость собирали для последующей детекции индуцированной IL-33 высвобождения IL-5 и IL-6 с помощью ИФА (R&D systems) или мультиплексных анализов с микроносителями (Millipore).

Анализ высвобождения цитокинов человеческими мастоцитами и анализ высвобождения PGD₂

Мастоциты получали из CD34+ клеток пуповинной крови человека (Lonza). Флаконы с замороженными клетками пуповинной крови $>1,0 \times 10^6$ CD34+ быстро оттаивали и переносили в коническую пробирку на 50 мл. К клеткам медленно добавляли капли подогретой или имеющей комнатную температуру среды Stem-Pro 34+добавки (всего 25 мл; Invitrogen). Клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 15 минут и ресуспендировали в среде (10 мл среды StemPro-34 со следующими добавками: 30 нг/мл IL-3, 100 нг/мл IL-6 и 100 нг/мл SCF). Клетки высевали в 2 лунки 6-луночного планшета и культивировали в течение 1 недели. На 4-е сутки клетки пересевали 1:3 в содержащую добавки среду Stem Pro-34. На 7-е сутки неприкрепленные клетки извлекали и высевали $0,5 \times 10^6$ /мл в среду StemPro-34, содержащую 10 нг/мл IL-6 и 100 нг/мл SCF. Клетки пересевали еженедельно, поддерживая плотность $0,5 \times 10^6$ /мл, до тех пор, пока через 6-10 недель не созрели мастоциты (оценивали по экспрессии FcεR1, cKit и триптазы).

Зрелые мастоциты культивировали в концентрации $0,5 \times 10^6$ /мл в среде StemPro-34 и стимулировали ежедневно в течение 4 суток IL-4 (10 нг/мл; Peprotech), IL-6 (10 нг/мл; R&D Systems) и SCF (100 нг/мл; Invitrogen). Перед анализом клетки собирали, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин и ресуспендировали в свежей среде StemPro-34 или RPMI, содержащей 10% FCS без антибиотиков, с 100 нг/мл человеческого рекомбинантного SCF. Клетки высевали с плотностью 65000-75000 клеток/0,16 мл/лунку в плоскодонный обработанный для культивирования клеток 96-луночный планшет. MAb к ST2L добавляли на планшет в конечной концентрации 50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032 мкг/мл на 30 минут перед добавлением IL-33. Рекомбинантный человеческий "зрелый" IL-33 (остатки 111-270 последовательности SEQ ID NO: 3) также готовили в виде 10-кратного раствора (10 или 30 нг/мл) в среде+100 нг/мл SCF. 20 мкл 10X IL-33 добавляли в лунки, получая конечную концентрацию 1 (фиг. 6 и 7A-7E) или 3 нг/мл (фиг. 8A-8E), и планшеты культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. Надосадочную жидкость культуры собирали через 18-24 ч после стимуляции. Планшеты центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость извлекали, наносили на 96-луночный планшет с U-образным дном и хранили при -20°C до анализа. Для анализа уровня цитокинов с использованием технологии Lumiplex™ применяли наборы реактивов для определения человеческих цитокинов от Millipore. Уровни простагландина PGD₂ измеряли с использованием набора Prostaglandin D2-MOX EIA от Cayman Chemical Company в соответствии с инструкциями производителя. Для повышения чувствительности ИФА-анализа PGD₂ в надосадочных жидкостях культур мастоцитов превращали в неразлагаемую форму MOX-PGD₂ (метоксилзамин-PGD₂) путем обработки метоксиламином гидрохлоридом (MOX-HCl).

Анализ ингибирования связывания лиганда с рецептором у мышей (RLB-анализ на мышцах)

На прозрачный 96-луночный планшет (VWR) наносили 50 мкл 2 мкг/мл козьих антител против фрагмента IgG Fc_γ человека (Jackson Immunoresearch), приблизительно на 16 ч при 4°C. Оставшиеся стадии выполняли при комнатной температуре. Лунки культивировали с блокирующим буфером, промывали и добавляли 50 мкл 2 мкг/мл мышинового белка ST2L-ECD, слитого с человеческим Fc_γ на 1 ч. Планшет промывали и добавляли 1 мкг/мл биотинилированного мышинового белка mIL-33 с добавлением или без добавления антител к мышинному белку mST2L. Планшет промывали и проводили детекцию комплексом стрептавидин-пероксидаза хрена (Jackson Immune Research) с формированием сигнала в субстрате TMB (RDI Division of Fitzgerald Industries) в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ по мышинным и человеческим репортерным генам (мышинный или человеческий RGA-анализ)

Клетки HEK293 высевали в количестве 50000 клеток на лунку в белые 96-луночные планшеты с прозрачным дном, обработанные для культивирования тканей (NUNC) в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла, 10% FBS, и культивировали в инкубаторе с увлажнением при 37°C, 5% CO₂ в течение 24 ч. Затем выполняли сотрансфицирование векторами, кодирующим кДНК человеческого или мышинового белка ST2L-ECD и NF-κB-люциферазу (Stratagene, Agilent Technologies, г. Санта-Клара, штат Калифорния) с использованием Lipofectamine™ 2000 в среде Opti-MEM (Invitrogen) с применением стандартных протоколов. После 24-часового культивирования при 37°C, 5% CO₂, трансфицированные клетки обрабатывали мышинным (R&D Systems, остатки 109-266 последовательности SEQ ID NO: 5) или человеческим IL-33 (остатки 112-270 из SEQ ID NO: 3) с добавлением или без добавления антител к ST2L в течение 16 ч при 37°C, 5% CO₂. Люциферазную активность измеряли с использованием реагента Steady-Glo® (Promega) в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ пролиферации Т-клеток у мышей

Мышиные клетки Th2 (D10.G4.1, ATCC) культивировали в полной питательной среде: RPMI 1640 с 2 mM L-глутамин с скорректированным содержанием бикарбоната натрия 1,5 г/л, 4,5 г/л глюкозы, 10 mM HEPES и 1,0 mM пирувата натрия, а также с добавлением следующих реагентов: 0,05 mM 2-меркаптоэтанол, 10 пг/мл IL-1 α (R&D Systems), 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), 10% крысиного фактора T-STIM с Con A (культуральная добавка крысиного IL-2, Becton Dickinson). Клетки двукратно промывали средой для проведения анализа (RPMI, 10% FBS, без IL-1, без T-STIM), ресуспендировали в концентрации $1,25 \times 10^5$ клеток на мл и высевали в 80 мкл среды на белые 96-луночные планшеты с прозрачным дном, обработанные для тканевых культур (NUNC, г. Рочестер, штат Нью-Йорк). К клеткам добавляли различные количества мышинового IL-33 (остатки 109-266 последовательности SEQ ID NO: 5), конечный объем 100 мкл. При испытании нейтрализации антителами к клеткам добавляли контрольные антитела (введенные в среду, в которой культивировали гибридные клетки) или надосадочные жидкости гибридных клеток и культивировали в течение 1 ч с последующим добавлением 20 пг/мл mIL-33. Планшеты культивировали в течение 24 ч в инкубаторе с увлажнением при 37°C, 5% CO₂. Количественную проверку жизнеспособных клеток проводили реагентами CellTiter-Glo® (Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин); протокол проводили в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ на мастоцитах костномозгового происхождения

Мышиные мастоциты получали из костного мозга мышей Balb/c (6 недель). Клетки высевали в количестве 300000 клеток на лунку в среде RPMI (без эндотоксина), 10% FBS, 10% среды, кондиционированной клетками WEHI, 10 нг/мл IL-3 (Peprotech), 0,1 mM незаменимых аминокислот, 1% пенициллина/стрептомицина (Invitrogen). MAb к ST2L (100, 10, 1, 0,1 или 0,01 мкг/мл) культивировали с клетками в течение 1 ч, после чего добавляли "зрелый" мышинный IL-33 (остатки 109-266 последовательности SEQ ID NO: 215 (10 нг/мл; R&D Systems)). Приблизительно через 24 ч собирали надосадочные жидкости и замораживали до проведения анализа с использованием набора реактивов Millipore Mouse 22-plex для Lumipex™ в соответствии с инструкциями производителя. Анализ на клетках эндотелия яванского макака Аортальные эндотелиальные клетки яванского макака, культивируемые в питательной среде для эндотелиальных клеток EGM®-2 Endothelial Cell Growth Medium-2 (Lonza), высевали на культуральные 96-луночные планшеты в количестве 10000 или 20000 клеток на лунку. Добавляли 50 мкл антител к ST2L, начиная от концентрации 100 мкг/мл с последовательными 4- или 5-кратными разведениями, и культивировали при 37°C в течение 1 ч, после чего добавляли "зрелый" рекомбинантный IL-33 яванского макака (SEQ ID NO: 4). Затем к клеткам добавляли 50 мкл 20 нг/мл IL-33 яванского макака и культивировали при 37°C в течение 24 ч. Для анализа индуцированных IL-33 цитокиновых ответов выбирали надосадочные жидкости и анализировали уровень цитокинов с использованием комплекта реактивов Non-Human Primate IL-8 для Lumipex™ (Millipore) в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ перитонеального лаважа у мышей

Брюшные полости 6 мышей Balb/c промывали PBS полным объемом 3 мл для сбора перитонеальных клеток. Большинство данных клеток, судя по экспрессии B220 и F4/80 (FACS-анализ), оказались лимфоцитами и макрофагами. Приблизительно 1% составили мастоциты cKit⁺ (CD117⁺). Клетки центрифугировали и осадок ресуспендировали до концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде Alpha MEM+10% FBS+100 ME/мл пенициллина+100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen). Клетки высевали в объеме 200 мкл на лунку на 96-луночный планшет и оставляли на 2 ч при 37°C. К клеткам добавляли mAb к ST2L, а через 30 минут добавляли 10 нг/мл "зрелого" мышинового IL-33 (R&D Systems; остатки 109-266 последовательности SEQ ID NO: 215). Надосадочные жидкости собирали через 24 ч после добавления IL-33, хранили при -20°C до проведения анализа и анализировали с использованием набора реактивов Millipore Mouse 22-plex для Lumipex™ в соответствии с инструкциями производителя.

Пример 1. Получение крысиных антител к мышинному ST2L

Крыс внутрибрюшинно иммунизировали мышинным ST2-Fc γ (R&D Systems (Ser27-Ser342 последовательности SEQ ID NO: 5)) и анализировали титры специфичных IgG. После получения достаточных титров выделяли спленоциты и сливали их с клетками FO. Полученные гибридомы высевали на 96-луночные планшеты или на метилцеллюлозу и культивировали в течение 10 суток. Антиген-специфические клоны выявляли стандартным методом ИФА с захватом для связывания с mST2-Fc и проводили перекрестный скрининг с одним белком Fc. Гибридомы, специфичные к ST2, затем испытывали на ингибирование связывания IL-33 с ST2 методом ИФА и на ингибирование индуцированной IL-33 пролиферации мышинных Th2-клеток D10.G4.1. Гибридомы, проявившие нейтрализацию в обоих анализах, как при связывании лиганда с рецептором, так и при клеточной пролиферации, клонально выбирали путем предельного разведения. V-участки в гибридоме секвенировали и клонировали на основе мышинового IgG1. Специфичность к домену ST2L-ECD определяли стандартным иммуносорбентным анализом с электрохемилюминесцентной детекцией, используя различные конструкторы с заменами доменов человека-мышь.

Антитело, секретируемое гибридомой C1999, было клонировано на основе мышинового IgG1 и получило наименование CNTO3914. Последовательности варьируемых и гиперварируемых участков

CNT03914 показаны в табл. 2. CNT03914 не дает перекрестной реакции с человеческим ST2L и связывается с доменом I мышинового ST2L-ECD.

Таблица 2

Название мAb	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
C1999/ CNT03914	HYGMA	13	SIITDGTSTYY RDSVKG	14	QSDDYFDY	15

mAb Название	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
C1999/ CNT03914	KSSQSLEYS DGSYLE	16	GVSNRFS	17	FQATHDPFT	18

Название мAb	Последовательность VH	SEQ ID NO:
C1999/CNT03914	EVQLVESGGGLLQPGRS LKLSTASGFI FSHYGMA WVRQAP TKGLEWVSSII TDGTSTYYR DSVKGRTI SRDNAKNTQY LQMDLSRSE DTATYYCAR QSDDYFDY WGQGVMVTSS	19
	Последовательность VL	SEQ ID NO:
	DVVLQT FPVSLSVTL GDQASISCK SSQSLEYS DGDSYL EWYLK PQGSPQLLI YGVSNR FSGV PDRFIGSG SGTDF TLKISR VEPEDL GVYCFQ ATHDPFT FGSGTK LEIK	20

Пример 2. Получение мышинных антител против ST2L человека

Для получения мышинных mAb против ST2 человека использовали две различные иммунизации.

BALB/c внутрибрюшинно иммунизировали растворимым белком ST2-Fc (R&D Systems, SEQ ID NO: 157) и анализировали титры специфичных IgG. После получения достаточных титров выделяли спленоциты и сливали их с клетками FO. Полученные гибридомы высевали на 96-луночные планшеты и культивировали в течение 10 суток. Антиген-специфичные клоны идентифицировали стандартным методом ИФА с захватом при связывании с человеческим белком huST2L-ECD с C-концевой меткой His₆ и при перекрестной реактивности с меченым His₆ ST2L-ECD яванского макака. Гибридомы, специфичные к человеческому ST2L, обладающие перекрестной реактивностью с ST2L яванского макака, затем испытывали на ингибирование связывания IL-33 с huST2L в тесте ИФА, и на ингибирование активации NF-κB в анализе по репортерному гену. Для дальнейших исследований выбирали клоны, проявляющие ингибирование в анализе по репортерному гену или в обоих анализах, как в ИФА, так и в анализе по репортерному гену.

Для дальнейших анализов отобрали гибридомы C2494, C2519A и C2521A. Гибридомы C2519A и C2521A проявляли связывание с человеческим ST2L в домене III, а гибридома C2494 проявляла связывание с человеческим ST2L в домене I. Антитело C2494 клонировали на основе IgG2, и полноразмерное антитело получило наименование STLМ62.

MAb против ST2L человека создавали в компании Genovac GmbH с применением патентованной технологии ДНК-иммунизации, с использованием полноразмерных ST2L-конструктов и бустерной иммунизации клетками, трансфицированными для экспрессии человеческого ST2L-ECD. Проводили скрининг гибридом на связывание с человеческим ST2L-ECD методом проточной цитометрии. Для клонов, проявивших связывание в данном анализе, было подтверждено связывание с hST2L-ECD, и проведена дополнительная характеристика на связывание с ST2L-ECD яванского макака стандартным методом ИФА с захватом. Выбранные клоны охарактеризовали по ингибированию связывания лиганда с рецептором методами ИФА и анализом по репортерному гену. Для дальнейших исследований выбирали клоны, проявляющие ингибирование в анализе по репортерному гену или в обоих анализах, как в ИФА, так и в анализе по репортерному гену.

Для дальнейшего анализа отобрали антитело из полученной Genovac гибридомы C2244, которое было клонировано на основе человеческого IgG2. Полноразмерное антитело получило наименование STLМ15. STLМ15 связывается с человеческим ST2L в домене I.

Последовательности доменов VH, VL и CDR мышинных античеловеческих антител представлены в табл. 3.

Таблица 3

Название mAb	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
C2519A	DYMN	21	NINPYYGSTT YNQKFKG	25	EGDYLAWFAY	29
C2521A	TYWMN	22	QIFPASGSTYY NEMFKD	26	SENIYYINFQY YFAY	30
C2244/STLM15	SDYAWN	23	FISYSGDTSFN PSLKS	27	YDGYSDY	31
C2494/STLM62	DDYMH	24	RIDPAIGNTEY APKFQD	28	GDFYAMDY	32

Название mAb	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
C2519A	RSSQSIYVSN GNTYLE	33	KVSNRFS	37	FQGSHPPT	41
C2521A	RASQNIQTRMH	34	YASESIS	38	QQSNTWPFPT	42
C2244/STLM15	RASKSVSTSGS SYMF	35	LASNLES	39	QHSREIPYT	43
C2494/STLM62	ITNTDIDDVH	36	EGNLRP	40	LQSDNMLT	44

mAb	Последовательность VH	SEQ ID NO:
C2519A	EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTDYNNWVKQ SHGKSLWIGNINPYYGSTTYNQKFKGKATLTVDKSSNTA YMHLSLTSSEDSAVYYCAREGDTYLAWFAYWGQGLTVVSA	45
C2521A	QIQLQQSGPELVRPGTSVKISCKASGYTFLTYWMNWVKQRP GGGLEWIGQIFPASGSTYYNEMFKDKATLTVDTSSSTAYMQ LSSLTSEDVAVYFCARSENIYYINFQYFAYWGQGLTVVSS	46
C2244/STLM15	EVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGFSITSDYAWNWRQFP GSKLEWMGFISYSGDTSFNPSLKSRI SVTRDTSKNQFFLQLNS VTTEDTATYYCASYDGYSDYWGQGLTVVSS	47
C2494/STLM62	EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCTASAFNIKDDYMHWVKQRPEQ GLEWIGRIDPAIGNTEYAPKFQDKATMTADTSSNTAYLQLSSL TSEDVAVYYCALGDFYAMDYWGQGSVTVSS	48

mAb	Последовательность VL	SEQ ID NO:
C2519A	DVLTQTPLSLPVSIGDQASISCRSSQSIYVYNSGNTYL EWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFGVDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLVYYCFQGSHPPTFGGKLEIK	49
C2521A	ILLTQSPAILSVSPGERVDFSCRASQNIQTRMHWYQQR TNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTISS VESEDIADYYCQSNWPFPTFGSGKLEIK	50
C2244/STLM15	DIVLTQSPASLAISLQGRATISCRASKSVSTSGSSYMF WYQQKPGQSPKLLIYASNLESGVPRFSGSGSGTDF LNHPVEEEDAAAYCQHSREIPYTFGGKLEIK	51
C2494/STLM62	ETTVTQSPASLSVATGEKVTIRCI TNDIDDVHWHYQQ KPGEPKLLISEGNTLRPGVPSRFSSSGYTDVFTIE NTLSEDEVADYYQLQSDNMLTFGAGTKLEIK	52

Пример 3. Получение полностью человеческих антител к ST2L
Связывающиеся с человеческим ST2L Fab-фрагменты выбирали из библиотек новых синтезируемых рIX-фаговых дисплеев, как описано в публикации Shi et al., J. Mol Biol 397:385-96, 2010 г.; междуна-

родной патентной публикации № WO 2009/085462; патентной публикации США № US 2010/0021477). Вкратце, библиотеки получали путем диверсификации человеческих матриц, при которой гены VH зародышевой линии IGHV1-69*01, IGHV3-23*01 и IGHV5-51*01 рекомбинировали с человеческим минигеном IGHJ-4 посредством петли H3, а человеческие гены VLкаппа зародышевой линии O12 (IGKV1-39*01), L6 (IGKV3-11*01), A27 (IGKV3-20*01) и B3 (IGKV4-1*01) рекомбинировали с минигеном IGKJ-1, получая полные домены VH и VL. Для диверсификации выбирали те позиции переменных участков легкой и тяжелой цепи вокруг петель H1, H2, L1, L2 и L3, для которых был выявлен частый контакт с белковыми и пептидными антигенами. Диверсификация последовательности в выбранных позициях ограничивалась остатками, появляющимися в каждом из положений в семействах зародышевых генов IGHV или IGLV для соответствующих генов IGHV или IGLV. Диверсификацию петли H3 получали, используя синтетические короткие или средние петли длиной 7-14 аминокислот. Распределение аминокислот в петле H3 выполнили аналогично наблюдаемой вариации аминокислот в человеческих антителах. Создание библиотеки подробно описано Shi et al., J. Mol Biol 397:385-96, 2010 г. Матрицы, использованные для создания библиотек, получали наименования в соответствии с их происхождением от человеческого зародышевого гена VH и VL. Три библиотеки тяжелых цепей скомбинировали с четырьмя зародышевыми легкими цепями или библиотеками зародышевых легких цепей, получив 24 уникальных комбинации VH:VL для сканирования. Все 24 библиотеки комбинаций VH:VL использовали в экспериментах фагового просеивания относительно huST2L-ECD-Fc_γ.

Библиотеки просеивали при помощи белка Fc, слитого с huST2L-ECD (остатки 19-328 последовательности SEQ ID NO: 1). Просеивание проводили в 2 разных форматах: антиген (Ag) в растворе и Ag в дисплее. В случае Ag в растворе покрытые стрептавидином магнитные микроносители блокировали в PBS при помощи 3% обезжиренного сухого молока. Биотинилированный (Bt) антиген, huST2L-ECD, слитый с Fc (Bt-huST2L-ECD-Fc), и 10-кратно более высокую концентрацию человеческого белка Fc в качестве конкурента смешивали с фаговыми библиотеками Fab-pIX. Фаг Fab-pIX, связавшийся с Bt-huST2L-ECD-Fc, отлавливали на заблокированные и покрытые стрептавидином (SA) магнитные микроносители. Фаговую селекцию выполняли в три цикла, в ходе которых концентрацию huST2L-ECD-Fc варьировали от 100 к 10 нМ и к 10 нМ с 1-го по 3-й цикл соответственно. В случае Ag в дисплее белок Bt-huST2L-ECD-Fc наносили на покрытые SA магнитные микроносители. Фаговые библиотеки Fab-pIX и 10-кратную концентрацию белка Fc одновременно добавляли к Bt-huST2L-ECD-Fc, экспонированному на покрытых SA магнитных носителях. Концентрации Bt-Ag составляли 100, 10, 10 нМ для циклов с 1-го по 3-й соответственно. Скрининг при обоих форматах просеивания проводили методом ИФА со связыванием Fab-фрагментов с белком huST2L-ECD-Fc. В результате селекции всего было выделено 79 Fab-фрагментов, связывающихся с hST2L-Fc. Fab-фрагмент HuT2SU-39 обладал наивысшей связывающей активностью в соответствии с данными ранжирующего ИФА.

