



УКРАЇНА

(19) **UA**
(51) МПК

(11) **127965**

(13) **C2**

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

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

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2019 07159	(72) Винахідник(и):	Оренго Джеймі М. (US), Аллінн Джинн (US), Мерфі Ендрю Дж. (US), Янкопулос Джордж Д. (US)
(22) Дата подання заявки:	30.11.2017	(73) Володілець (володільці):	РІДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК., 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	29.02.2024	(74) Представник:	Бреус Наталія Володимирівна, реєстр. №167
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/428,634, 62/473,738, 62/567,318	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	EP 3027015 A1, 08.06.2016 US 2014/271642 A1, 18.09.2014 US 2014/271658 A1, 18.09.2014 US 2009/074793 A1, 19.03.2009 Anonymous. Evaluation of SAR440340 and as Combination Therapy With Dupilumab in Moderate-to-Severe Asthma Patients - Full Text View - ClinicalTrials.gov. 01.01.2018 URL: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/ NCT03387852?sfpd_d=14 (дата звернення 15.06.2023)
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	01.12.2016, 20.03.2017, 03.10.