Анализ ингибирования связывания IL-33 методом ИФА проводили на 79 Fab-фрагментах. Всего ингибирующей активностью в отношении связывания IL-33 с huST2L-ECD-FcA обладали 32 Fab-фрагмента. 46 Fab-фрагментов выбрали для созревания аффинности в процедуре с новыми полученными фагами pIX.

Пример 4. Созревание аффинности полностью человеческих антител к ST2L

Созревание аффинности выбранных антител проводили с использованием "оперативного" процесса созревания, описанного в публикациях Shi et al., J. Mol Biol 397:385-96, 2010 г. и WO 09085462A1. При данной технологии участки VH клонов Fab-фрагментов, полученные при первой селекции, комбинировали с библиотеками соответствующего матрикса VL. Все гены VH из 46 Fab-фрагментов, идентифицированных в примере 3, были клонированы в окружении соответствующих библиотек созревания VL в виде пулов, соответствующих их исходному семейству генов VL. Используемые библиотеки матриц VL и схемы их диверсификации представлены в табл. 4. Использовали следующие человеческие матрицы VL: IGKV1-39*01 (O12), IGKV3-11 (L6), IGKV3-20 (A27), IGKV4-1*01 (B3), описанные, например, в патентной публикации США № US2012/0108795. Для просеивания при созревании аффинности фаговые библиотеки сначала добавляли к Bt-huST2-ECD-Fc. После культивирования комплекс из созревающего библиотечного фага и Bt-hST2L-ECD-Fc добавляли к покрытым SA магнитным микроносителям. Концентрации Bt-huST2-Fc варьировали в циклах с R1 по R3: 10 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ. Конечное промывание цикла 3 проводили в течение ночи при комнатной температуре в присутствии 10 нМ немеченого huST2L-ECD-Fc для дополнительного увеличения аффинности.

Таблица 4

		Схема диверсификации библиотеки VL для различных матриц			
Петля	Позиция (по Кабат)	A27	B3	L6	O12
L1	30	SRNTD	RNDGHSY	SRNAD	SRNAD
	30a	SNR	RNDGHWY	-	
	30e		RNDGHSY	-	
	31	SNRADH	RNDGHWY	NSKD	SNKDG
	32	YFHQSEK	YNWR	YWDFHSAN	YHNDWFSAV
L2	50	ADGS	YWNK	ADKGYFTN	FYTNKADG
L3	91	YSHA	SYWH	RYSGF	SAYHPD
	92	YNSHIFKG	SYGN	RHNSL	FIYHNDKGRE
	93	SNTDGHR	STER	NDKR	STHNDRG
	94	TYLVFAS	WYSH	WA	TYLVFSRGPI
	96	WYFUR	YRWH	WYFUR	LWRFYIN

Всего в ходе просеивания при созревании получили 161 Fab-фрагмент с уникальными последовательностями. Fab-фрагменты, проявившие наилучшее связывание с huST2L-ECD, преобразовывали в IgG для дополнительной характеристики.

Для дополнительной характеристики отобрали mAb ST2M48, ST2M49, ST2M50 и ST2M51, и их последовательности VH, VL и CDR представлены в табл. 5. MAb ST2M48, ST2M49, ST2M50 и ST2M51 связываются с человеческим ST2L в домене III и дают перекрестную реакцию с мышиным ST2L.

Таблица 5

mAb ID	HC ID	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
ST2M48	STLH125	TSYWIG	53	GIIYPGDSY TRYSPSFQG	55	LSGRFDY	57
ST2M49	STLH149	TSYWIG	53	GIIYPGDSY TRYSPSFQG	55	IGGMFDY	58
ST2M50	STLH125	TSYWIG	53	GIIYPGDSY TRYSPSFQG	55	LSGRFDY	57
ST2M51	STLH130	SSYAIS	54	GIIPIFGTA NYAQKFQG	56	DTPQLDY	59

mAb ID	LC ID	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
ST2M48	STLL232	RASQSVRDALA	60	FASNRAT	64	QQFNTWPIT	67
ST2M49	STLL216	RASQSVANALA	61	KASNRAT	65	QQYYGWPIT	68
ST2M50	STLL228	RASQSVSNALA	62	FASNRAT	64	QQFFNWPIT	69
ST2M51	TC1L3	RASQSISSYLN	63	YASSLQS	66	QQSYSTPLT	70

Название mAb	Последовательность VH	SEQ ID NO:
ST2M48	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTRYSPSFQGOVTISA DKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYCARLSGRFDYWGQ GTLVTVSS	71
ST2M49	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTRYSPSFQGOVTISA DKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYCARIGGMFDYWGQ GTLVTVSS	72
ST2M50	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAISW VRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYNFFFDYWGQ GTLVTVSS	71

ST2M51	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCASGGTFSSYAISW VRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFGQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDTPQLDYWGQ GTLVTVSS	73
--------	--	----

Название mAb	Последовательность VL	SEQ ID NO:
ST2M48	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRDALAWY QQKPGQAPRLLIYFASNRTGIPARFSGSGSGTDFT LTISSELEPEDFAVYYCQFNTWPITFGQGTKVEIK	74
ST2M49	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVANALAWY QQKPGQAPRLLIYKASNRTGIPARFSGSGSGTDFT LTISSELEPEDFAVYYCQYYGWPITFGQGTKVEIK	75
ST2M50	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDWLAWY QQKPGQAPRLLIYKASNRTGIPARFSGSGSGTDFT LTISSELEPEDFAVYYCQYNRAPWTFGQGTKVEIK	76
ST2M51	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSELEPEDFAVYYCQYSYSTPLTFGQGTKVEIK	77

Пример 5. Определение характеристик антител к ST2L

Антитела, полученные в результате различных описанных выше процедур, дополнительно охарактеризовали по их способности блокировать взаимодействие IL-33/ST2L, по их способности ингибировать индуцированную IL-33 сигнализацию, определяемой анализом по репортерному гену NF-κB, по способности антител ингибировать ответы мастоцитов, по аффинности к ST2L, человеческому и яванского макака, и по перекрестной реактивности с мышинным ST2L. Картирование эпитопов проводили с использованием химерных конструкторов с заменой человеческих/мышинных доменов ST2L, как описано в разделе "Материалы и методы". Результаты экспериментов представлены в табл. 6, 7 и 8. В табл. 7 и 8 знак + обозначает, что антитело блокирует взаимодействие IL-33/ST2L, а знак - обозначает, что оно не блокирует взаимодействие IL-33/ST2L. Эксперименты с CNTO3914 проводили с использованием мышинных клеток и реагентов из-за отсутствия перекрестной реактивности с человеком. При анализе всех остальных антител использовали человеческие клетки и человеческие реагенты.

Охарактеризованные антитела были разделены на те, которые блокировали взаимодействие IL-33/ST2L (mAb STLM15, STLM62 и CNTO3914), и те, которые не блокировали взаимодействие IL-33/ST2L (mAb C2519, C2521, ST2M48, ST2M49, ST2M50 и ST2M51). Антитела, блокирующие взаимодействие IL-33/ST2L, связываются с доменом I ST2L, тогда как неблокирующие антитела связываются с доменом III ST2L. Испытуемые антитела ингибировали запускаемую ST2L сигнализацию, о чем свидетельствовали данные анализа по репортерному гену NF-κB и данные об индуцированном IL-33 высвобождении цитокинов в человеческой линии базофильных клеток KU812 или, в случае CNTO3914, данные о пролиферации клеток Th2 у мышей. Антитела, связывающиеся с доменом I ST2L, в большей степени ингибировали ответы человеческих мастоцитов, оцениваемые по секреции цитокинов и хемокинов, по сравнению с антителами к ST2L, связывающимися с доменом III ST2L. Антитела CNTO3914, связывающиеся с доменом I мышинного ST2L и не дающие перекрестной реакции с человеческим белком, также были способны ингибировать индуцированные IL-33 ответы мастоцитов мышей.

Таблица 6

mAb	Соответствующая гибридома	Аффинность к человеческому ST2L			Аффинность к ST2L яванского макака		
		$K_{асс}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$K_{дисс}$ (s^{-1})	K_D (pM)	$K_{асс}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$K_{дисс}$ (s^{-1})	K_D (pM)
STLM15	C2244	1,02E+06	4,25E-05	42	4,81E+06	5,30E-05	11
STLM62	C2494	4,26E+06	1,19E-04	28	4,51E+07	5,39E-04	12
na	C2519	4,83E+05	8,70E-05	180	7,14E+04	3,20E-03	44800
na	C2521	6,18E+05	4,90E-05	79	4,47E+05	1,66E-03	3710
ST2M48	na	1,32E+06	7,33E-05	56	1,03E+07	2,65E-03	257
ST2M49	na	1,59E+06	1,61E-04	101	4,66E+07	1,24E-02	266
ST2M50	na	1,15E+06	5,10E-05	45	2,01E+07	2,49E-03	124
ST2M51	na	1,29E+06	4,87E-05	38	4,42E+07	3,36E-03	76

Таблица 7

mAb	Соответствующая гибридома	RLB*	RGA#	Высвобождение цитокина базовыми	Высвобождение цитокина мастоцитами	Эпитоп ST2L
				фильмными клетками	мастоцитами	
STLM15	C2244	+	+	+	+	hD1
STLM62	C2494	+	+	+	+	hD1
	C2519	-	+	+	-	hD3
	C2521	-	+	+	-	hD3
ST2M48	NA	-	+	н/и	-	h/mD3
ST2M49	NA	-	+	н/и	-	h/mD3
ST2M50	NA	-	+	н/и	-	h/mD3
ST2M51	NA	-	+	н/и	-	h/mD3

*Ингибирование связывания лиганда с рецептором

Анализ по репортерному гену

hD1 = домен D1 человеческого ST2L

mD1 = домен D1 мышинового ST2L

hD3 - домен D3 домена ST2L

h/mD3 = домены D1 и D2 человеческого и мышинового ST2L

н/и = не испытывали

Таблица 8

mAb	Соответствующая гибридома	RLB*	RGA#	Пролиферация Т-клеток	Лаваж с перитонеальными мастоцитами	Высвобождение цитокина мастоцитами	Эпитоп ST2L
CNTO3914	C1999	+	+	+	+	+	mD1

* Ингибирование связывания лиганда с рецептором

#Анализ по репортерному гену

** Производное от костного мозга

Пример 7.

Связывающееся с доменом I ST2L антитело CNTO3914 ингибирует индуцированную интраназальным введением IL-33 гиперреактивность дыхательных путей (AHR), воспаление дыхательных путей и ответы мастоцитов мышей.

Самкам мышей линии BALB/c вводили четыре последовательных ежедневных интраназальных дозы 2 мкг/мышь "зрелого" IL-33 (R&D Systems) (остатки 109-266 последовательности SEQ ID NO: 215). Антитела CNTO3914 к мышинному ST2L профилактически вводили подкожно в дозе 20 мг/кг (или 2 мг/кг, или 0,2 мг/кг) за 24 ч до первого интраназального введения IL-33. Контрольные мыши получали изотопический контроль CNTO5516 или PBS за 24 ч до первого интраназального введения IL-33. Гиперреактивность дыхательных путей (AHR) в ответ на повышающиеся дозы метахолина измеряли с использованием принудительных процедур системой Flexivent (Scireq, г. Монреаль, Квебек, Канада). Для измерения гиперреактивности дыхательных путей (AHR) мышей анестезировали введением 100 мг/кг пентобарбитала и 13 мг/кг фенитоина, выполняли трахеостомию и затем подключали к системе FlexiVent. Мышам распылительным методом вводили солевой раствор для регистрации фоновых показаний, после чего вводили две дозы метахолина (10 и 20 мг/мл). Для солевого раствора и каждой из доз метахолина получали значения сопротивления (R) в течение приблизительно 2 мин, используя мгновенное возмущение. Пиковое сопротивление рассчитывали только для значений, для которых коэффициент детерминации (COD) превышал 0,9.

Отдельная группа мышей проходила обработку и анализ для определения ответа клеток в легких. Через двадцать четыре часа после последнего введения изотопического mIL-33 или PBS мышей умерщвляли интраперитонеально введением высокой дозы препарата Sleepaway®. Легкие мышей промывали 0,7 мл охлажденного PBS с 0,1% BSA. Полученные бронхоальвеолярные текучие среды (BAL) центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 мин, а бесклеточные надосадочные жидкости хранили при -80°C до анализа на цитокины/хемокины. Образцы BAL использовали для общих подсчетов с использованием гемацитометра. Для дифференциальных подсчетов в BAL ~200 клеток из мазков, полученных в цитоцентрифуге, подсчитывали после окраски красителем Гимза под световым микроскопом.

Собирали бесклеточные надосадочные жидкости, которые хранили при -80°C до использования в анализах белка методом Lumiplex. Ткани легких извлекали и затем проводили перфузию через правый

желудочек 5 мл стерильным холодным PBS до достижения адекватной перфузии. Доли легкого помещали в пробирку Fast Prep®, содержащую 1 мл PBS+ингибитор протеаз, и хранили при -80°C для анализа профиля цитокинов/хемокинов. Мультиплексный анализ на цитокины/хемокины проводили в соответствии с инструкциями производителя набора реактивов Murine Millipore 22-plex. Проводили анализ на мышиную протеазу-1 мастоцитов (mMCP-1) в текучей среде BAL методом ИФА (Moredun Scientific).

Гиперреактивность дыхательных путей

Антитело CNTO3914 достоверно ингибировало гиперреактивность дыхательных путей в модели легочного воспаления, индуцированного интраназальным введением IL-33 (фиг. 1). Антитело CNTO3914 вводили подкожно за 24 ч перед четырьмя последовательными ежедневными интраназальными введениями 2 мкг/мышь mIL-33. Пиковое сопротивление дыхательных путей, определяемое при помощи Flexivent, существенно снижалось при использовании 20 мг/кг CNTO3914. Каждый столбик показывает среднее значение \pm СПС для группы с числом мышей от трех (CNTO5516, изотопическое контрольное антитело) до шести. Результаты повторяли в двух отдельных исследованиях. Достоверность определяли, используя двухфакторный дисперсионный анализ с пост-тестом Бонферрони, CNTO3914/IL-33 $**p < 0,05$ в сравнении с группой, получавшей CNTO5516/IL-33; и $***p < 0,001$ в сравнении с группой, получавшей PBS и IL-33.

Воспаление дыхательных путей

Антитело CNTO3914 достоверно ингибировало в использованной модели рекрутинг клеток в бронхоальвеолярный лаваж (BAL) (фиг. 2). Антитело CNTO3914 вводили подкожно за 24 часа перед четырьмя последовательными ежедневными интраназальными введениями 2 мг/мышь mIL-33. Количество лейкоцитов в BAL достоверно увеличивалось при введении IL-33 и достоверно ингибировалось при введении CNTO3914 в дозе 20 мг/кг. Каждый столбик показывает среднее значение \pm СПС для группы с числом мышей от трех (CNTO5516, изотопическое контрольное антитело) до шести. Результаты повторяли в двух отдельных исследованиях.

Достоверность определяли, используя двухфакторный дисперсионный анализ с пост-тестом Бонферрони, $***p < 0,001$.

Ответы мастоцитов *in vivo*

В гранулах мастоцитов содержатся протеазы, включая триптазы и химазы, которые быстро высвобождаются при активации мастоцитов. Мышиная протеаза мастоцитов 1 (mMCP-1) представляет собой β -химазу, высвобождаемую при активации мастоцитов и участвующую в борьбе с паразитарными инфекциями (Knight et al., J. Exp Med 192:1849-56, 2000 г.; Huntley et al., Parasite Immunol 12:85-95, 1990 г.). Измеренный уровень mMCP-1 можно использовать в качестве маркера активации мастоцитов, и было показано, что он индуцируется в модели зависящего от мастоцитов легочного воспаления, вызванного клещами домашней пыли (Yu and Chen, J. Immunol 171:3808-15, 2003 г.). Уровень mMCP-1 в текучей среде BAL, измеренный методом ИФА (Moredun Scientific), был существенно увеличен у мышей, которым вводили IL-33, и ингибировался в зависимости от дозы при введении CNTO3914 (фиг. 3). Достоверность определяли однофакторным дисперсионным анализом с пост-тестом Тьюки, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, в сравнении с введением IL-33.

Пример 8. Антитела, связывающиеся с доменом I ST2L, ингибируют ответы мастоцитов *in vitro*

Ответы мастоцитов оценивали по высвобождению хемокинов и цитокинов мышинными и человеческими мастоцитами, а также по высвобождению простагландина D2 в человеческих мастоцитах.

Антитело CNTO3914, связывающееся с доменом I ST2L, ингибировало индуцированное IL-33 высвобождение цитокинов, включая GM-CSF (фиг. 4A), IL-5 (фиг. 4B) и TNF α (фиг. 4C), мышинными мастоцитами костномозгового происхождения.

MAb C2494 (STLM62), связывающееся с доменом I ST2L, ингибировало индуцированное IL-33 высвобождение PGD₂ мастоцитами пуповинной крови человека, вызванное 3 нг/мл IL-33, при концентрации антитела 2, 10 и 50 мкг/мл (фиг. 5).

Антитела C2494 и C2244, связывающиеся с доменом I ST2L, ингибировали индуцированное IL-33 высвобождение цитокинов GM-CSF, IL-5, IL-8, IL-13 и IL-10 мастоцитами пуповинной крови человека при концентрации антител 50, 10 и 2 мкг/мл (фиг. 6 и 8A-8E). Степень ингибирования зависела от измеренного уровня цитокинов/хемокинов, испытуемого антитела, его концентрации и используемой среды. Рассчитанное среднее процентное (%) ингибирование во всех проведенных анализах составило 50,6-100% при концентрации антител 2 мкг/мл и 62-100% при концентрации антител 50 мкг/мл (фиг. 9).

Связывающиеся с доменом III ST2L антитела C2521, C2519, ST2M48, ST2M49, ST2M50 и ST2M51 проявляли умеренный ингибирующий эффект или отсутствие ингибирующего эффекта или стимулировали индуцированное IL-33 высвобождение цитокинов мастоцитами (фиг. 7A-7E и 8A-8E) при концентрациях антител 50 и 10 мкг/мл. Степень ингибирования зависела от измеренного уровня цитокинов/хемокинов, испытуемого антитела и используемой среды. Рассчитанное среднее процентное (%) ингибирование во всех проведенных анализах составило -59,4-31,9% при концентрации антител 2 мкг/мл и -48,5-36% при концентрации антител 50 мкг/мл (фиг. 9). В некоторых анализах антитело ST2M50 ингибировало высвобождение GM-CSF, IL-5, IL-10 и IL-13 при концентрации антитела 10 мкг/мл (фиг. 8A-

8E).

Средний % ингибирования рассчитывали по следующей формуле: $(1 - (\text{концентрация высвобожденного цитокина в присутствии mAb}) / (\text{концентрация того же цитокина, высвобожденного в ответ на IL-33 в отсутствие mAb})) \times 100$. Концентрации цитокинов представлены в пг/мл. В некоторых случаях % ингибирования представляет собой отрицательное значение, и это указывает на то, что высвобождение цитокина в присутствии mAb было фактически выше высвобождения в отсутствие mAb. Небольшие вариации эффективности mAb могут проявляться в зависимости от концентраций IL-33, использованных для индукции высвобождения цитокинов в мастоцитах. Аналогично небольшие вариации эффективности mAb могут проявляться в зависимости от использованной при анализе среды (StemPro-34 в сравнении с RPMI/10% FCS). Все испытанные антитела, связывающиеся с доменом I ST2L, ингибировали высвобождение всех измеренных цитокинов и хемокинов, оцениваемое по % ингибирования, по меньшей мере на 50%, в концентрациях 2, 10 или 50 мкг/мл.

Пример 9. Антитела, связывающиеся с доменом I ST2L, ингибировали вызванное интраназальным введением IL-33 ремоделирование ткани дыхательных путей

Мыши линии C57BL/6 получали интраназально 1 мкг/мышь "зрелого" IL-33 (или PBS) (остатки 109-266 последовательности SEQ ID NO: 215) в 1, 3, 5, 7 и 9-е сутки, и анализ легких проводили на 10 или 20-е сутки. Антитела CNTO3914 к мышиному ST2L или изотопический контроль (CNTO5516) вводили подкожно в дозе 2 мг/кг за 6 ч до первого интраназального введения IL-33. Контрольные мыши получали изотопический контроль CNTO5516 или PBS за 6 ч до первого интраназального введения IL-33. Раздутые легкие фиксировали для гистологического исследования в 10% формалиновом буфере; при окраске использовали красители H&E, трихром по Массону и PAS.

Введение IL-33 вызывало умеренную и заметную гипертрофию и гиперплазию бронхиального эпителия с гиперплазией бокаловидных клеток и смешением перибронхиальных инфильтратов, главным образом с эозинофилами. У животных, получавших CNTO3914, гипертрофия и гиперплазия бронхиального эпителия были неочевидны. Окрашивание трихромом по Массону проводили для определения количества имеющегося коллагена; данное окрашивание выявило гипертрофию бокаловидных клеток у животных, получавших IL-33. У животных, получавших CNTO3914, инфильтраты в альвеолах и перибронхиальных участках отсутствовали.

Пример 10. Получение полностью человеческих антител к ST2L

Дополнительные Fab-фрагменты, связывающиеся с человеческим ST2L, выбирали из новых полученных дисплейных рIX-фаговых библиотек, по существу как описано в примере 3, за исключением того, что библиотеки просеивали с использованием химерного конструкта NHM-ST2L (SEQ ID NO: 6, табл. 1) с биотинилированным антигеном, связанным с покрытыми стрептавидином магнитными микроносителями. Фаговую библиотеку блокировали PBS-T с 3%-ным обезжиренным сухим молоком. Белок-конкурент, химерный белок NHM-ST2L (SEQ ID NO: 7, табл. 1), добавляли в блокирующий раствор для сдвига селекции фагов в сторону Fab-фрагментов, которые могли специфически связываться с человеческими аминокислотными последовательностями домена I ST2L. Селекцию фагов проводили в три цикла с последующим скринингом Fab-фрагментов, связывающихся с белком hST2L-Fc, методом ИФА.

В ходе данной селекции выделили девятнадцать Fab-фрагментов, связывающихся с hST2L-Fc, и провели дополнительный скрининг на связывание с химерными ST2L-конструктами (табл. 1), а также с мышинным белком ST2L и человеческим белком ST2L для картирования домена специфичности и характеристики способности блокировать взаимодействие IL-33/hST2L. Fab-фрагменты ST2F1, ST2F4 и ST2F6 блокировали взаимодействие hIL-33/ST2L и связывались с доменом I ST2L и были переданы на созревание аффинности.

Таблица 9

Fab ID	VH ID	Каркас	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
			Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
ST2F6	ST2H41	VH3-23	SYAMS	78	AISGSGGS TYYADSVKVG	81	DPWSTEGS FFVLDY	84
ST2F4	ST2H39	VH3-23	SYMMH	79	GISSGGGS TYYADSVKVG	82	DGWGTVYF PFDY	85
ST2F1	ST2H35	VH5-51	SYWIG	80	I IYPGDSD TRYSPSFQG	83	DTADFRRW DFDY	86

Fab ID	VL ID	Каркас	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
			Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
ST2F6	ST2L24	Vk-L6	RASQSV DDALA	87	DASNRAT	90	QQFYNWPLT	92

ST2F4	ST2L23	Vk-L6	RASQSV RDDLA	88	DASNRAT	90	QQYIHAPLT	93
ST2F1	ST2L20	Vk-B3	KSSQSV LYSSNN KNYLA	89	WASTRES	91	QQSNTYPFT	94

Пример 11. Созревание аффинности Fab-фрагментов, связывающихся с человеческим ST2L

Созревание аффинности ST2F1, ST2F4 и ST2F6 проводили с помощью "оперативного" процесса созревания, описанного в публикациях Shi et al., J. Mol Biol 397:385-396, 2010 г., международной патентной публикации № WO 2009/085462 и в примере 4. Библиотеки для созревания аффинности ST2F1, ST2F4 и ST2F6 получили путем диверсификации соответствующих библиотек легких цепей, B3, L6 и L6, соответственно, и комбинирования с библиотеками участков VH Fab-фрагментов. Схемы диверсификации для остатков в легких цепях для библиотек созревания аффинности L6 и B3 представлены в табл. 10. Нумерация позиций представлена в соответствии со схемой Кабат. Для просеивания при созревании аффинности биотинилированный huST2-ECD-Fc улавливали на покрытые стрептавидином (SA) магнитные микронесители в концентрациях 10 нМ в цикле 1, 1 нМ в цикле 2 и 0,1 нМ в цикле 3. Конечное промывание цикла 3 проводили в течение ночи при комнатной температуре в присутствии 10 нМ немеченого huST2L-ECD-Fc.

Таблица 10

Петля	Положение	Матрикс	
		L6	B3
L1	30	SRNAD	RNDGHSY
	30a	-	RNDGHWY
	30e	-	RNDGHSY
	31	NSKD	RNDGHWY
	32	YWDFHSAN	YNWR
L2	50	ADKGYFTN	YWNK
L3	91	RYSGF	SYWH
	92	RHNSL	SYGN
	93	NDKR	STER
	94	WA	WYSH
	96	WYFLIR	YRWH

Селекция по библиотекам созревания легких цепей ST2F6 позволила получить фрагменты с улучшенным связыванием (ST2F14, ST2F17, ST2F31 и ST2F41) (фиг. 10 и фиг. 11). Они были исследованы в виде Fab-фрагментов с помощью ProteOn, и было продемонстрировано умеренное улучшение аффинности в диапазоне от 2 нМ до 400 пМ.

Для дополнительного увеличения аффинности ST2F14, ST2F17, ST2F31 и ST2F41 общую тяжелую цепь ST2H41 в ST2F14, ST2F17, ST2F31 и ST2F41 рандомизировали в участках HCDR1 и HCDR2, позиции по Кабат 31, 32, 33, 35, 50, 52, 53, 56 и 58, используя схему диверсификации, представленную в табл. 11. Полученную библиотеку тяжелых цепей соединяли с четырьмя легкими цепями с улучшенной аффинностью ST2L32, ST2L35, ST2L49 и ST2L59 и данную библиотеку просеивали и подвергали скринингу, как описано применительно к библиотекам созревания легких цепей. Выделили Fab-фрагменты с повышенным связыванием по сравнению с ST2F14 и конвертировали их в IgG для дополнительной характеристики. Полученные антитела (STLM103, STLM107, STLM108, STLM123, STLM124, STLM206, STLM207, STLM208, STLM209, STLM210, STLM211, STLM212, STLM213, STLM214, STLM215, STLM216, STLM217, STLM218, STLM219, STLM220, STLM221, STLM222) (фиг. 10 и 11) имели каркасы, полученные из VH3-23 или VK-L6. Все антитела связываются с доменом I ST2L и блокируют взаимодействие IL-33/ST2L.

Таблица 11

Положение	Аминокислоты
31	SDNTAY
32	SDAY
33	SDAY
35	SN
50	SDNTAY
52	SANTKDEGR
53	SANEY
56	SANTKDEGR
58	SDNTAY

Разработали и экспрессировали дополнительные варианты STLM208 VH ST2L257 для замены мотива DP в начале участка HCDR3. Последовательности вариантов представлены на фиг. 12.

Пример 11. Адаптация антител C2494 к человеческому каркасу (HFA)

Процесс адаптации к каркасу проводили, как по существу описано в патентной публикации США № US 2009/0118127 и Fransson et al., *J. Mol Biol* 398:214-231, 2010 г. Вкратце, последовательности тяжелой и легкой цепей сравнивали с человеческими зародышевыми последовательностями (только аллели 01 по данным на 1 октября 2007 г.) с использованием поиска BLAST по базе данных IMGT (Kaas, et al., *Nucl. Acids. Res.* 32, D208-D210, 2004 г.; Lefranc et al., *Nucl. Acid Res.*, 33, D593-D597, 2005 г.). Из данного набора человеческих зародышевых генов убрали избыточные гены (100% идентичные на уровне аминокислот) и гены с непарными цистеиновыми остатками. Оставшиеся максимально соответствующие, как по каркасным участкам, так и по CDR-участкам, человеческие зародышевые гены выбрали в качестве акцепторных человеческих каркасов. Всего на основе гомологии последовательностей и длины CDR, а также сходства CDR отобрали 9 человеческих зародышевых каркасов VL и 7 человеческих зародышевых каркасов VH. Участки FR-4 выбирали на основе сходства последовательности человеческих зародышевых генов IGHJ/IGJK, JK2 для цепей VL и JH1 для цепей VH (Kaas et al., *Nucl. Acid Res.* 32, D208-D210, 2004 г.; Lefranc M.-P. et al., *Nucl. Acid Res.*, 33, D593-D597, 2005 г.) с последовательностью C2494. Затем CDR-участки C2494 (подчеркнуты на фиг. 14) перенесли в выбранные акцепторные человеческие каркасы с получением HFA-вариантов, за исключением участка, соответствующего CDR-H1 из VH. Для данного участка комбинацию CDR и HV или более короткого участка HCDR2 (обозначается как Кабат-7, см. патентная публикация США № US2009/0118127) перенесли с антитела, не относящегося к человеческому, на человеческие каркасные участки (FR), поскольку было показано, что остатки HCDR2, выделенные серым цветом на фиг. 14, не вступают в контакт с комплексами антиген-антитело известных структур (Almagro, *J. Mol Recognit.* 17, 132, 2004 г.). Последовательность зрелого белка C2494 (VL: SEQ ID NO:52; VH: SEQ ID NO: 48) показана на фиг. 14. На данной фигуре подчеркнуты CDR-остатки (по Кабат), под CDR-участками обозначены HV-петли по Чотиа, а остатки, перенесенные на выбранные человеческие каркасы, обозначены под HV-участками (HFA). Остатки в HCDR2, выделенные серым, во всех вариантах не переносили.

Построили трехмерную модель гомологии для Fv-фрагмента антитела C2494 с использованием модуля моделирования антител MOE (CCG, г. Монреаль). Данную модель использовали для оценки подверженности модификациям, в частности, по открытым остаткам метионина и триптофана, потенциальным мотивам N-гликозилирования и деамидирования. В LCDR3-участке, на основе структурной модели Fv, присутствует потенциально открытый остаток Met (M94). Для его удаления был сгенерирован и охарактеризован вариант (STLL280, O12b) с мутацией M94L. Для тяжелой цепи остаток R в мотиве CAR (остатки 92-94 по Чотиа, фиг. 14) непосредственно перед HCDR3-участком может отрицательно повлиять на кластер отрицательно заряженных остатков (остатки D31, D32, D96 и D101a по Чотиа, фиг. 14), что может быть важным для связывания. Был сгенерирован и охарактеризован участок VH с заменой аргинина на лейцин в остатке 94 по Чотиа (CAR→CAL).

Провели экспрессию mAb, содержащих обозначенные тяжелые и легкие цепи, а также их предшественников C2494, и анализ их связывания с человеческим ST2L. Из полученных HFA-антител mAb с цепями VH, имеющими каркасы тяжелых цепей IGHV1-24*01 (SEQ ID NO: 148) и IGHV1-f*01 (SEQ ID NO: 149) (STLH195 и STLH194), хорошо экспрессировались и связывались с ST2L в комбинации с различными легкими HFA-цепями, имеющими IGKV3-15*01 (L2) (SEQ ID NO: 150), IGKV1-9*01 (L8) (SEQ ID NO: 151), IGKV1-5*01 (L12) (SEQ ID NO: 152), IGKV1-12*01 (L5) (SEQ ID NO: 153), IGKV1-39*01 (O12) (SEQ ID NO: 154), IGKV1-27*01 (A20) (SEQ ID NO: 155) или IGKV1-33*01 (O18) (SEQ ID NO: 156) каркасы (STLL280, STLL278, STLL277, STLL276, STLL275, STLL274, STLL273, STLL272).

Последовательности HFA-вариантов VH и VL представлены в табл. 12. Подчеркнуты перенесенные остатки, а описанные выше дополнительные замены выделены серым цветом. В табл. 13 представлены номера SEQ ID NO, а также уникальные номера pDR (плазмида) и CBIS ID для каждого HFA-варианта VH и VL. Комбинация легких и тяжелых цепей для полученных mAb, выбранных для дополнительной характеристики, представлена в табл. 14.

В табл. 15 представлены человеческие каркасы (общие V- и J-участки), которые использовали при переносе CDR C2494.

Таблица 12. Адаптированные каркасные участки цепей VL (соединенные с последовательностью JK2).

CDR выделены подчеркиванием.

>VL2494 (исходный) (SEQ ID NO: 52)
 ETTVTQSPASLSVATGEKVTIRCITNTDIDDVIHWYQKPGEPKLLISEGNTLRP
 GVPSRFSSSGYGTDFVFTIENTLSEADVADYYCLQSDNMLTFGAGTKLEIK

>VL2494-IGKV1-33*01 018 (SEQ ID NO: 135)
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCITNTDIDDVIHWYQKPGKAPKLLIYEGNTLRP
 GVPSRFSGSGGTDFFTISSLQPEDFATYYCLQSDNMLTFGQGTKLEIK

>VL2494-IGKV1-27*01 A20 (SEQ ID NO: 136)
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCITNTDIDDVIHWYQKPGKVPKLLIYEGNTLRP
 GVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLQSDNMLTFGQGTKLEIK

>VL2494-IGKV1-39*01012 (SEQ ID NO: 137)
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCITNTDIDDVIHWYQKPGKAPKLLIYEGNTLRP
 GVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQSDNMLTFGQGTKLEIK

>VL2494-IGKV1-12*01 L5 (SEQ ID NO: 138)
 DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCITNTDIDDVIHWYQKPGKAPKLLIYEGNTLRP
 GVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQSDNMLTFGQGTKLEIK

>VL2494-IGKV1-5*01 L12 (SEQ ID NO: 139)
 DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCITNTDIDDVIHWYQKPGKAPKLLIYEGNTLRP
 GVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQSDNMLTFGQGTKLEIK

>VL2494-IGKV1-9*01 L8 (SEQ ID NO: 140)
 DIQLTQSPSFLSASVGRVTITCITNTDIDDVIHWYQKPGKAPKLLIYEGNTLRP
 GVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQSDNMLTFGQGTKLEIK

>VL2494-IGKV3-15*01 L2 (SEQ ID NO: 141)
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCITNTDIDDVIHWYQKPGQAPRLLIYEGNTLRP
 GIPARFSGSGGTDFTLTISSLQSEDFAVYYCLQSDNMLTFGQGTKLEIK

>VL2494-IGKV1-39*01 012b (SEQ ID NO: 142)
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCITNTDIDDVIHWYQKPGKAPKLLIYEGNTLRP
 GVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYC LQSDNLLT FGQGTKLEIK

Адаптированные каркасные участки цепей VH, соединенные с JH1

>VH2494 (исходный) (SEQ ID NO: 48)
 EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCTASAFNIKDDYMHVWVQRPEQGLEWIGRIDPAIGNT
 EYAPKFDKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCALGDFYAMDYWGQGTSTVTVSS

>VH2494-IGHV1-f*01 (SEQ ID NO: 143)
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSAFNKDDYMHVWVQRPEQGLEWIGRIDPAIGNT
 EYAEKFDQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCATGDFYAMDYWGQGLTVTVSS

>VH2494-IGHV1-24*01 (SEQ ID NO: 144)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSAFNKDDYMHVWVQRPEQGLEWIGRIDPAIGNT
 EYAPKFDQDRVTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCATGDFYAMDYWGQGLTVTVSS

Таблица 13

	HFA-вариант	pDR#	CBIS ID	SEQ ID NO:
Цепи VH	>VH2494-IGHV1-24*01	9870	STLH195	144
HFA	>VH2494-IGHV1-f*01	9871	STLH194	143
Цепи VL HFA	>VL2494-IGKV1-39*01 012b	9865	STLL280	142
	>VL2494-IGKV3-15*01 L2	9873	STLL278	141
	>VL2494-IGKV1-9*01 L8	9874	STLL277	140
	>VL2494-IGKV1-5*01 L12	9875	STLL276	139
	>VL2494-IGKV1-12*01 L5	9876	STLL275	138
	>VL2494-IGKV1-39*01 012	9877	STLL274	137
	>VL2494-IGKV1-27*01 A20	9878	STLL273	136
	>VL2494-IGKV1-33*01 018	9879	STLL272	135

Таблица 14

		Цепи VH		
		Исходные*	>VH2494- IGHV1- 24*01	>VH2494- IGHV1-P01
Цепи VL	pRD#	pDR4211	pDR9870	pDR9871
Исходные*	pDR4212	STLM126	STLM186	STLM196
>VL2494-IGHV1- 39*01 012b	pDR9865	STLM127	STLM187	STLM197
>VL2494-IGHV3- 15*01 L2	pDR9873	STLM129	STLM189	STLM199
>VL2494-IGHV1- 9*01 L8	pDR9874	STLM130	STLM190	STLM200
>VL2494-IGHV1- 5*01 L12	pDR9875	STLM131	STLM191	STLM201
>VL2494-IGHV1- 12*01 L5	pDR9876	STLM132	STLM192	STLM202
>VL2494-IGHV1- 39*01 012	pDR9877	STLM133	STLM193	STLM203
>VL2494-IGHV1- 27*01 A20	pDR9878	STLM134	STLM194	STLM204
>VL2494-IGHV1- 33*01 018	pDR9879	STLM135	STLM195	STLM205

*Исходные = C2494 VH и VL

Таблица 15

Каркасы, использованные для адаптации к человеческому каркасу (HFA)		Последовательность	SEQ ID NO:
Происхождение V-участка каркаса	Происхождение J-участка каркаса		
IGHV1-24*01	JH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKVSGY TLTELSMHWRQAPGKGLWMMGGFDPE DGETIYAQKFKQGRVTMTEDTSTDTAYM ELSSLRSEDVAVYYCATWGQGLVTVS S	148
IGHV1-f*01	JH1	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGY TFTDYMHVWVQAPGKGLWMLVDPE DGETIYAEKFKQGRVTITADTSTDTAYM ELSSLRSEDVAVYYCATWGQGLVTVS S	149
IGKV3-15*01 L2	JK2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQ SVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTR ATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSE DFAVYYCQQYNNWPTFGQGTKLEIK	150
IGKV1-9*01 L8	JK2	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASQ GISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASL QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPE DFATYYCQQLNSYPTFGQGTKLEIK	151
IGKV1-5*01 L12	JK2	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQ SISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSL ESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPD DFATYYCQQYNSYSTFGQGTKLEIK	152
IGKV1-12*01 L5	JK2	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQ GISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQANSFPTFGQGTKLEIK	153

IGKV1-39*01 O12	JK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ STSSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQSYSTPTFGQGTKLEIK	154
IGKV1-27*01 A20	JK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ GISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASL QSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPE DVATYYCQKYNAPTFGQGTKLEIK	155
IGKV1-33*01 O18	JK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ DISNYLWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPE DIATYYCQQYDNLPTFGQGTKLEIK	156

Пример 12. Разработка аланиновых мутантов и мутантов человеческой зародышевой линии для сканирования паратопов

Провели сайт-направленный мутагенез для оценки вклада в связывание индивидуальных остатков CDR, а также некоторых остатков, обладающих потенциальным влиянием на другие характеристики антитела. На основе описанной выше молекулярной модели Fv-остатка C2494 спрогнозировали подгруппу экспонированных в растворитель остатков CDR, которые могут быть вовлечены в связывание с антигеном. Их заменили на аланин и/или соответствующий "подобный человеческому" остаток, т.е. на соответствующий остаток из максимально близкого зародышевого гена. Замена D101aA (нумерация по Чотиа), (D104A в SEQ ID NO: 48) в участке VH C2494 снижала $k_{\text{дисс}}$ приблизительно в 4 раза, с $1,43 \times 10^{-4}$ на $3,2 \times 10^{-5}$.

Поскольку замена D101aA снижала $k_{\text{дисс}}$ связывания Fab-фрагмента C2494 с ST2L, можно было ожидать, что та же мутация также сможет улучшить скорость диссоциации HFA-вариантов C2494. Таким образом, мутацию D101aA (нумерация по Чотиа) включили в VH STLH194 (>VH2494-IGHV1-f*01, SEQ ID NO: 143) с получением VH STLH201 (SEQ ID NO: 145). STLH201 спарили с 7 легкими цепями STLL280, STLL277, STLL276, STLL275, STLL274, STLL273 и STLL272 (табл. 13 и 14) с получением mAb STLM226, STLM227, STLM228, STLM229, STLM230, STLM231 и STLM232, которые затем охарактеризовали. Следовательно, mAb STLM226, STLM227, STLM228, STLM229, STLM230, STLM231 и STLM232 имеют идентичные последовательности LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1 и HCDR2 по сравнению с исходным антителом C2494, а также отличающийся участок HCDR3 (SEQ ID NO: 146, GDFYAMAY). Кроме того, антитело STLM266 VL STLM280 имело уникальный участок LCDR3: LQSDNLLT (SEQ ID NO: 147).

STLH201 (SEQ ID NO: 145):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSAFNIKDDYMHVWVQQAPGKGLEWMGRIDPAIGNT

EYAEKFKQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGDFYAMAYWGQGTLVTVSS.

Включение в HCDR3 замены D101aA (нумерация по Чотиа): SEQ ID NO: 146: GDFYAMAY.

Антитело STLM266 VL STLM280 имело уникальный участок LCDR3: LQSDNLLT (SEQ ID NO: 147).

Пример 13. Определение характеристик антител к ST2L

Антитела, полученные из фаговых дисплеев, гибридом и процессов адаптации к человеческому каркасу, были охарактеризованы в различных анализах, включая связывание с huST2L-ECD, cynoST2L-ECD, измерения аффинности, связывание с человеческими/мышинными химерами для определения связывания с доменами, анализы ингибирования лиганд-рецепторного взаимодействия, анализы по репортерному гену и анализы на ответы мастоцитов.

Аффинности антител, полученных в процедурах с фаговыми дисплеями, к ST2L, человеческому и яванского макака, а также специфичность связывания с человеческим ST2L представлены в табл. 16. Все антитела в табл. 16 связывались с доменом I человеческого ST2L.

Таблица 16

	Аффинность человеческого ST2L			Аффинность ST2L яванского макака			Связывание с доменом ST2L-ECD
	$K_{асс}$ ($M^{-1}c^{-1}$)	$K_{дисс}$ (c^{-1})	KD (пмоль)	$K_{асс}$ ($M^{-1}c^{-1}$)	$K_{дисс}$ (c^{-1})	KD (пмоль)	
STLM103	3,97E+06	1,63E-04	41	6,42E+06	2,02E-04	31	D1
STLM107	2,90E+07	3,41E-04	12	1,00E+08	6,50E-04	7	D1
STLM108	2,29E+06	2,22E-04	97	2,05E+07	5,98E-04	29	D1
STLM123	1,37E+07	2,08E-04	15	1,00E+08	5,19E-04	5	D1
STLM124	1,65E+07	7,56E-04	46	8,71E+07	2,57E-03	30	D1
STLM206	6,39E+06	1,60E-04	25	9,40E+07	5,83E-04	6	D1
STLM207	8,33E+06	3,95E-04	48	1,00E+08	2,07E-03	21	D1
STLM208	5,97E+06	6,76E-05	11	1,39E+07	7,02E-05	5	D1
STLM209	6,59E+06	1,70E-04	26	3,39E+07	3,11E-04	9	D1
STLM210	1,21E+07	2,27E-04	19	5,70E+07	5,28E-04	9	D1
STLM211	1,70E+07	4,83E-04	29	1,00E+08	1,39E-03	14	D1
STLM212	1,24E+07	3,98E-04	32	1,43E+07	3,46E-04	24	D1
STLM213	7,54E+06	1,08E-04	14	1,64E+07	1,24E-04	8	D1
STLM214	9,16E+06	2,99E-04	33	7,20E+06	2,64E-04	37	D1
STLM215	6,91E+06	1,72E-04	25	3,54E+07	3,69E-04	10	D1
STLM216	9,63E+06	1,58E-04	16	7,89E+07	2,64E-04	3	D1
STLM217	7,27E+06	1,26E-04	17	3,81E+07	1,38E-04	4	D1
STLM218	9,89E+06	2,24E-04	23	1,45E+07	2,65E-04	18	D1
STLM219	7,54E+06	2,01E-04	27	1,07E+07	2,30E-04	22	D1
STLM220	5,80E+06	9,53E-05	16	1,60E+07	1,40E-04	9	D1
STLM221	2,73E+06	9,61E-05	35	6,04E+06	1,30E-04	22	D1
STLM222	8,22E+06	3,01E-04	37	1,18E+07	3,45E-04	29	D1
STLM226	2,16E+07	1,93E-03	90	1,00E+08	3,01E-02	301	D1
STLM227	2,66E+07	1,70E-03	64	1,00E+08	2,94E-02	294	D1
STLM228	2,01E+07	1,04E-03	52	1,00E+08	1,55E-02	155	D1
STLM229	1,29E+07	4,45E-04	35	1,00E+08	8,50E-03	85	D1
STLM230	1,11E+07	4,26E-04	38	5,06E+07	7,30E-03	144	D1
STLM231	1,97E+07	9,13E-04	46	8,27E+07	1,43E-02	172	D1
STLM232	1,78E+07	4,49E-04	25	1,00E+08	7,97E-03	80	D1

Аффинности антител к ST2L, полученных в процедурах HFA, в сравнении с исходными (STLM62, C2494) показаны в табл. 17.

Аффинности анализировали методом ProteOn. Эксперименты проводили при 25°C с использованием буфера ProteOn's PBS-T-E (PBS, 0,005% P20 и 3 мМ ЭДТА) в качестве рабочего буфера. Для проведения экспериментов сенсорный чип GLC подготавливали путем ковалентной иммобилизации козьих антител к человеческому Fc (~5800 RU). Было захвачено 122-146 единиц ответа (RU) mAb. После захвата mAb делали инъекцию ST2L-ECD в диапазоне 0,024-15 нМ (5-кратные разведения) в течение 4 минут (200 мкл со скоростью 50 мкл/мин). За диссоциацией наблюдали в течение 30 мин во всех реакциях. Регенерацию выполняли, используя два 15-секундных введения 10 мМ глицина, pH 1,5. Данные аппроксимировали 1:1 моделью смещения базовой линии.

Для тех образцов, где скорости ассоциации были высокими, для аппроксимации кривой и оценки аффинности использовали модель Ленгмюра с переносом массы. У всех образцов скорость диссоциации была выше, чем у исходного клона и у контрольных mAb. Разница в скорости диссоциации была основным фактором, определяющим более низкую аффинность HFA-вариантов по сравнению с исходным антителом.

Таблица 17

Образец	Аффинность человеческого ST2L			Аффинность ST2L яванского макака		
	K _{асс} (M-1c-1)	K _{ласс} (c-1)	K _D (пмоль)	K _{асс} (M-1c-1)	K _{ласс} (c-1)	K _D (пмоль)
STLM62*	1,84E+07	1,59E-04	8,67	3,84E+07	4,57E-04	12,35
STLM187	3,37E+07	1,59E-02	473,00	1,00E+08	1,10E-01	1100,00
STLM190	1,00E+08	5,34E-02	534,00	1,00E+08	1,02E-01	1020,00
STLM191	8,46E+07	2,47E-02	292,00	1,00E+08	6,66E-02	666,00
STLM192	2,11E+07	8,85E-03	420,00	1,00E+08	9,99E-02	999,00
STLM193	4,77E+07	1,27E-02	267,00	1,00E+08	9,32E-02	932,00
STLM194	1,00E+08	7,03E-02	703,00	1,00E+08	1,90E-01	1900,00
STLM195	2,49E+07	6,73E-03	271,00	1,00E+08	7,19E-02	719,00
STLM197	1,83E+07	1,62E-03	88,50	2,97E+07	6,88E-03	232,00
STLM199	2,17E+07	8,97E-04	41,40	7,78E+07	6,57E-03	84,50
STLM200	2,35E+07	1,43E-03	60,80	8,23E+07	1,10E-02	134,00
STLM201	1,76E+07	8,52E-04	48,40	3,55E+07	4,10E-03	116,00
STLM202	2,24E+07	1,19E-03	52,90	7,75E+07	1,04E-02	134,00
STLM203	2,04E+07	9,67E-04	47,30	5,88E+07	6,56E-03	111,00
STLM204	2,97E+07	2,41E-03	81,30	1,00E+08	2,05E-02	205,00
STLM205	1,73E+07	6,95E-04	40,10	4,04E+07	4,04E-03	100,00

*STLM62=C2494, исходное антитело

Таблица 18

Происхождение	mAb	RLB IC50, мкг/мл	RGA IC50, мкг/мл	Анализ на клетках эндотелия яванского макака	Высвобождение цитокина базофильными клетками
Фаговый дисплей	STLM103	0,47	1,92	н/и	+
	STLM107	0,44	1,10	н/и	++
	STLM108	0,23	2,34	++	++
	STLM116	0,29	6,71	н/и	+
	STLM123	0,28	1,25	н/и	++
	STLM124	0,35	0,87	++	++
	STLM206	0,40	0,67	++	++
	STLM207	0,36	2,30	н/и	++
	STLM208	0,47	0,61	++	++
	STLM209	0,32	0,97	++	++
	STLM210	0,30	2,10	н/и	++
	STLM211	0,28	2,52	н/и	++
	STLM212	0,33	4,32	н/и	+
	STLM213	0,34	0,49	++	++
	STLM214	0,28	2,52	н/и	++
	STLM215	0,29	1,30	н/и	++
	STLM216	0,30	1,86	н/и	++
	STLM217	0,49	1,69	н/и	++
	STLM218	0,42	1,33	н/и	++
	STLM219	0,29	3,16	н/и	++
	STLM220	0,39	0,60	н/и	++
	STLM221	0,39	2,79	н/и	+
STLM222	0,25	1,88	н/и	++	

	STLM226	0,26	0,25	++	++
	STLM227	0,17	0,23	++	++
	STLM228	0,20	0,28	++	++
HFA	STLM229	0,29	0,32	++	++
	STLM230	0,28	0,15	++	++
	STLM231	0,26	1,10	+	+
	STLM232	0,31	0,15	++	++
Гибридома C2494	STLM62*	0,70	0,11	++	++

++ сильное ингибирование

+ некоторое ингибирование

отсутствие ингибирования

н/и не испытывали

* испытывали в виде гибридомы

RLB = ингибирование лиганд-рецепторного взаимодействия

RGA = анализ по репортерному гену

Выбранные антитела испытывали в анализах на ответы мастоцитов, при которых измеряли ингибирование вызванного 3 нг/мл IL-33 высвобождения IL-5, IL-13 и IL-8 из мастоцитов пуповинной крови человека, как описано выше, антителами в концентрации 100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,1 мкг/мл или 0,01 мкг/мл в среде RPMI+10% FCS. В данных условиях анализа все испытываемые антитела ингибировали вызванное IL-33 высвобождение цитокинов IL-5, IL-13 и IL-8 приблизительно на 40-100% при использовании концентрации антитела 100 мкг/мл по сравнению с контрольным образцом с индукцией IL-33.

Пример 14. Антитела к ST2L ингибируют расположенные ниже пути передачи сигналов в человеческих базофильных клетках

Антитела к ST2L испытывали на способность ингибировать сигнализацию p38 MAPK в человеческих базофильных клетках.

Цельную кровь собирали в гепаринизированные пробирки и перед проведением анализа доводили до комнатной температуры. По 1 мл аликвоты крови помещали в 50 мл конические пробирки и добавляли либо антитела к ST2L (STLB252), либо изотопический контроль (CNTO 8937), разведенные в PBS, с конечной концентрацией 2, 20 или 200 мкг/мл. Пробирки слегка встряхивали для перемешивания и помещали их в инкубатор при 37°C×30 мин с осторожным встряхиванием после 15 мин. Затем кровь окрашивали мечеными флуорохромом антителами к антигенам клеточной поверхности (CD123-FITC, CRTH2-PCP-CY5.5 и CD45-APC-C7) и культивировали пробирки при 37°C в течение 15 мин. В каждую пробирку добавляли 1 мл нагретой культуральной среды (RPMI-1640/10% FBS/1% пенициллин-стрептомицин), после чего добавляли IL-33, разведенный в подогретой культуральной среде, с конечной концентрацией 10 нг/мл. Образцы культивировали при 37°C×10 мин, после чего в каждую пробирку добавляли 20 мл предварительно подогретого лизирующего/фиксирующего буфера BD Phosflow Lyse/Fix, чтобы одновременно лизировать эритроциты и зафиксировать образцы. Содержимое пробирок хорошо перемешали, перевернув их 10 раз, и культивировали при 37°C×10 мин. Образцы промывали 20 мл стерильного PBS комнатной температуры, ресуспендировали в 2 мл пермеабилизирующего/промывочного буфера 1× BD Perm/Wash Buffer комнатной температуры и культивировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Образцы промыли один раз 2 мл пермеабилизирующего/промывочного буфера BD Perm/Wash и затем ресуспендировали в 400 мкл пермеабилизирующего/промывочного буфера BD Perm/Wash. К образцам добавили меченные PE антитела к внутриклеточному p38-MAPK (vCell Signaling, номер по каталогу 6908S) и образцы культивировали в течение 30 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Образцы однократно промыли 5 мл буфера Perm/Wash, после чего ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS и перенесли в круглодонный 96-лучночный планшет. Образцы анализировали с помощью проточного цитометра BD LSRII с применением высокопроизводительной системы (HTS), регистрирующей максимально возможное количество событий для каждого образца. Данные анализировали с использованием программного обеспечения FloJo. Базофильные клетки идентифицировали как CD45+CRTH2+CD123+ и для каждого условия определяли процентную долю позитивных по p38 MAPK базофильных клеток. Прекультивирование цельной крови с mAb к ST2L (STLB252) приводило к дозозависимому ингибированию индуцированного IL-33 фосфорилирования p38-MAPK, тогда как при использовании изотопического контроля эффект не наблюдался (CNTO 8937). Антитело к человеческому ST2L специфически блокировало активацию базофильных клеток рекомбинантным человеческим IL-33 в ситуации с цельной кровью. Результаты демонстрируют, что антитела к ST2L ингибируют сигнализацию, индуцируемую эндогенным IL-33 *in vivo*.

Таблица 19

IL-33 (10 нг/мл)	STLB252 (мкг/мл)	Контроль изотопа (мкг/мл)	% фосфорилированной p38 MAPK
-	0	0	2,2
+	0	0	80,6
+	2	0	44,4
+	20	0	15,7
+	200	0	1,2
+	0	2	76,7
+	0	20	79
+	0	200	77

Пример 15. Связывание антител к ST2L с мишенью *in vivo*

Модель с рекрутингом клеток в BAL через 6 ч после интраназального введения mIL-33 *in vivo*

Однократную дозу mIL-33 (R&D systems №3626-ML/CF) 1,2 мкг/мышь или PBS вводили самцам мышей линии Balb/c (возраст 6-8 недель, Taconic). Крысинные антитела к мышиному ST2L CNTO 3914 в дозе 2, 0,2, 0,06 или 0,02 мг/кг вводили за 24 ч до первого интраназального введения mIL-33. mAb CNTO 5516 в качестве изотопического контроля (ITC) вводили подкожно в дозе 2 мг/кг. Через 6 ч после введения mIL-33 (или PBS) мышей умерщвляли и собирали кровь для анализа сыворотки. Бронхоальвеолярный лаваж (BAL) осуществляли путем инъекции двух объемов 0,7 мл PBS/0,1% BSA в легкие и отбора эффлюента. BAL центрифугировали (1200 об/мин, 10 мин) и осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл PBS для общего и дифференциального подсчета клеток с использованием гемацитометра (в цитоцентрифужных препаратах окрашенных по Райту-Гимзе). Измерение CNTO 3914 в мышинной сыворотке

Планшеты MSD SA-STD блокировали путем введения в каждую лунку 50 мкл буфера для анализа на 5 мин. Затем из планшетов путем переворачивания слили буфер и обстучали их на бумажном полотенце. Добавили по 50 мкл на лунку 1,4 мкг/мл биотинилированного рекомбинантного мышинового химерного ST2L/IL1R4/Fc (R&D System) в буфере для анализа и культивировали в течение ночи в холодильнике. В каждую лунку планшетов с таким предварительно нанесенным белком добавили по 150 мкл буфера для анализа без удаления реагента и культивировали в течение 30 мин. Планшеты трижды промыли промывочным буфером на устройстве для промывки планшетов. Планшеты осторожно обстучали на бумажных полотенцах для удаления остатков промывочного буфера. В каждую лунку планшета добавили по 50 мкл образца CNTO 3914. Планшеты культивировали в течение одного часа при мягком покачивании при температуре окружающей среды. Планшеты трижды промыли промывочным буфером на устройстве для промывки планшетов. В каждую лунку планшета добавили по 50 мкл меченных рутением мышинных антител к мышиному IgG1b (BD Biosciences). Планшеты культивировали в течение одного часа при мягком покачивании при температуре окружающей среды. Планшеты трижды промыли промывочным буфером на устройстве для промывки планшетов. В каждую лунку планшета добавили по 150 мкл буфера считывания. После этого планшеты сразу же сканировали на сканере MSD sector imager 6000, определяя уровни люминесценции.

Анализ цельной крови

Кровь разводили 1:4 в модифицированной по способу Дюльбекко среде Игла+1% раствор пенициллина+стрептомицин +/- 10 нг/мл мышинового IL-33 в фильтрующих пробирках Sarstedt. Пробирки культивировали при 37°C в течение ночи, затем измеряли уровни цитокинов и хемокинов в надосадочных жидкостях, используя комплект реактивов Millipore Milliplex Mouse Cytokine/Chemokine Kit в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

Антитела к ST2L определялись в сыворотке мышей через 24 ч после введения 0,2 или 2 мг/кг CNTO 3914 (фиг. 16A).

Интраназальное введение IL-33 приводило к рекрутингу клеток в дыхательные пути через 6 часов (фиг. 16B). Введение mAb к ST2L уменьшало рекрутинг клеток в BAL; минимальная доза антител для регистрации существенного ингибирования рекрутинга клеток в BAL составила 0,2 мг/кг (фиг. 16B). Статистическую достоверность рассчитывали однофакторным дисперсионным анализом.

В цельной крови, стимулированной мышиным IL-33, через 24 ч наблюдали повышенные уровни цитокинов и хемокинов, включая IL-6 (фиг. 16C) и MCP-1 (фиг. 16D). У мышей, получавших 20 мг/кг или 2 мг/кг mAb CNTO 3914 к ST2L, уровни IL-6 и MCP-1 были снижены по сравнению с введением CNTO5516 (изотопические контрольные мышинные антитела IgG1), что указывает на связывание с мишенью. Минимальная доза, ингибирующая рекрутинг клеток в BAL, 2 мг/кг, коррелировала с ингибированием при анализе цельной крови (фиг. 16B).

В совокупности, настоящие данные подтверждают, что mAb к ST2L достигают области своего действия и осуществляют предусмотренный фармакологический эффект (что предполагает связывание с

мишенью).

Пример 16. Эпитопы антител к ST2L

При селекции антител к ST2L проводили картирование эпитопов и исследования конкуренции.

Анализ конкурентного связывания

Анализ конкурентного связывания проводили с целью оценки связываемых эпитопов у mAb к ST2L различных групп. Белок ST2L-ECD наносили по 5 мкл на лунку (10 мкг/мл) на планшет MSD HighBind (Meso Scale Discovery, г. Гейтерсберг, штат Мэриленд) на 2 ч при комнатной температуре. В каждую лунку добавили по 150 мкл блокирующего буфера 5% MSD Blocker A (Meso Scale Discovery, г. Гейтерсберг, штат Мэриленд) и культивировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали буфером 0,1 М HEPES, pH 7,4, после чего добавляли смесь меченного флуоресцентным красителем MSD (сульфо-метка, NHS-эфир) индивидуального антитела к ST2L с различными конкурентами. Меченое антитело в концентрации 10 или 30 нМ культивировали с увеличивающимися концентрациями антител-конкурентов, от 1 нМ до 2 или до 5 мкМ, а затем добавляли в обозначенные лунки в объеме смеси 25 мкл. После 2 ч культивирования с осторожным встряхиванием при комнатной температуре планшеты трижды промывали буфером 0,1 М HEPES (pH 7,4). Буфер считывания MSD Read Buffer T разбавляли дистиллированной водой (4-кратно), разливали в объеме по 150 мкл/лунку и анализировали с помощью SECTOR Imager 6000.

В конкурентном анализе использовали следующие антитела: связывающиеся с доменом I ST2L нейтрализующие антитела STLM208, STLM213, C2244 (STLM15) и C2494 (STLM62), связывающееся с доменом III ST2L антитело C2539, а также ненейтрализующее антитело C2240 к ST2L, связывающееся с доменом I человеческого ST2L. На фиг. 17А и 17В представлены эксперименты с конкуренцией. На основе эксперимента выявили следующие эпитопные участки (карманы): карман А: mAb C2244, C2494, STLM208 или STLM213; карман В: mAb C2240, карман С: C2539. Было показано, что антитела, блокирующие взаимодействие IL33/ST2L и ингибирующие ответы мастоцитов, относились к одному эпитопному карману и демонстрировали перекрестную конкуренцию друг с другом. Сводная информация по конкуренции представлена в табл. 20.

Таблица 20

Конкурент	Меченое антитело			
	C2240	C2539	C2244	C2494
C2240	+	-	-	-
C2539	-	+	-	-
C2244	-	-	+	+
C2494	-	-	+	+
STLM208	-	-	+	+
STLM213	-	-	+	+

Картирование эпитопов: анализ Н/D обмена

В случае Н/D-обмена процедура, использованная для анализа связанных с антителом пертурбаций, была аналогична описанной ранее (Hamuro, Y., et al., Journal of Biomolecular Techniques, 14:171-182, 2003 г.; Horn, J. R., et al., Biochemistry, 45: 8488-8498, 2006 г.) с некоторыми модификациями. Рекombинантный ST2-ECD (экспрессированный из HEK293E с His-меткой на С-конце) (остатки 18-328 последовательности SEQ ID NO: 157) культивировали в растворе на основе дейтерированной воды в течение заданных периодов времени, при этом в белок внедрялся дейтерий, заменяющий атомы водорода. Дейтерированный ST2-ECD зафиксировали в колонке, содержащей иммобилизованные Fab-фрагменты mAb к ST2L C2244, затем промыли водным буфером. Затем белок ST2-ECD элюировали с колонки и после расщепления протеазами определяли местоположение дейтерий-содержащих фрагментов с помощью масс-спектрометрического анализа.

На фиг. 18 представлена упрощенная карта Н/D обмена для человеческого ST2-ECD (растворимый ST2) в комплексе с Fab-фрагментами C2244. Остатки 18-31 белка ST2-ECD последовательности SEQ ID NO: 119 (аминокислотные остатки RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210) оказались защищены Fab-фрагментами (соответствуют остаткам 35-48 полноразмерного ST2L последовательности SEQ ID NO: 1. Данные указывают на то, что антитело C2244 связывается с эпитопом RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210), и антитела, конкурирующие с C2244 (C2494, STLM208 или STLM213), по всей видимости, связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом.

Картирование эпитопов по мутагенезу

Получили несколько мутантных форм ST2L с заменами, соответствующими мышинным аминокислотным остатками в домене I ST2L. Испытуемые антитела не давали перекрестной реакции с мышинным ST2L, следовательно, прогнозировали, что варианты ST2L с нарушенным и/или сниженным связыванием укажут на наличие эпитопных остатков в сайтах проведенных замен в ST2L. Варианты ввели в конструктор HH-ST2L, содержащий остатки 19-205 полноразмерного ST2L последовательности SEQ ID NO: 1, с использованием стандартных способов. Антитела испытывали на связывание с вариантами ST2L методом ИФА или Proteon.

Метод поверхностного плазмонного резонанса

Исследования связывания проводили с использованием системы матрицы белковых взаимодействий ProteOn XPR36 Protein Interaction Array (Bio-Rad) (Bravman T, et al. Anal Biochem 358:281-288, 2006 г.). Смесь антител к человеческому и мышинному Fc-фрагменту (Jackson ImmunoResearch, номер по каталогу 109-005-098/115-005-071) иммобилизовали на сенсорном чипе GLC методами, относящимися к химии аминного связывания. Затем проводили захват индивидуальных mAb к ST2L путем пропускания (со скоростью 1 мкг/мл) раствора антител в PBS, содержащего 0,5% Nonidet P-40 и 0,5% Na-деоксихолат. Сигнал на поверхностях, покрытых антителами к Fc, достигал ~250 резонансных единиц (RU, 1 RU=1 пг белка/мм²), и это подтверждает, что данные антитела специфически связываются с mAb к STL2. После поворота системы текущей среды на 90° в параллельные проточные каналы делали инъекцию ST2L-D1D2 дикого типа или белки-варианты (0,5 мг/мл в PBS, содержащий 0,5% Nonidet P-40 и 0,5% Na-деоксихолат). Все данные анализы проводили при 25°C. ST2L-D1D2-зависимые сигналы на поверхностях получали путем двойного контроля, вычитая сигнал, наблюдаемый на поверхностях, содержащих одни иммобилизованные антитела, и сигнал, наблюдаемый при инъекции одного растворителя (что позволило внести поправку на сигналы, не зависящие от связывания). Полученные сенсорграммы аппроксимировали простейшей моделью взаимодействия 1:1 (аналитическое обеспечение ProteOn), получая соответствующие константы скорости ассоциации и диссоциации (k_{acc} и $k_{дисс}$).

На фиг. 19 представлены полученные варианты ST2L и аффинность антител к ST2L ST2B206 и ST2B252 к данным вариантам. Вариант 93NL94 (замена 93TF94→93NL94) снижал аффинность связывания STLM208 и STLB252 приблизительно в 5 раз, от приблизительно $10,8 \times 10^{-12}$ М до приблизительно $49,5 \times 10^{-12}$ М. Отсутствие существенного снижения аффинности связывания подразумевает, что энергия связывания для взаимодействия между антителом и ST2L-D1D2 представляет собой суммарное значение для эпитопного участка (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210) выявленного анализом H/D-обмена, и дополнительного вклада сайта 93NL94. Нумерация остатков соответствует полноразмерному ST2L последовательности SEQ ID NO: 1.

Пример 17. Антитела, связывающиеся с доменом I ST2L, ингибируют ответы первичных человеческих мастоцитов легких *in vitro*

Способность антител, связывающихся с доменом I ST2L, ингибировать ответы мастоцитов оценивали по высвобождению хемокинов и цитокинов в первичных человеческих мастоцитах легких.

Выделение первичных человеческих мастоцитов легких

Первичные человеческие мастоциты легких выделяли из нормальной ткани некурящего человека, приобретенной в Международном институте новых медицинских технологий (International Institute for the Advancement of Medicine). Клетки из легочной паренхимы и малых дыхательных путей рассеивали путем измельчения, промывки и разложения ткани паренхимы в течение ночи при 37°C ферментами коллагеназой и гиалуронидазой. Клетки собирали, промывали и подвергали процедуре обогащения с использованием набора реагентов CD117 MicroBead Kit (человеческий) производства MACS Miletnyi Biotec для позитивной селекции мастоцитов из популяции. Перед экспериментом мастоциты культивировали в течение 6 недель в среде StemPro-34+200 нг/мл фактора стволовых клеток. Через две недели после выделения клетки подвергали фенотипической характеристике с помощью проточной цитометрии для определения процентной чистоты популяции мастоцитов. В последующих анализах использовали клетки, на 89% представлявшие собой дважды позитивные клетки по CD117 (C-kit или рецептор фактора стволовых клеток) и FcεRI (высокоаффинный рецептор IgE). Более того, клетки были на 94,2% положительны для ST2L; таким образом, это подтверждает их фенотип мастоцитов.

Анализ высвобождения цитокинов из первичных человеческих мастоцитов легких

Первичные человеческие мастоциты легких, культивированные в среде StemPro-34+200 нг/мл фактора стволовых клеток приблизительно в течение 6 недель, собирали и промывали центрифугированием в среде RPMI (с 10% инактивированной нагреванием FCS). Клетки подсчитывали и высевали в среду RPMI/10% FCS с плотностью 65000 клеток в 96-луночный планшет. MAb, связывающиеся с доменом I ST2L, добавляли к первичным мастоцитам легких и давали возможность связаться в течение 30 мин при 37°C перед стимуляцией IL-33. Клетки стимулировали в течение 24 ч при помощи 3 нг/мл IL-33, чтобы инициировать накопление различных медиаторов в надосадочной жидкости культуры. Надосадочную жидкость культуры собирали и хранили в замороженном состоянии до проведения анализа с использованием набора Milliplex 9-plex.

Связывающееся с доменом I ST2L антитело STLM208 ингибировало индуцированное IL-33 высвобождение GM-CSF (фиг. 20A), IL-5 (фиг. 20B), IL-8 (фиг. 20C) и IL-13 (фиг. 20D) в первичных человеческих мастоцитах легких при концентрации антитела 100, 10 и 1 мкг/мл. Аналогичные результаты были получены на мастоцитах пуповинной крови человека (данные не показаны).

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Janssen Biotech, Inc.
 Duffy, Karen
 Fursov, Natalie
 Hall, LeRoy
 Healey, Catherine
 Lamb, Roberta
 Luo, Jinqun
 Malaviya, Ravi
 Naso, Michael
 Pratta, Michael
 Tornetta, Mark
 Wheeler, John
 Wu, Sheng-Jiu

<120> ST2L антагонисты и способы применения

<130> JBI5003WOPCT

<140> PCT/US13/38637
 <141> 2013-04-29

<150> US 61/640,407
 <151> 2012-04-30

<150> US 61/640,238
 <151> 2012-04-30

<150> US 13/798,204
 <151> 2013-03-13

<150> US 13/798,226
 <151> 2013-03-13

<160> 215

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1
 <211> 556
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr
 1 5 10 15

Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
 20 25 30

Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp
 35 40 45

Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg
 50 55 60

Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala

031047

Lys Asn Pro Ile Asp His His Ser Ile Tyr Cys Ile Ile Ala Val Cys
 325 330 335

Ser Val Phe Leu Met Leu Ile Asn Val Leu Val Ile Ile Leu Lys Met
 340 345 350

Phe Trp Ile Glu Ala Thr Leu Leu Trp Arg Asp Ile Ala Lys Pro Tyr
 355 360 365

Lys Thr Arg Asn Asp Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Val Val Tyr Pro
 370 375 380

Arg Asn Tyr Lys Ser Ser Thr Asp Gly Ala Ser Arg Val Glu His Phe
 385 390 395 400

Val His Gln Ile Leu Pro Asp Val Leu Glu Asn Lys Cys Gly Tyr Thr
 405 410 415

Leu Cys Ile Tyr Gly Arg Asp Met Leu Pro Gly Glu Asp Val Val Thr
 420 425 430

Ala Val Glu Thr Asn Ile Arg Lys Ser Arg Arg His Ile Phe Ile Leu
 435 440 445

Thr Pro Gln Ile Thr His Asn Lys Glu Phe Ala Tyr Glu Gln Glu Val
 450 455 460

Ala Leu His Cys Ala Leu Ile Gln Asn Asp Ala Lys Val Ile Leu Ile
 465 470 475 480

Glu Met Glu Ala Leu Ser Glu Leu Asp Met Leu Gln Ala Glu Ala Leu
 485 490 495

Gln Asp Ser Leu Gln His Leu Met Lys Val Gln Gly Thr Ile Lys Trp
 500 505 510

Arg Glu Asp His Ile Ala Asn Lys Arg Ser Leu Asn Ser Lys Phe Trp
 515 520 525

Lys His Val Arg Tyr Gln Met Pro Val Pro Ser Lys Ile Pro Arg Lys
 530 535 540

Ala Ser Ser Leu Thr Pro Leu Ala Ala Gln Lys Gln
 545 550 555

<210> 2
 <211> 556
 <212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 2

Met Gly Leu Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Val Tyr Ser Thr
 1 5 10 15

Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
 20 25 30

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

Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg
 50 55 60

Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Glu Val Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg
 85 90 95

Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Pro Asp Cys Asn
 100 105 110

Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn
 115 120 125

Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro
 130 135 140

Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Lys
 145 150 155 160

Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Asp Asp Ala
 165 170 175

Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr
 180 185 190

Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe
 195 200 205

Ser Leu Phe Pro Val Ile Arg Ala Pro Ala His Asn Glu Thr Lys Glu
 210 215 220

Val Glu Ile Gly Glu Asn Thr Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly
 225 230 235 240

Lys Gly Ala Gln Phe Leu Ala Thr Val Gln Trp Gln Leu Asn Gly Asn
 245 250 255
 Lys Ile Thr Asp Phe Ser Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln
 260 265 270
 Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Val Asn Thr Val Leu Arg
 275 280 285
 Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Arg Tyr Asp Cys Leu
 290 295 300
 Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Ile Arg Leu Ser Arg
 305 310 315 320
 Lys Asn Pro Ile Asp His Gln Ser Thr Tyr Cys Ile Ile Ala Val Cys
 325 330 335
 Ser Val Leu Leu Met Leu Ile Asn Val Leu Val Ile Ile Leu Lys Thr
 340 345 350
 Phe Trp Ile Glu Ala Thr Leu Leu Trp Arg Asp Ile Ala Lys Pro Tyr
 355 360 365
 Lys Thr Arg Asn Asp Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Val Ile Tyr Pro
 370 375 380
 Arg Asn Tyr Thr Ser Ser Thr Asp Gly Ala Ser Arg Val Glu Tyr Phe
 385 390 395 400
 Val His Gln Ile Leu Pro Asp Val Leu Glu Asn Lys Cys Gly Tyr Thr
 405 410 415
 Leu Cys Ile Tyr Gly Arg Asp Met Leu Pro Gly Glu Asp Val Val Thr
 420 425 430
 Ala Val Glu Thr Asn Ile Arg Lys Ser Arg Arg His Ile Phe Ile Leu
 435 440 445
 Thr Pro Gln Ile Thr His Asn Glu Glu Phe Ala Tyr Glu Gln Glu Val
 450 455 460
 Ala Leu His Ser Ala Leu Ile Gln Asn Asp Ser Lys Val Ile Leu Ile
 465 470 475 480
 Glu Met Glu Ala Leu Ser Glu Leu Asp Met Leu Gln Ala Glu Ala Leu
 485 490 495

031047

Gln Asp Ser Leu Arg His Leu Met Glu Val Gln Gly Thr Ile Lys Trp
500 505 510

Arg Glu Asp His Val Ala Asn Lys Arg Ser Leu Asn Ser Lys Phe Trp
515 520 525

Lys His Val Arg Tyr Gln Met Pro Val Pro Ser Lys Met Pro Arg Lys
530 535 540

Ala Ser Ser Leu Thr Ser Leu Ala Ala Gln Lys Gln
545 550 555

<210> 3
<211> 270
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Lys Pro Lys Met Lys Tyr Ser Thr Asn Lys Ile Ser Thr Ala Lys
1 5 10 15

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

Gln Gln Lys Ala Lys Glu Val Cys Pro Met Tyr Phe Met Lys Leu Arg
35 40 45

Ser Gly Leu Met Ile Lys Lys Glu Ala Cys Tyr Phe Arg Arg Glu Thr
50 55 60

Thr Lys Arg Pro Ser Leu Lys Thr Gly Arg Lys His Lys Arg His Leu
65 70 75 80

Val Leu Ala Ala Cys Gln Gln Gln Ser Thr Val Glu Cys Phe Ala Phe
85 90 95

Gly Ile Ser Gly Val Gln Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp Ser Ser
100 105 110

Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Thr
115 120 125

Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu
130 135 140

Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val Leu
145 150 155 160

031047

Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp Gly
165 170 175

Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe
180 185 190

Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys Cys
195 200 205

Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Met His
210 215 220

Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe Ile
225 230 235 240

Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser Glu
245 250 255

Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr
260 265 270

<210> 4
<211> 269
<212> PRT
<213> *Macaca fascicularis*

<400> 4

Met Lys Pro Lys Met Lys Tyr Ser Thr Asn Lys Ile Ser Thr Ala Lys
1 5 10 15

Arg Lys Asn Thr Ala Ser Lys Ala Leu Cys Phe Lys Leu Gly Lys Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ala Lys Glu Val Cys His Val Tyr Phe Met Lys Leu Arg
35 40 45

Ser Gly Leu Met Ile Lys Lys Glu Ala Cys Tyr Phe Arg Arg Glu Thr
50 55 60

Thr Lys Arg Pro Ser Leu Lys Thr Gly Gly Lys His Lys Gly His Leu
65 70 75 80

Val Leu Ala Ala Cys Gln Gln Gln Ser Thr Val Glu Cys Phe Ala Phe
85 90 95

Gly Ile Ser Gly Val Pro Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp Ser Ser
100 105 110

Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Ser Leu Ala Ser Leu Ser Thr
 115 120 125

Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu
 130 135 140

Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Lys Lys Lys Asp Lys Val Leu
 145 150 155 160

Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Ser Glu Ser Gly Asp Gly
 165 170 175

Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe
 180 185 190

Trp Leu Gln Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys Cys
 195 200 205

Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Arg Ser
 210 215 220

Phe Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe Ile
 225 230 235 240

Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Tyr Ser Glu
 245 250 255

Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu
 260 265

<210> 5
 <211> 567
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5

Met Ile Asp Arg Gln Arg Met Gly Leu Trp Ala Leu Ala Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Leu Pro Met Tyr Leu Thr Val Thr Glu Gly Ser Lys Ser Ser Trp Gly
 20 25 30

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

Thr Tyr Pro Val Glu Trp Tyr Tyr Ser Asp Thr Asn Glu Ser Ile Pro
 50 55 60

031047

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

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

Ser Pro Asn Leu Asn Lys Thr Gly Tyr Leu Asn Val Thr Ile His Lys
 100 105 110

Lys Pro Pro Ser Cys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val
 115 120 125

Arg Gly Ser Asp Lys Asn Phe Lys Ile Thr Cys Pro Thr Ile Asp Leu
 130 135 140

Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Val Gln Trp Phe Lys Asn Cys Lys Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Glu Pro Arg Phe Arg Ala His Arg Ser Tyr Leu Phe Ile Asp Asn
 165 170 175

Val Thr His Asp Asp Glu Gly Asp Tyr Thr Cys Gln Phe Thr His Ala
 180 185 190

Glu Asn Gly Thr Asn Tyr Ile Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val
 195 200 205

Glu Glu Lys Gly Phe Ser Met Phe Pro Val Ile Thr Asn Pro Pro Tyr
 210 215 220

Asn His Thr Met Glu Val Glu Ile Gly Lys Pro Ala Ser Ile Ala Cys
 225 230 235 240

Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly Ser His Phe Leu Ala Asp Val Leu Trp
 245 250 255

Gln Ile Asn Lys Thr Val Val Gly Asn Phe Gly Glu Ala Arg Ile Gln
 260 265 270

Glu Glu Glu Gly Arg Asn Glu Ser Ser Ser Asn Asp Met Asp Cys Leu
 275 280 285

Thr Ser Val Leu Arg Ile Thr Gly Val Thr Glu Lys Asp Leu Ser Leu
 290 295 300

Glu Tyr Asp Cys Leu Ala Leu Asn Leu His Gly Met Ile Arg His Thr

Cys Leu Asp Leu Lys His Phe
565

<210> 6
<211> 300
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2L человеческо-мышинная химера ННМ

<400> 6

Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val
1 5 10 15

Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr
20 25 30

Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe
35 40 45

Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala Asp Ser
50 55 60

Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr Gly
65 70 75 80

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

Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn Ser Lys
100 105 110

Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu Glu
115 120 125

Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala His
130 135 140

Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala Gly Asp
145 150 155 160

Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr Ser Val
165 170 175

Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Glu Glu Lys Gly Phe Ser Met Phe
180 185 190

Pro Val Ile Thr Asn Pro Pro Tyr Asn His Thr Met Glu Val Glu Ile

Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu Glu Trp Phe Lys
 115 120 125

Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala His Lys Ser Phe
 130 135 140

Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala Gly Asp Tyr Thr Cys
 145 150 155 160

Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr Ser Val Thr Ala Thr
 165 170 175

Arg Ser Phe Thr Val Glu Glu Lys Gly Phe Ser Met Phe Pro Val Ile
 180 185 190

Thr Asn Pro Pro Tyr Asn His Thr Met Glu Val Glu Ile Gly Lys Pro
 195 200 205

Ala Ser Ile Ala Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly Ser His Phe Leu
 210 215 220

Ala Asp Val Leu Trp Gln Ile Asn Lys Thr Val Val Gly Asn Phe Gly
 225 230 235 240

Glu Ala Arg Ile Gln Glu Glu Glu Gly Arg Asn Glu Ser Ser Ser Asn
 245 250 255

Asp Met Asp Cys Leu Thr Ser Val Leu Arg Ile Thr Gly Val Thr Glu
 260 265 270

Lys Asp Leu Ser Leu Glu Tyr Asp Cys Leu Ala Leu Asn Leu His Gly
 275 280 285

Met Ile Arg His Thr Ile Arg Leu Arg
 290 295

<210> 8
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2L человеческо-мышинная химера HMH

<400> 8

Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val
 1 5 10 15

031047

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

031047

Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu Ala Leu
 275 280 285

Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg Lys
 290 295 300

<210> 9
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val
 1 5 10 15

Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr
 20 25 30

Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe
 35 40 45

Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala Asp Ser
 50 55 60

Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr Gly
 65 70 75 80

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

Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val
 100

<210> 10
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Ser Gly Ser Glu Lys Asn Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu
 1 5 10 15

Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu
 20 25 30

Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn
 35 40 45

031047

Val Met Thr Glu Asp Ala Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn
 50 55 60

Glu Asn Gly Ala Asn Tyr Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val
 65 70 75 80

<210> 11
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr
 35 40 45

Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln
 50 55 60

Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg
 65 70 75 80

Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu
 85 90 95

Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg
 100 105 110

Lys Asn Pro Ile
 115

<210> 12
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Lys Ser Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg Cys Pro
 1 5 10 15

Gln Arg Gly Arg Ser Thr Tyr Pro Val Glu Trp Tyr Tyr Ser Asp Thr
 20 25 30

031047

Asn Glu Ser Ile Pro Thr Gln Lys Arg Asn Arg Ile Phe Val Ser Arg
35 40 45

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

Ala Cys Val Ile Arg Ser Pro Asn Leu Asn Lys Thr Gly Tyr Leu Asn
65 70 75 80

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

Met Tyr Ser Thr Val
100

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 13

His Tyr Gly Met Ala
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 14

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

Gly

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 15

Gln Ser Asp Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 16

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 17

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 18

Phe Gln Ala Thr His Asp Pro Phe Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 19

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

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

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

Ser Ser Ile Ile Thr Asp Gly Thr Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gln Ser Asp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 20
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 20

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 21

Asp Tyr Asn Met Asn
 1 5

<210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 22

Thr Tyr Trp Met Asn
 1 5

<210> 23
 <211> 6
 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Asp Asp Tyr Met His
1 5

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

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

Gly

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Met Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Asp Thr Ser Phe Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Arg Ile Asp Pro Ala Ile Gly Asn Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Asp

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Glu Gly Asp Thr Tyr Leu Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Ser Glu Asn Ile Tyr Tyr Ile Asn Phe Gln Tyr Tyr Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Tyr Asp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr
1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Gly Asp Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

031047

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 34

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Arg Met His
1 5 10

<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 35

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Ser Ser Tyr Met Phe
1 5 10 15

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 36

Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val Ile His
1 5 10

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 37

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 38

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 39

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

Gln His Ser Arg Glu Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Leu Gln Ser Asp Asn Met Leu Thr
1 5

<210> 45

031047

<211> 120
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> C2519A VH

<400> 45

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

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

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Asp Thr Tyr Leu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 46
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> C2521A VH

<400> 46

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

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

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

031047

Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Glu Asn Ile Tyr Tyr Ile Asn Phe Gln Tyr Tyr Phe Ala
100 105 110

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

<210> 47

<211> 117

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> C2244/ STLM15 VH

<400> 47

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Tyr Asp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 48

031047

<211> 117
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> C2494A/ STLM62 VH

<400> 48

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ile Gly Asn Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Leu Gly Asp Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 49
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> C2519A VL

<400> 49

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser
 20 25 30

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

031047

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

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

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

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

<210> 50

<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> C2521A VL

<400> 50

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

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

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

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

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

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

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

<210> 51

<211> 111

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> C2244/ STLM15 VL

<400> 51

031047

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Ser Ser Tyr Met Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> C2494A/ STLM62 VL

<400> 52

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

Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Thr Leu Ser
 65 70 75 80

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

031047

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

<210> 53
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> STLM48, STLM49, STLM50 HCDR1

<400> 53

Thr Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> STLM51 HCDR1

<400> 54

Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 55
<211> 18
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> STLM48, STLM49, STLM50 HCDR2

<400> 55

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
1 5 10 15

Gln Gly

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> STLM51 HCDR2

<400> 56

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 57
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM48, STLM50 HCDR3

<400> 57

Leu Ser Gly Arg Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM49 HCDR3

<400> 58

Ile Gly Gly Met Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM51 HCDR3

<400> 59

Asp Thr Pro Gln Leu Asp Tyr
 1 5

<210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM48 LCDR1

<400> 60

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asp Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 61
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM49 LCDR1

<400> 61

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ala Asn Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM50 LCDR1

<400> 62

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM51 LCDR1

<400> 63

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

<210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM48, STLM50 LCDR2

<400> 64

Phe Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM49 LCDR2

<400> 65

Lys Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> STLM51 LCDR2

<400> 66

Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> STLM48 LCDR3

<400> 67

Gln Gln Phe Asn Thr Trp Pro Ile Thr
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> STLM49 LCDR3

<400> 68

Gln Gln Tyr Tyr Gly Trp Pro Ile Thr
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> STLM50 LCDR3

<400> 69

Gln Gln Phe Phe Asn Trp Pro Ile Thr
1 5

<210> 70
<211> 9

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM51 LCDR3

<400> 70

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 71
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM48, STLM50 VH

<400> 71

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

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 72
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM49 VH

<400> 72

031047

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

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ile Gly Gly Met Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 73

<211> 116

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> STLM51 VH

<400> 73

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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

031047

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 74
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM48 VL

<400> 74

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asp Ala
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Thr Trp Pro Ile
 85 90 95

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

<210> 75
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM49 VL

<400> 75

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

031047

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ala Asn Ala
 20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Gly Trp Pro Ile
 85 90 95

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

<210> 76

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> STLM50 VL

<400> 76

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Trp
 20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Ala Pro Trp
 85 90 95

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

031047

<210> 77
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM51 VL

<400> 77

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 78
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2F6 HCDR1

<400> 78

Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 79
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2F4 HCDR1

<400> 79

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 80
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2F1 HCDR1

<400> 80

Ser Tyr Trp Ile Gly
 1 5

<210> 81
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2F6 HCDR2

<400> 81

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

Gly

<210> 82
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2F4 HCDR2

<400> 82

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

Gly

<210> 83
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2F1 HCDR2

<400> 83

031047

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 84
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2F6 HCDR3

<400> 84

Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 85
<211> 12
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2F4 HCDR3

<400> 85

Asp Gly Trp Gly Thr Val Tyr Phe Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 86
<211> 12
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2F1 HCDR3

<400> 86

Asp Thr Ala Asp Phe Arg Arg Trp Asp Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2F6 LCDR1

<400> 87

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 88
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2F4 LCDR1

<400> 88

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asp Asp Leu Ala
 1 5 10

<210> 89
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2F1 LCDR1

<400> 89

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 90
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2F6, ST2F4 LCDR2

<400> 90

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 91
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2F1 LCDR2

<400> 91

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 92
 <211> 9

<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2F6 LCDR3

<400> 92

Gln Gln Phe Tyr Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2F4 LCDR3

<400> 93

Gln Gln Tyr Ile His Ala Pro Leu Thr
1 5

<210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2F1 LCDR3

<400> 94

Gln Gln Ser Asn Thr Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 95
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H112, ST2H137 HCDR1

<400> 95

Phe Tyr Asp Met Phe
1 5

<210> 96
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H52 HCDR1

<400> 96

Asp Tyr Ala Met Phe
1 5

<210> 97
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H50, ST2H232, ST2H257, ST2H231 HCDR1

<400> 97

Ile Tyr Asp Met Ile
1 5

<210> 98
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H228 HCDR1

<400> 98

Ser Tyr Asp Met Ile
1 5

<210> 99
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H318 HCDR1

<400> 99

Asp Asp Ala Met Ile
1 5

<210> 100
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H316 HCDR1

<400> 100

Gly Tyr Ala Met Ile
1 5

<210> 101
<211> 5

<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H314 HCDR1

<400> 101

Val Tyr Asp Met Ile
1 5

<210> 102
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H202 HCDR1

<400> 102

Phe Tyr Asp Met Ile
1 5

<210> 103
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H179, ST2H172, ST2H173 HCDR1

<400> 103

Ser Tyr Asp Met Phe
1 5

<210> 104
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H163 HCDR1

<400> 104

Val Tyr Asp Met Phe
1 5

<210> 105
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H162 HCDR1

<400> 105

Val Asp Ser Met Phe
1 5

<210> 106
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H139 HCDR1

<400> 106

Gly Tyr Asp Met Phe
1 5

<210> 107
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H136 HCDR1

<400> 107

Ile Tyr Asp Met Phe
1 5

<210> 108
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H129 HCDR1

<400> 108

Ile Tyr Ser Met Phe
1 5

<210> 109
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H112 HCDR3

<400> 109

Ser Ile Arg Gly Glu Gly Gly Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 110
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2H52 HCDR3

<400> 110

Ala Ile Glu Gly Glu Gly Gly Glu Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 111
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2H50 HCDR3

<400> 111

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

Gly

<210> 112
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2H232 HCDR3

<400> 112

Thr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 113
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2H228 HCDR3

<400> 113

Thr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 114

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ST2H257 HCDR3

<400> 114

Ser Ile Arg Gly Glu Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 115

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ST2H231 HCDR3

<400> 115

Thr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 116

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ST2H318 HCDR3

<400> 116

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

Gly

<210> 117
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2H316 HCDR3

<400> 117

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

Gly

<210> 118
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2H314 HCDR3

<400> 118

Thr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 119
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 119

Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile
 1 5 10 15

Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr
 20 25 30

Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val
 35 40 45

Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Glu Val Ala Asp
 50 55 60

Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr
 65 70 75 80

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

Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn Ser
 100 105 110

Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu
 115 120 125

Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala
 130 135 140

His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala Gly
 145 150 155 160

Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr Ser
 165 170 175

Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe Ser
 180 185 190

Leu Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu Val
 195 200 205

Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys
 210 215 220

Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr Lys
 225 230 235 240

Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln Asn
 245 250 255

Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg Ile
 260 265 270

Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu Ala
 275 280 285

Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg Lys
 290 295 300

Asn Pro Ser Lys Glu Cys Phe
 305 310

<210> 120

031047

<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H202 HCDR3

<400> 120

Thr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 121
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H179 HCDR3

<400> 121

Asp Ile Lys Gly Glu Gly Gly Arg Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 122
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H172 HCDR3

<400> 122

Ala Ile Ala Gly Glu Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 123
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H173 HCDR3

<400> 123

031047

Asp Ile Lys Gly Glu Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 124
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H163 HCDR3

<400> 124

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

Gly

<210> 125
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H162 HCDR3

<400> 125

Ser Ile Glu Gly Asn Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 126
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2H139 HCDR3

<400> 126

Asp Ile Gly Gly Glu Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 127

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2H137 HCDR3

<400> 127

Asp Ile Arg Gly Glu Gly Gly Gly Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 128
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2H136 HCDR3

<400> 128

Tyr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 129
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2H129 HCDR3

<400> 129

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

Gly

<210> 130
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ST2L32 LCDR1

<400> 130

031047

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Asp Leu Ala
1 5 10

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2L32 LCDR3

<400> 131

Gln Gln Tyr Ile Gly Ala Pro Ile Thr
1 5

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2L35 LCDR3

<400> 132

Gln Gln Tyr Ile Asp Ala Pro Leu Thr
1 5

<210> 133
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2L49 LCDR3

<400> 133

Gln Gln Tyr Asn Asp Ala Ile Thr
1 5

<210> 134
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ST2L59 LCDR3

<400> 134

Gln Gln Tyr Ile Thr Ala Pro Leu Thr
1 5

<210> 135
<211> 106
<212> PRT

031047

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL2494-IGKV1-33*01 O18

<400> 135

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 Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 136

<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL2494-IGKV1-27*01 A20

<400> 136

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 Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

031047

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

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

<210> 137
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL2494-IGKV1-39*01O12

<400> 137

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 Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 138
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL2494-IGKV1-12*01 L5

<400> 138

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val

031047

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

<210> 139
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL2494-IGKV1-5*01 L12

<400> 139

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

<210> 140
 <211> 106

031047

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL2494-IGKV1-9*01 L8

<400> 140

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 141

<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL2494-IGKV3-15*01 L2

<400> 141

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

031047

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ile Gly Asn Thr Glu Tyr Ala Glu Lys Phe
 50 55 60

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 144

<211> 117

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH2494-IGHV1-24*01

<400> 144

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Ala Phe Asn Ile Lys Asp Asp
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ile Gly Asn Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp 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 Thr Gly Asp Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

031047

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 145

<211> 117

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH STLH201

<400> 145

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ile Gly Asn Thr Glu Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 146

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> HCDR3 of STLM226-STLM232

<400> 146

Gly Asp Phe Tyr Ala Met Ala Tyr
1 5

031047

<210> 147
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> STLM266 VL

<400> 147

Leu Gln Ser Asp Asn Leu Leu Thr
 1 5

<210> 148
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> IGHV1-24*01 каркас

<400> 148

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

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

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

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp 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 Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105

<210> 149
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> IGHV1-f*01 каркас

<400> 149

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

<210> 151
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> IGKV1-9*01 L8 каркас

<400> 151

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 152
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> IGKV1-5*01 L12

<400> 152

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

031047

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 155

<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> IGKV1-27*01 A20

<400> 155

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

031047

100

105

<210> 156
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> IGKV1-33*01 O18

<400> 156

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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 157
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 157

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr
 1 5 10 15

Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
 20 25 30

Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp
 35 40 45

Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg
 50 55 60

031047

Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Glu Val Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg
 85 90 95

Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn
 100 105 110

Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn
 115 120 125

Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro
 130 135 140

Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg
 145 150 155 160

Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala
 165 170 175

Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr
 180 185 190

Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe
 195 200 205

Ser Leu Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu
 210 215 220

Val Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly
 225 230 235 240

Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr
 245 250 255

Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln
 260 265 270

Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg
 275 280 285

Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu
 290 295 300

Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg
 305 310 315 320

Lys Asn Pro Ser Lys Glu Cys Phe
325

<210> 158
<211> 109
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> VH 3-23 каркас

<400> 158

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105

<210> 159
<211> 106
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> Vk L6 каркас (IGKV3-11)

<400> 159

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

031047

35

40

45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 160

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> HCDR1 общий типичный элемент

<220>

<221> Xaa1

<222> (1)..(1)

<223> Xaa1 - S, F, D, I, G или V

<220>

<221> Xaa2

<222> (2)..(2)

<223> Xaa2 - Y или D

<220>

<221> Xaa3

<222> (3)..(3)

<223> Xaa3 - A, D или S

<220>

<221> Xaa4

<222> (5)..(5)

<223> Xaa4 - S, F или I

<400> 160

Xaa Xaa Xaa Met Xaa
 1 5

<210> 161

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> HCDR2 общий типичный элемент

<220>
 <221> Xaa1
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa1 - A, S, T, Y или D

<220>
 <221> Xaa2
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa2 - S, R, E, K, G или A

<220>
 <221> Xaa3
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa3 - S, E или N

<220>
 <221> Xaa4
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa4 - S, R, E, G, T, D или A

<220>
 <221> Xaa5
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa5 - Y, D, N, A или S

<400> 161

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

Gly

<210> 162
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> HCDR3 общий типичный элемент

<220>
 <221> Xaa1
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa1 - D, A, R, N, Q, P, E, I, H, S, T или Y

<220>
 <221> Xaa2
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa2 - P, A, H, Y, E, Q, L, S, N, T, V или I

<400> 162

Xaa Xaa Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 163
 <211> 11
 <212> PRT

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> STLH255 HCDR3

<400> 165

Ala Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 166
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> STLH256 HCDR3

<400> 166

Arg Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 167
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> STLH257 HCDR3

<400> 167

Asn Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 168
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> STLH258 HCDR3

<400> 168

Gln Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 169
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> STLH259 HCDR3

<400> 169

Glu Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 170

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> STLH260 HCDR3

<400> 170

Ile Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 171

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> STLH261 HCDR3

<400> 171

His Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 172

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> STLH262 HCDR3

<400> 172

Ser Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 173

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> STLH263 HCDR3

<400> 173

Thr Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 174

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> STLH264 HCDR3

<400> 174

Tyr Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 175
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> STLH265 HCDR3

<400> 175

Asp Ala Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 176
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> STLH266 HCDR3

<400> 176

Asp His Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 177
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> STLH267 HCDR3

<400> 177

Asp Tyr Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 178
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> STLH268 HCDR3

<400> 178

Asp Glu Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 179

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> STLH269 HCDR3

<400> 179

Asp Gln Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 180

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> STLH270 HCDR3

<400> 180

Asp Leu Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 181

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> STLH271 HCDR3

<400> 181

Asp Ser Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 182

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> STLH272 HCDR3

<400> 182

Asp Asn Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 183

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> STLH273 HCDR3

<400> 183

Asp Thr Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 184
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> STLH274 HCDR3

<400> 184

Asp Val Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 185
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> STLH275 HCDR3

<400> 185

Asp Ile Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 186
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2H52

<400> 186

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

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

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

031047

Ser Ala Ile Glu Gly Glu Gly Gly Glu Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 187

<211> 123

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> ST2H50

<400> 187

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

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

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

Ser Thr Ile Lys Gly Glu Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 188

031047

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2H318

<400> 188

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 189
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2H316

<400> 189

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

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

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

031047

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

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

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

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

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

<210> 190

<211> 123

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> ST2H314

<400> 190

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

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

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

Ser Thr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 191

031047

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2H257

<400> 191

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

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

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

Ser Ser Ile Arg Gly Glu Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

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

<210> 192
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2H232

<400> 192

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

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

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

031047

Ser Thr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 193

<211> 123

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> ST2H231

<400> 193

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

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

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

Ser Thr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 194

031047

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2H228

<400> 194

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

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

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

Ser Thr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

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

<210> 195
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2H202

<400> 195

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

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

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

031047

Ser Thr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 196

<211> 123

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> ST2H179

<400> 196

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

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

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

Ser Asp Ile Lys Gly Glu Gly Gly Arg Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 197

031047

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2H173

<400> 197

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

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

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

Ser Asp Ile Lys Gly Glu Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

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

<210> 198
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2H172

<400> 198

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

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

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

031047

Ser Ala Ile Ala Gly Glu Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 199

<211> 123

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> ST2H163

<400> 199

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

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

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

Ser Asp Ile Lys Gly Glu Gly Gly Glu Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 200

031047

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2H162

<400> 200

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Asp
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Glu Gly Asn Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

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

<210> 201
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2H139

<400> 201

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

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

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

031047

Ser Asp Ile Gly Gly Glu Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 202

<211> 123

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> ST2H137

<400> 202

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

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

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

Ser Asp Ile Arg Gly Glu Gly Gly Gly Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 203

031047

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2H136

<400> 203

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

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

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

Ser Tyr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

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

<210> 204
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2H129

<400> 204

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

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

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

031047

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

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

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

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

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

<210> 205

<211> 123

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> ST2H112

<400> 205

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

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

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

Ser Ser Ile Arg Gly Glu Gly Gly Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 206

031047

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2L32

<400> 206

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Asp
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Gly Ala Pro Ile
 85 90 95

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

<210> 207
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2L35

<400> 207

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Asp
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

031047

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Asp Ala Pro Leu
85 90 95

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

<210> 208

<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> ST2L49

<400> 208

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Asp
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Ala Ile Thr
85 90 95

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

<210> 209

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> ST2L59

<400> 209

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

031047

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Asp
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Thr Ala Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 210
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ST2L эпитоп

<400> 210

Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp
 1 5 10

<210> 211
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Искусственный

<220>
 <223> VH CDNA для STLM208

<400> 211

gaggtgcagc tgctggagag cggcggcgcc ctggtgcagc ccggcggcag cctgcgcctg 60
 agctgcgccc ccagcggcctt caccttcagc atctacgaca tgatctgggt gcgccagccc 120
 cccggcaagg gcctggagtg ggtcagcagc atccgcggcg agggcggcgg cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggccc cttcaccatc agccgcgaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg cgccgaggac accgcctgtg actactgcgc ccgcgacccc 300
 tggagcaccg agggcagcctt cttcgtgctg gactactggg gccagggcac cctggtgacc 360
 gtgagcagc 369

<210> 212
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Искусственный

<220>
 <223> VL CDNA для STLM208

<400> 212
 gagatcgtgc tgaccsaagag ccccgccacc ctgagcctga gccccggcga gcgcgccacc 60
 ctgagctgcc gcgccagcca gagcgtggac gacgacctgg cctggtagca gcagaagccc 120
 ggccaggccc cccgctgct gatctacgac gccagcaacc gcgccaccgg catccccgcc 180
 cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcacctga ccatcagcag cctggagccc 240
 gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag tacatcaccg cccccctgac cttcggccag 300
 ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 213
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Искусственный

<220>
 <223> VH CDNA для c2244

<400> 213
 gaggtgcagc ttcaggagtc aggacctggc ctgggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60
 acctgcaactg tcaactggctt ctcaatcacc agtgattatg cctggaactg gatccggcag 120
 tttccaggaa gcaagctaga gtggatgggc ttcataagct acagtgggtga cactagcttc 180
 aaccatctc tcaaaagtcg aatctctgtc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc 240
 ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aagttatgat 300
 ggttactcat ttgactactg gggccaaggc actactctca cagtctcctc a 351

<210> 214
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Искусственный

<220>
 <223> VL CDNA для c2244

<400> 214
 gacattgtgc tgaccsaatc tccagcttcc ttagctatat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct ctagttatat gttctggtac 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaacctc ctcatctatc ttgcatcaa cctagaatct 180
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtgagg tctgggacag acttcaccct caacatacat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgcagcctat tactgtcaac acagtaggga gattccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa

333

<210> 215

<211> 266

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 215

Met Arg Pro Arg Met Lys Tyr Ser Asn Ser Lys Ile Ser Pro Ala Lys
 1 5 10 15

Phe Ser Ser Thr Ala Gly Glu Ala Leu Val Pro Pro Cys Lys Ile Arg
 20 25 30

Arg Ser Gln Gln Lys Thr Lys Glu Phe Cys His Val Tyr Cys Met Arg
 35 40 45

Leu Arg Ser Gly Leu Thr Ile Arg Lys Glu Thr Ser Tyr Phe Arg Lys
 50 55 60

Glu Pro Thr Lys Arg Tyr Ser Leu Lys Ser Gly Thr Lys His Glu Glu
 65 70 75 80

Asn Phe Ser Ala Tyr Pro Arg Asp Ser Arg Lys Arg Ser Leu Leu Gly
 85 90 95

Ser Ile Gln Ala Phe Ala Ala Ser Val Asp Thr Leu Ser Ile Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Thr Tyr Asn Asp
 115 120 125

Gln Ser Val Ser Phe Val Leu Glu Asn Gly Cys Tyr Val Ile Asn Val
 130 135 140

Asp Asp Ser Gly Lys Asp Gln Glu Gln Asp Gln Val Leu Leu Arg Tyr
 145 150 155 160

Tyr Glu Ser Pro Cys Pro Ala Ser Gln Ser Gly Asp Gly Val Asp Gly
 165 170 175

Lys Lys Leu Met Val Asn Met Ser Pro Ile Lys Asp Thr Asp Ile Trp
 180 185 190

Leu His Ala Asn Asp Lys Asp Tyr Ser Val Glu Leu Gln Arg Gly Asp
 195 200 205

Val Ser Pro Pro Glu Gln Ala Phe Phe Val Leu His Lys Lys Ser Ser

210		215		220
Asp Phe Val Ser Phe Glu Cys Lys Asn Leu Pro Gly Thr Tyr Ile Gly				
225		230		235
				240
Val Lys Asp Asn Gln Leu Ala Leu Val Glu Glu Lys Asp Glu Ser Cys				
		245		250
				255
Asn Asn Ile Met Phe Lys Leu Ser Lys Ile				
		260		265

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное человеческое или адаптированное в отношении человеческой каркасной области антитело-антагонист или их фрагменты, специфически связывающиеся с доменом I (SEQ ID NO: 9) человеческого интерлейкина 1 рецепторподобного белка 1 (ST2L), содержащее участок, определяющий комплементарность, тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), HCDR 2 (HCDR2), HCDR 3 (HCDR3), участок, определяющий комплементарность, легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), LCDR 2 (LCDR2) и LCDR 3 (LCDR3); где:

- HCDR1 содержит SEQ ID NO: 97;
- HCDR2 содержит SEQ ID NO: 114;
- HCDR3 содержит SEQ ID NO: 84;
- LCDR1 содержит SEQ ID NO: 130;
- LCDR2 содержит SEQ ID NO: 90 и
- LCDR3 содержит SEQ ID NO: 134.

2. Выделенное антитело-антагонист по п.1, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи (VH) и вариабельный участок легкой цепи (VL), где:

(a) VH содержит каркас VH, полученный из каркасных областей антитела человека IGHV3-23 (SEQ ID NO: 158), IGHV1-24*01 (SEQ ID NO: 148) или IGHV1-f*01 (SEQ ID NO: 149), и

(b) VL содержит каркас VL, полученный из каркасных областей антитела человека IGKV3-11 (L6) (SEQ ID NO: 159), IGKV3-15*01 (L2) (SEQ ID NO: 150), IGKV1-9*01 (L8) (SEQ ID NO: 151), IGKV1-5*01 (L12) (SEQ ID NO: 152), IGKV1-12*01 (L5) (SEQ ID NO: 153), IGKV1-39*01 (O12) (SEQ ID NO: 154), IGKV1-27*01 (A20) (SEQ ID NO: 155) или IGKV1-33*01 (O18) (SEQ ID NO: 156).

3. Выделенное антитело-антагонист по п.2, где:

- каркас VH получен из человеческого IGHV3-23 (SEQ ID NO: 158) и
- каркас VL получен из человеческого IGKV3-11 (L6) (SEQ ID NO: 159).

4. Выделенное антитело-антагонист по п.2 или 3, где:

- VH содержит SEQ ID NO: 191 и
- VL содержит SEQ ID NO: 209.

5. Выделенное антитело-антагонист по любому из пп.1-4, где антитело-антагонист относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

6. Выделенное антитело-антагонист по п.5, где Fc-участок антитело-антагониста содержит замену, где замена содержит M252Y/S254T/T256E, V234A/G237A/P238S, V234A/G237A/H268Q, H268A/V309L/A330S/P331S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S или S228P/L234A/L235A, причем нумерация остатков соответствует принятой в ЕС нумерации.

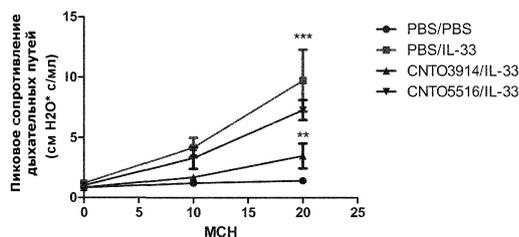
7. Выделенное антитело-антагонист по любому из пп.1-6, где антитело-антагонист блокирует взаимодействие IL-33/ST2L.

8. Выделенное антитело-антагонист по любому из пп.1-7, где антитело-антагонист имеет константу диссоциации ($K_{дисс}$) с человеческим ST2L от приблизительно 5×10^{-12} М до приблизительно 7×10^{-10} М, константу скорости ассоциации ($k_{асс}$) с человеческим ST2L от приблизительно 2×10^6 М⁻¹с⁻¹ до приблизительно 1×10^8 М⁻¹с⁻¹, или константу скорости диссоциации ($k_{дисс}$) с человеческим ST2L от приблизительно 1×10^{-6} с⁻¹ до приблизительно 1×10^{-2} с⁻¹.

9. Выделенное антитело-антагонист по любому из пп.1-8, где антитело-антагонист имеет константу диссоциации ($K_{дисс}$) с ST2L *Macaca fascicularis* (яванского макака) (SEQ ID NO: 2) от приблизительно 3×10^{-12} М до приблизительно 2×10^{-9} М, константу скорости ассоциации ($k_{асс}$) с ST2L яванского макака от приблизительно 4×10^6 М⁻¹с⁻¹ до приблизительно 1×10^8 М⁻¹с⁻¹, или константу скорости диссоциации ($k_{дисс}$) с ST2L яванского макака от приблизительно 7×10^{-5} с⁻¹ до приблизительно 1×10^{-1} с⁻¹.

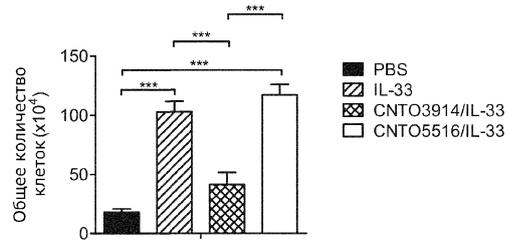
10. Выделенный полинуклеотид, кодирующий выделенное антитело-антагонист по любому из пп.1-9.

11. Вектор экспрессии, содержащий выделенный полинуклеотид по п.10.
12. Клетка-хозяин для продуцирования выделенного человеческого или адаптированного в отношении человеческой каркасной области антитела-антагониста, содержащая вектор экспрессии по п.11.
13. Способ получения антитела-антагониста, включающий культивирование клетки-хозяина по п.12 и выделение антитела-антагониста из клетки-хозяина.
14. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело-антагонист по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель, где фармацевтическая композиция предназначена для лечения или предотвращения ST2L-опосредованного заболевания.
15. Способ лечения или предотвращения ST2L-опосредованного заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного антитела-антагониста по любому из пп.1-9 или фармацевтической композиции по п.14 пациенту, нуждающемуся в этом.
16. Способ по п.15, в котором ST2L-опосредованное заболевание представляет собой астму, гиперреактивность дыхательных путей, саркоидоз, хроническое обструктивное легочное заболевание (COPD), идиопатический легочный фиброз (IPF), муковисцидоз, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), эозинофильный эзофагит, склеродерму, atopический дерматит, аллергический ринит, буллезный пемфигоид, хроническую крапивницу, диабетическую нефропатию, ревматоидный артрит, интерстициальный цистит или реакцию "трансплантат против хозяина" (GVHD) или связано с рекрутингом воспалительных клеток в легкие, гиперплазией бокаловидных клеток или увеличенной секрецией слизи или ответом мастоцитов.
17. Способ ингибирования ответа мастоцитов у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного антитела-антагониста по любому из пп.1-9 или фармацевтической композиции по п.14 пациенту, нуждающемуся в этом.
18. Способ по п.17, в котором ингибирование ответа мастоцитов включает ингибирование уровня высвобождения GM-CSF, IL-5, IL-8, IL-10 или IL-13 мастоцитами пуповинной крови человека у пациента.
19. Способ ингибирования у субъекта взаимодействия IL-33 и ST2L, включающий введение выделенного антитела-антагониста по любому из пп.1-9 или фармацевтической композиции по п.14 субъекту, нуждающемуся в этом.
20. Способ по п.19, в котором субъект имеет ST2L-опосредованное заболевание.
21. Способ по п.20, в котором ST2L-опосредованное заболевание представляет собой астму, гиперреактивность дыхательных путей, саркоидоз, хроническое обструктивное легочное заболевание (COPD), идиопатический легочный фиброз (IPF), муковисцидоз, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), эозинофильный эзофагит, склеродерму, atopический дерматит, аллергический ринит, буллезный пемфигоид, хроническую крапивницу, диабетическую нефропатию, ревматоидный артрит, интерстициальный цистит или реакцию "трансплантат против хозяина" (GVHD) или связано с рекрутингом воспалительных клеток в легкие, гиперплазией бокаловидных клеток, увеличенной секрецией слизи или ответом мастоцитов.
22. Применение выделенного антитела-антагониста по любому из пп.1-9 для лечения или предотвращения ST2L-опосредованного заболевания.
23. Применение фармацевтической композиции по п.14 для лечения или предотвращения ST2L-опосредованного заболевания.

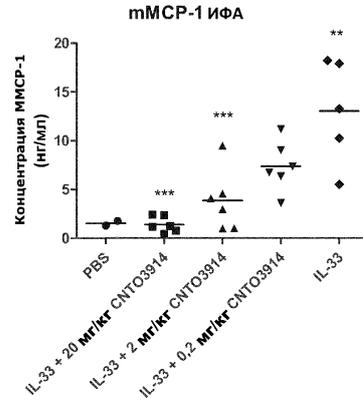


Фиг. 1

Суммарно по BAL для дисперсионного анализа

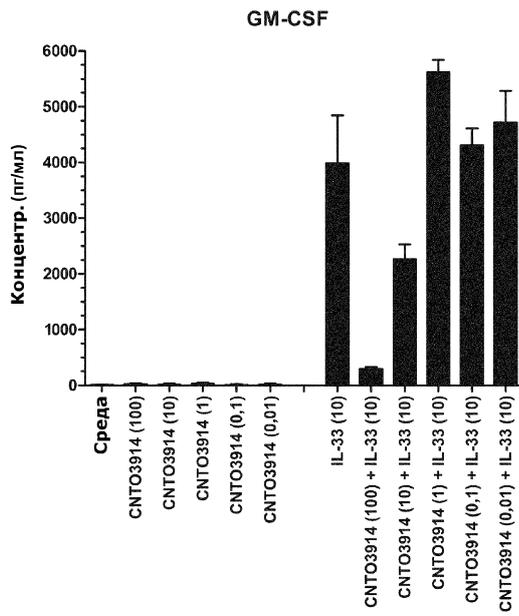


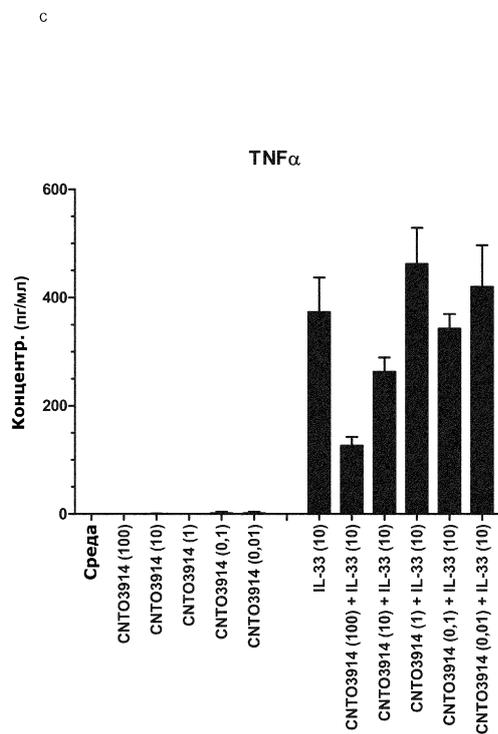
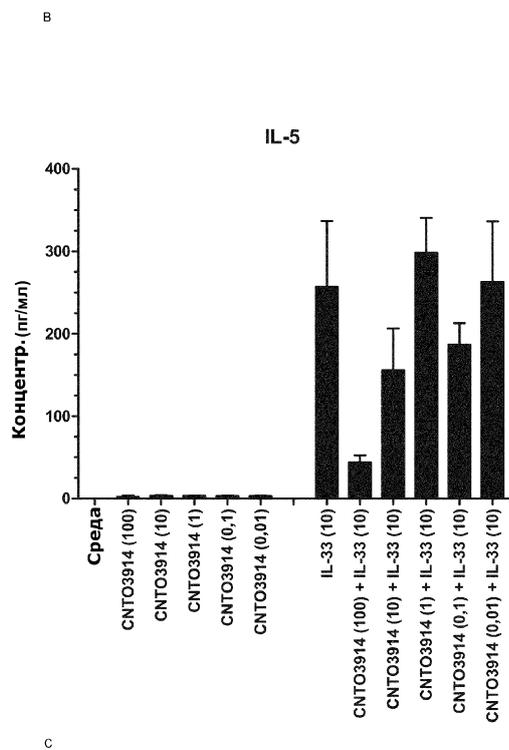
Фиг. 2



Фиг. 3

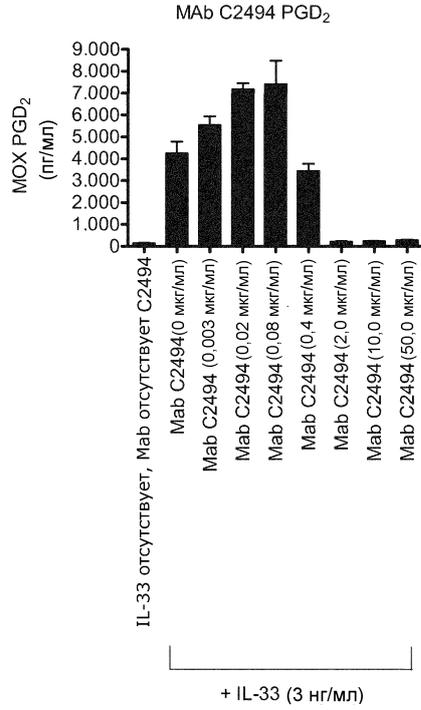
A





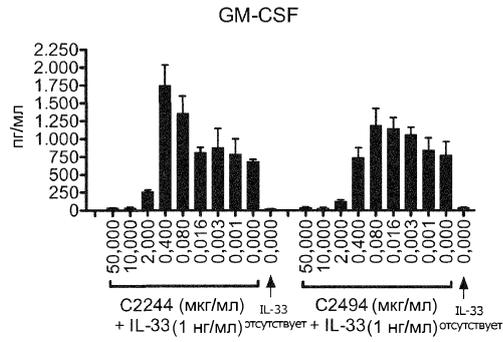
Фиг. 4А-С

031047

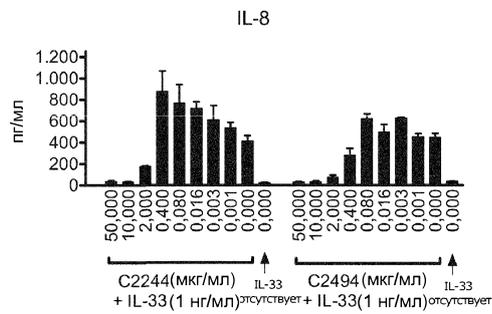


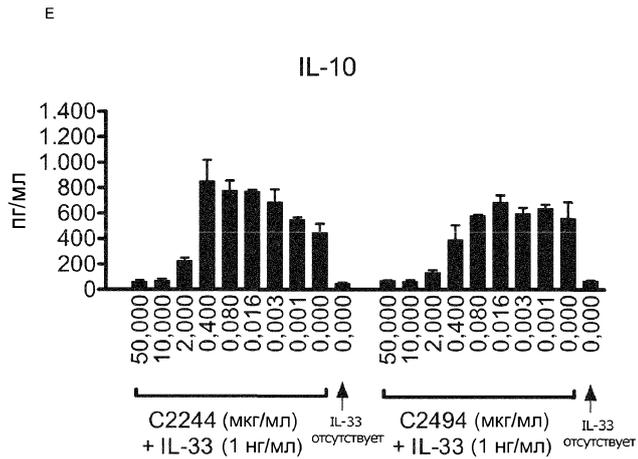
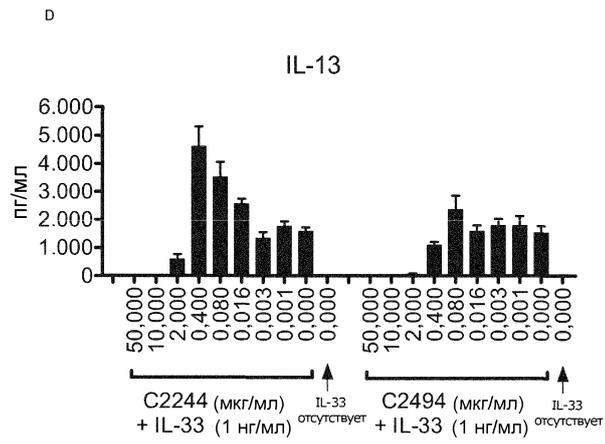
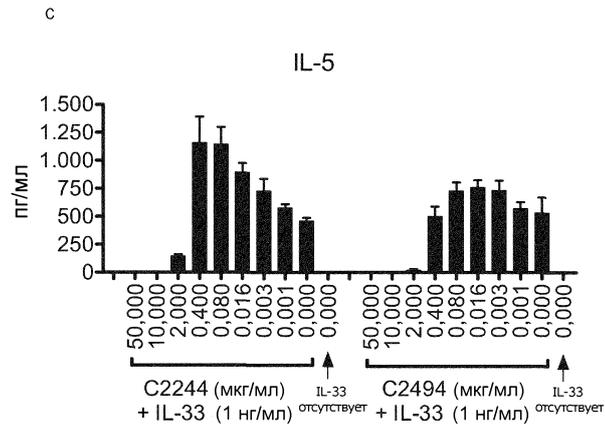
Фиг. 5

A

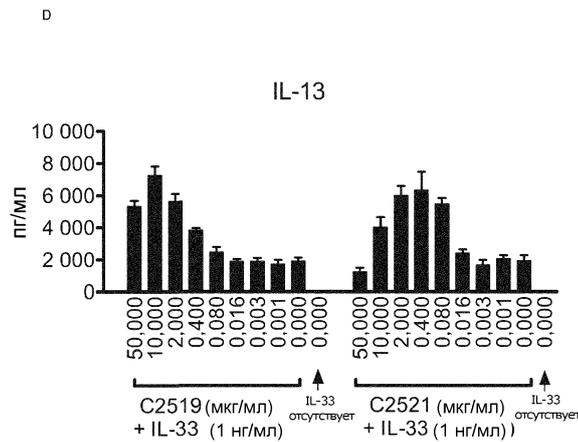
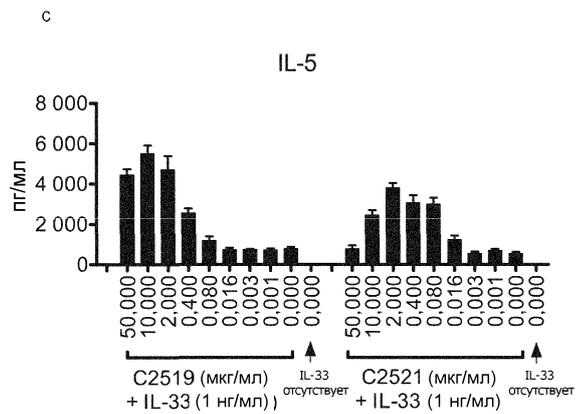
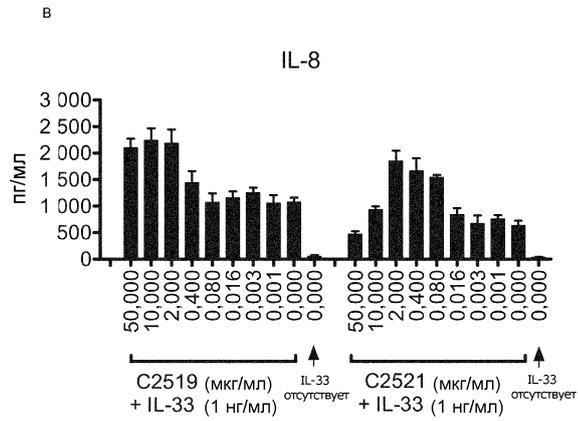
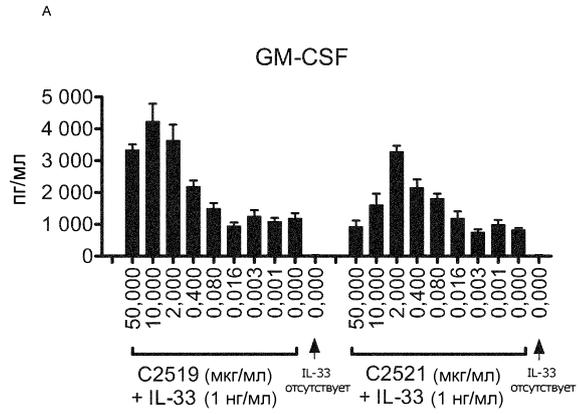


B

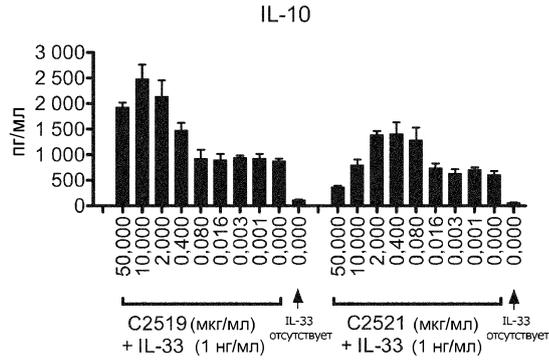




Фиг. 6А-6Е

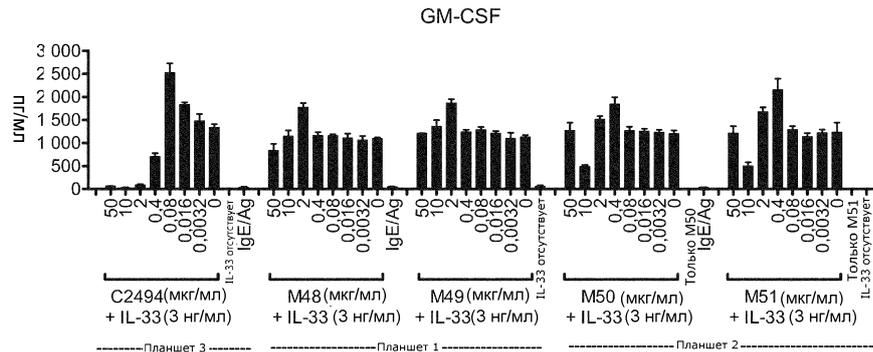


Е

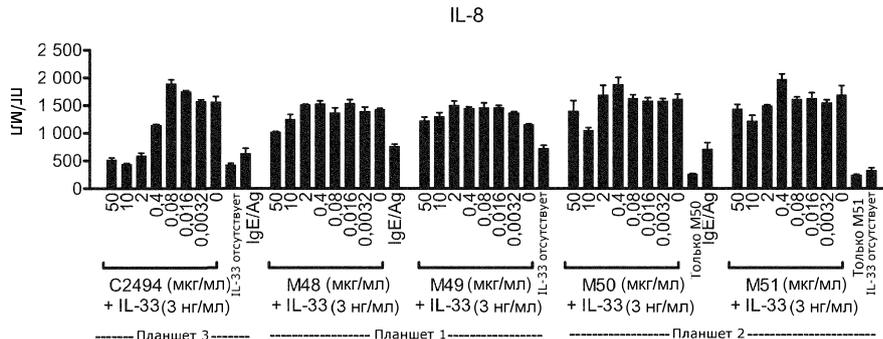


Фиг. 7А-7Е

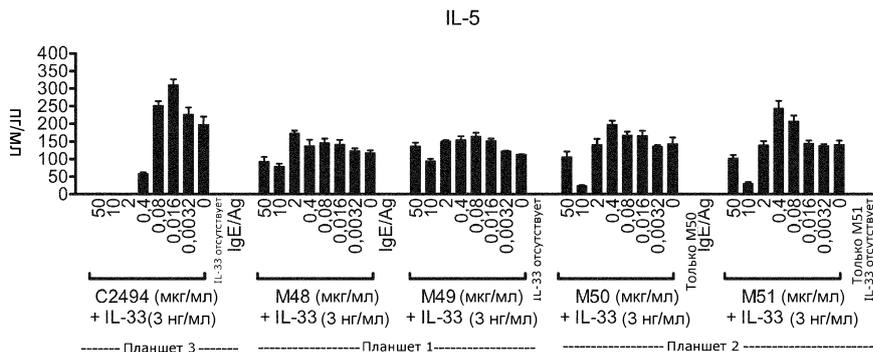
А

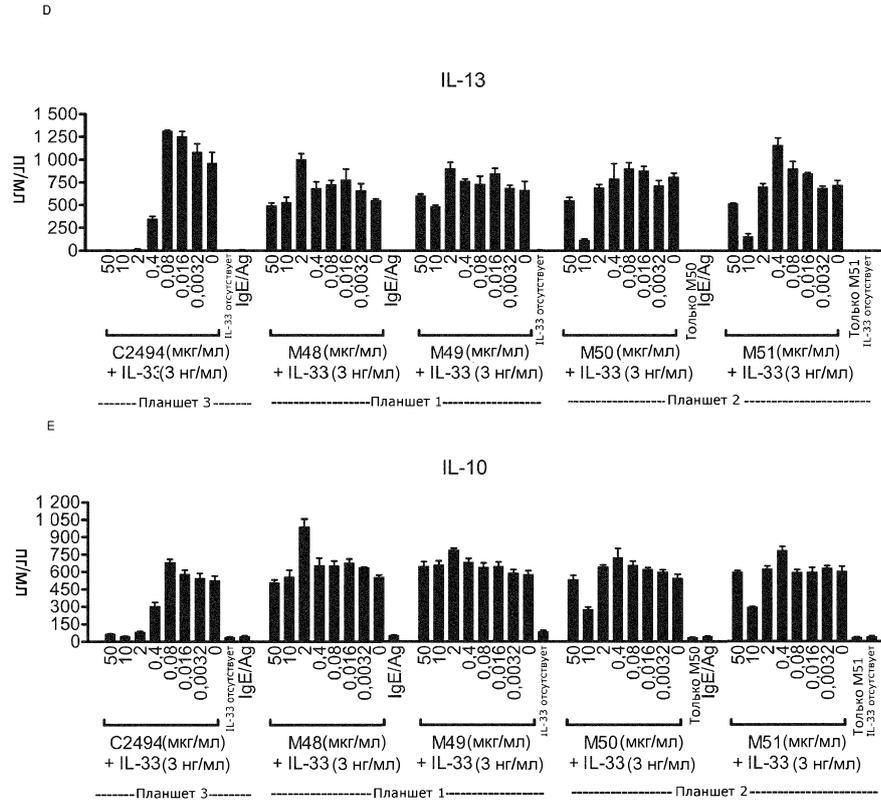


В



С





Фиг. 8А-8Е

Стимуляция 1 нг/мл IL-33 в среде stemPro-34 + 100 нг/мл SCF

Домен ST2L*	Mab	Средний % ингибирования при помощи 50 мкг/мл Mab					Средний % ингибирования при помощи 2 мкг/мл Mab				
		GM-CSF	IL-5	IL-8	IL-10	IL-13	GM-CSF	IL-5	IL-8	IL-10	IL-13
D1	C2244	95,3	99,4	91,6	86,3	100,0	62,1	68,3	57,1	50,6	62,5
D1	C2494	95,3	99,4	93,5	87,3	100,0	84,1	96,2	83,0	76,1	95,8
D3	C2519	-179,9	-481,5	-95,5	-120,6	-180,0	-205,3	-516,3	-103,3	-144,5	-195,6
D3	C2521	-12,2	-39,4	25,5	38,8	36,0	-295,3	-594,4	-190,0	-130,6	-207,8

Стимуляция 3 нг/мл IL-33 в среде RPMI/10 % FCS + 100 нг/мл SCF

Домен ST2L*	Mab	Средний % ингибирования при помощи 50 мкг/мл Mab					Средний % ингибирования при помощи 2 мкг/мл Mab				
		GM-CSF	IL-5	IL-8	IL-10	IL-13	GM-CSF	IL-5	IL-8	IL-10	IL-13
D1	C2494	95,0	99,4	67,0	87,8	99,3	92,9	99,6	62,2	84,7	98,8
D3	ST2M48	23,2	20,7	28,7	8,3	11,0	-61,6	-46,1	-5,8	-79,1	-80,8
D3	ST2M49	-7,0	-20,9	-5,7	-12,4	9,3	-65,4	-33,1	-30,0	-36,8	-35,7
D3	ST2M50	-5,7	25,7	13,2	2,0	31,9	-26,0	1,6	-4,4	-18,7	14,9
D3	ST2M51	1,9	27,3	15,0	1,3	28,6	-35,3	1,2	11,8	-3,6	3,0

*Домен ST2L, с которым связывается антитело

Фиг. 9

Название mAb/Fab	Название VL	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
ST2F6	ST2H41	SYAMS	78	AISGSGGTYADSVK	81	DPWSTEGSFVLDY	84
ST2F14	ST2H41	SYAMS	78	AISGSGGTYADSVK	81	DPWSTEGSFVLDY	84
ST2F17	ST2H41	SYAMS	78	AISGSGGTYADSVK	81	DPWSTEGSFVLDY	84
ST2F31	ST2H41	SYAMS	78	AISGSGGTYADSVK	81	DPWSTEGSFVLDY	84
ST2F41	ST2H41	SYAMS	78	AISGSGGTYADSVK	81	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM103	ST2H112	FYDMF	95	SIRGEGGTYADSVK	109	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM107	ST2H52	DYAMF	96	AIEGEGGTYADSVK	110	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM108	ST2H50	IYDMI	97	TIKGGGGTYADSVK	111	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM123	ST2H52	DYAMF	96	AIEGEGGTYADSVK	110	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM124	ST2H50	IYDMI	97	TIKGGGGTYADSVK	111	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM206	ST2H232	IYDMI	97	TIRGEGGTYADSVK	112	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM207	ST2H228	SYDMI	98	TIRGEGGTYADSVK	113	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM208	ST2H257	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM209	ST2H231	IYDMI	97	TIRGEGGTYADSVK	115	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM210	ST2H318	DDAMI	99	YIGGNGGTYADSVK	116	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM211	ST2H316	GYAMI	100	YIEGEGGTYADSVK	117	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM212	ST2H314	VYDMI	101	TIRGEGGTYADSVK	118	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM213	ST2H202	FYDMI	102	TIRGEGGTYADSVK	120	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM214	ST2H179	SYDMF	103	DIKGGGRTYADSVK	121	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM215	ST2H172	SYDMF	103	AIAGEGGTYADSVK	122	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM216	ST2H173	SYDMF	103	DIKGGGRTYADSVK	123	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM217	ST2H163	VYDMF	104	DIKGGGRTYADSVK	124	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM218	ST2H162	VDSMF	105	SIEGGGTYADSVK	125	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM219	ST2H139	GYDMF	106	DIGGGGTYADSVK	126	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM220	ST2H137	FYDMF	95	DIRGEGGTYADSVK	127	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM221	ST2H136	IYDMF	107	YIRGEGGTYADSVK	128	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM222	ST2H129	IYSMF	108	DIGGGGTYADSVK	129	DPWSTEGSFVLDY	84

Фиг. 10

Название mAb/Fab	Название VL	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
ST2F6	ST2L24	RASQSVDDDLA	87	DASNRAT	90	QQYFNWPLT	92
ST2F14	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
ST2F17	ST2L35	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIDAPLT	132
ST2F31	ST2L49	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYNDAIT	133
ST2F41	ST2L59	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYITAPLT	134
STLM103	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM107	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM108	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM123	ST2L59	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYITAPLT	134
STLM124	ST2L59	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYITAPLT	134
STLM206	ST2L59	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYITAPLT	134
STLM207	ST2L59	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYITAPLT	134
STLM208	ST2L59	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYITAPLT	134
STLM209	ST2L59	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYITAPLT	134
STLM210	ST2L49	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYNDAIT	133
STLM211	ST2L49	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYNDAIT	133
STLM212	ST2L49	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYNDAIT	133
STLM213	ST2L35	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIDAPLT	132
STLM214	ST2L35	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIDAPLT	132
STLM215	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM216	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM217	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM218	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM219	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM220	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM221	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM222	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131

Фиг. 11

Название mAb/Fab	Название VH	Название VL	H-CDR1		H-CDR2		H-CDR3	
			Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
STLM208	STLH257	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	DPWSTEGSFVLDY	84
STLM352	STLH255	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	APWSTEGSFVLDY	165
STLM351	STLH256	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	RPWSTEGSFVLDY	166
STLM350	STLH257	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	NPWSTEGSFVLDY	167
STLM349	STLH258	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	QPWSTEGSFVLDY	168
STLM348	STLH259	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	EPWSTEGSFVLDY	169
STLM347	STLH260	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	IPWSTEGSFVLDY	170
STLM346	STLH261	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	HPWSTEGSFVLDY	171
STLM345	STLH262	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	SPWSTEGSFVLDY	172
STLM344	STLH263	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	TPWSTEGSFVLDY	173
STLM343	STLH264	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	YPWSTEGSFVLDY	174
STLM342	STLH265	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	DAWSTEGSFVLDY	175
STLM341	STLH266	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	DHWSTEGSFVLDY	176
STLM340	STLH267	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	DYWSTEGSFVLDY	177
STLM339	STLH268	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	DEWSTEGSFVLDY	178
STLM338	STLH269	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	DQWSTEGSFVLDY	179
STLM337	STLH270	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	DLWSTEGSFVLDY	180
STLM336	STLH271	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	DSWSTEGSFVLDY	181
STLM335	STLH272	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	DNWSTEGSFVLDY	182
STLM334	STLH273	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	DTWSTEGSFVLDY	183
STLM333	STLH274	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	DVWSTEGSFVLDY	184
STLM332	STLH275	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVK	114	DIWSTEGSFVLDY	185

Фиг. 12

A

mAb	VH ID	Последовательность	SEQ ID NO:
STLM103	ST2H112	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFVWRQAPGKGLEWVSSIRGEGGRTDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	205
STLM107	ST2H52	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMFVWRQAPGKGLEWVSAIEGEGGETNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	186
STLM108	ST2H50	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYDMIVWRQAPGKGLEWVSTIKGEGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	187
STLM123	ST2H52	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMFVWRQAPGKGLEWVSAIEGEGGETNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	186
STLM124	ST2H50	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYDMIVWRQAPGKGLEWVSTIKGEGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	187
STLM206	ST2H232	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYDMIVWRQAPGKGLEWVSTIRGEGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	192
STLM207	ST2H228	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMIVWRQAPGKGLEWVSTIRGEGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	194
STLM208	ST2H257	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYDMIVWRQAPGKGLEWVSSIRGEGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	191
STLM209	ST2H231	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYDMIVWRQAPGKGLEWVSTIRGEGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	193
STLM210	ST2H318	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAMIVWRQAPGKGLEWVSIIGNGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	188
STLM211	ST2H316	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMIVWRQAPGKGLEWVSYIEGEGGETNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	189
STLM212	ST2H314	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYDMIVWRQAPGKGLEWVSTIRGEGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	190
STLM213	ST2H202	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYDMIVWRQAPGKGLEWVSTIRGEGGDTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	195
STLM214	ST2H179	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMFVWRQAPGKGLEWVSDIKCEGGRTAYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	196
STLM215	ST2H172	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMFVWRQAPGKGLEWVSAIAGEGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	198
STLM216	ST2H173	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMFVWRQAPGKGLEWVSDIKCEGGATNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	197
STLM217	ST2H163	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYDMFVWRQAPGKGLEWVSDIKGEGGETSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	199
STLM218	ST2H162	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVDSMFVWRQAPGKGLEWVSSIEGNGGATYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	200
STLM219	ST2H139	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMFVWRQAPGKGLEWVSDIIGGEGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	201
STLM220	ST2H137	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFVWRQAPGKGLEWVSDIRGEGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	202
STLM221	ST2H136	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYDMFVWRQAPGKGLEWVSYIRGEGGDTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	203
STLM222	ST2H129	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYDMFVWRQAPGKGLEWVSDIIGGEGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFVLDYWGQGLVTVSS	204

B

mAb	VH ID	Последовательность	SEQ ID NO:
STLM103	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM107	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSCTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM108	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM123	ST2L59	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSCTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYITAPLTFGQGTKVEIK	209
STLM124	ST2L59	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYITAPLTFGQGTKVEIK	209
STLM206	ST2L59	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYITAPLTFGQGTKVEIK	209
STLM207	ST2L59	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYITAPLTFGQGTKVEIK	209
STLM208	ST2L59	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYITAPLTFGQGTKVEIK	209
STLM209	ST2L59	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYITAPLTFGQGTKVEIK	209
STLM210	ST2L49	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSCTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYNDAITFGQGTKVEIK	208
STLM211	ST2L49	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYNDAITFGQGTKVEIK	208
STLM212	ST2L49	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSCTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYNDAITFGQGTKVEIK	208
STLM213	ST2L35	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIDAPLTFGQGTKVEIK	207
STLM214	ST2L35	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIDAPLTFGQGTKVEIK	207
STLM215	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM216	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM217	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM218	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM219	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM220	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM221	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM222	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206

Фиг. 13А-В

V_L:

1 2 3 4 5 6
 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
 >VL2494 ETTVTQSPASLSVATGKVKVTRCITNTDIDDVVIHWYQQKPGEPKLLISEGNTLRPGVPS
 Чотиа -----
 HFA -----

6 7 8 9 10
 1234567890123456789012345678901234567890123456
 >VL2494 RFSSSGYGTDFVFTIENTLSEVDADYVYCLQSDNMLTFGAGTKLELK
 Чотиа -----
 HFA -----

V_H:

1 2 3 4 5 6
 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345
 >VH2494 EVQLQSSVAELVLRPGASVKLSCTASAFNIKDDYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPAIGNTEYAKPKFQD
 Чотиа -----
 HFA -----

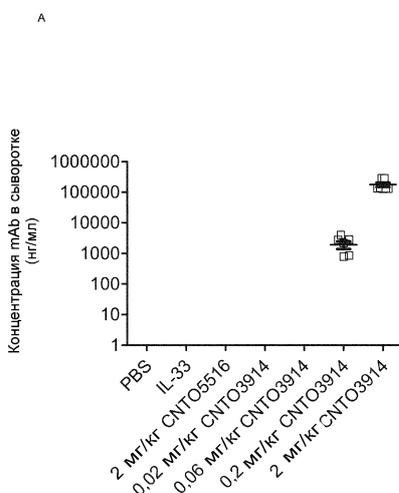
7 8 9 10 11
 678901234567890123456789012345678901234567890123456789012
 >VH2494 KATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCALGDFYAMDYWGQGTSTVTVSS
 Чотиа -----
 HFA -----

Фиг. 14

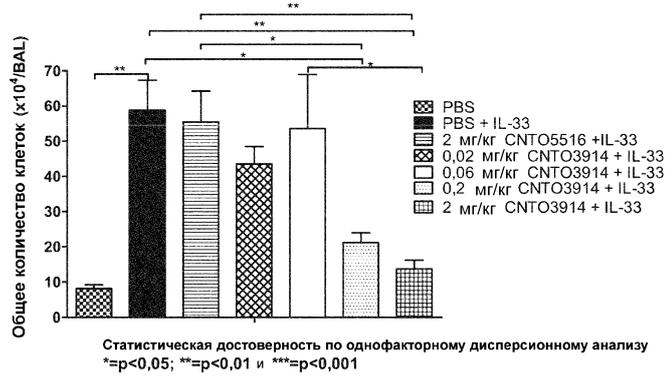
mAb	VL ID	VH ID	VL SEQ ID NO:	VH SEQ ID NO:	H-CDR1		H-CDR2		H-CDR3	
					Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
STLM226	STLL280	STLH201	142	145	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAEKFQG	28	GDFYAMAY	146
STLM227	STLL277	STLH201	140	145	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAEKFQG	28	GDFYAMAY	146
STLM228	STLL276	STLH201	139	145	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAEKFQG	28	GDFYAMAY	146
STLM229	STLL275	STLH201	138	145	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAEKFQG	28	GDFYAMAY	146
STLM230	STLL274	STLH201	137	145	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAEKFQG	28	GDFYAMAY	146
STLM231	STLL273	STLH201	136	145	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAEKFQG	28	GDFYAMAY	146
STLM232	STLL272	STLH201	135	145	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAEKFQG	28	GDFYAMAY	146

mAb	VL ID	VH ID	VL SEQ ID NO:	VH SEQ ID NO:	L-CDR1		L-CDR2		L-CDR3	
					Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
STLM226	STLL280	STLH201	142	145	ITNTDIDDVIH	36	EGNTRLP	40	LQSDNMLT	147
STLM227	STLL277	STLH201	140	145	ITNTDIDDVIH	36	EGNTRLP	40	LQSDNMLT	44
STLM228	STLL276	STLH201	139	145	ITNTDIDDVIH	36	EGNTRLP	40	LQSDNMLT	44
STLM229	STLL275	STLH201	138	145	ITNTDIDDVIH	36	EGNTRLP	40	LQSDNMLT	44
STLM230	STLL274	STLH201	137	145	ITNTDIDDVIH	36	EGNTRLP	40	LQSDNMLT	44
STLM231	STLL273	STLH201	136	145	ITNTDIDDVIH	36	EGNTRLP	40	LQSDNMLT	44
STLM232	STLL272	STLH201	135	145	ITNTDIDDVIH	36	EGNTRLP	40	LQSDNMLT	44

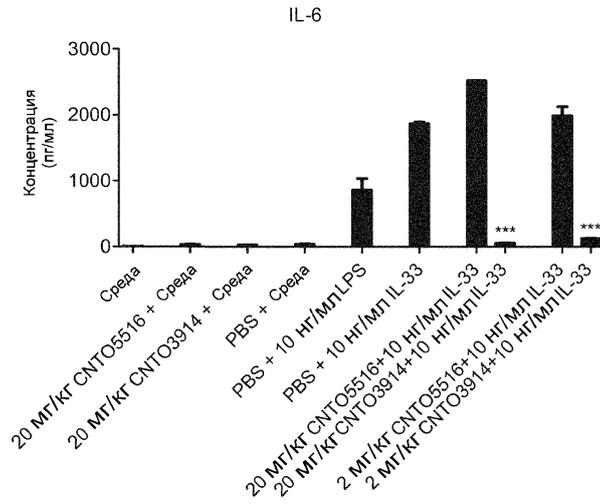
Фиг. 15



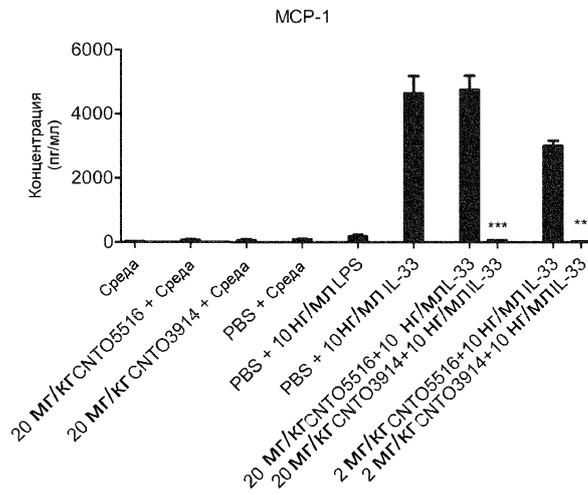
В



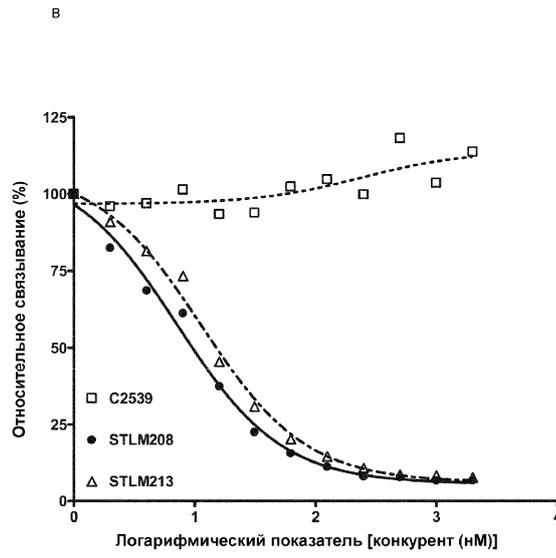
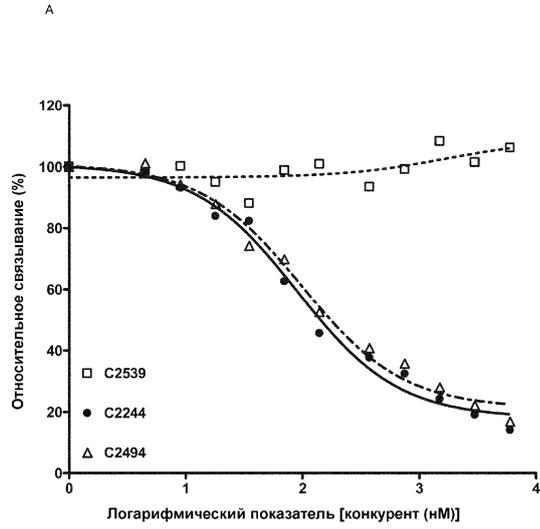
С



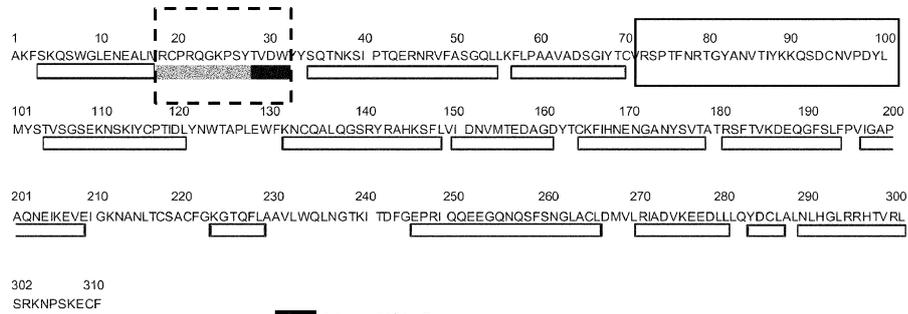
D



Фиг. 16А-D



Фиг. 17А-В



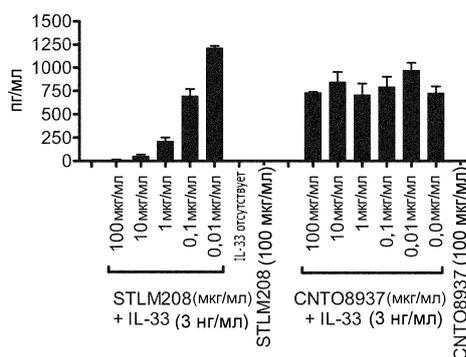
Фиг. 18

Вариант ST2L	Антитело					
	STLB206 (STLM208)			STLB252		
	К _{асс}	К _{дисс}	К _{дисс}	К _{асс}	К _{дисс}	К _{дисс}
	1/Мс	1/с	пмоль	1/Мс	1/с	пмоль
Дикий тип	1,14E+07	1,22E-04	10,8	8,85E+06	1,22E-04	13,8
¹⁸ AKF ₂₀ -->TEG	1,30E+07	2,29E-04	19,3	8,34E+06	1,93E-04	23,2
K ₅₅ E	1,26E+07	1,29E-04	10	1,07E+07	1,26E-04	11,8
E ₆₁ K	1,55E+07	1,26E-04	8,1	1,56E+07	1,21E-04	7,8
⁶⁹ GQL ₇₁ -->RDR	1,02E+07	9,27E-05	9,6	8,06E+06	9,36E-05	11,6
A ₇₈ R	1,24E+07	1,30E-04	10,4	1,08E+07	1,23E-04	11,4
A ₈₀ E	1,15E+07	1,27E-04	11	1,13E+07	1,39E-04	12,4
⁹³ TF ₉₄ -->NL	1,27E+07	6,25E-04	49,5	1,07E+07	5,22E-04	48,9
¹⁰⁸ QSD ₁₁₀ -->PPS	1,28E+07	1,19E-04	10	8,99E+06	1,17E-04	13

Фиг. 19

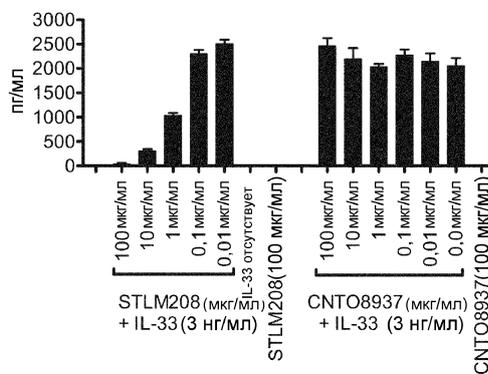
А

Первичные человеческие мастоциты легких
GM-CSF

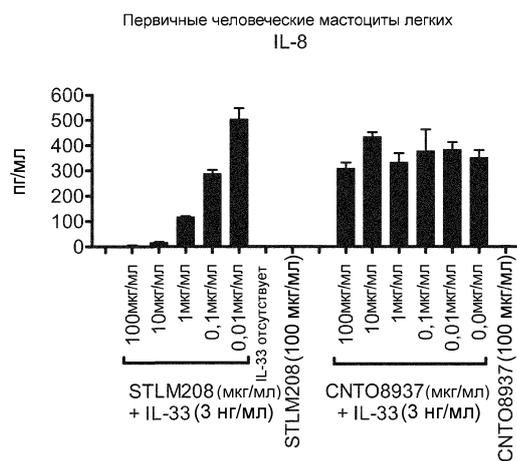


В

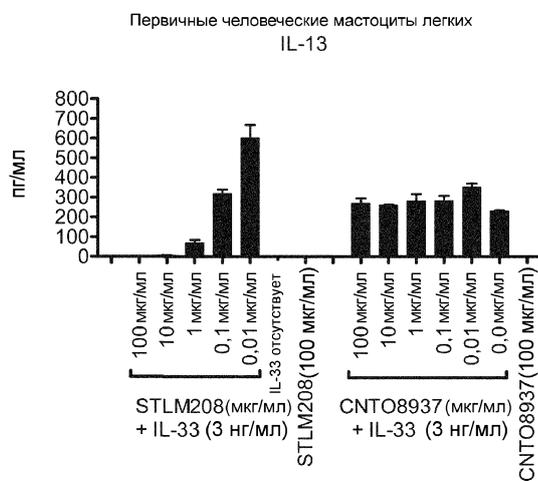
Первичные человеческие мастоциты легких
IL-5



с



d



Фиг. 20А-20D

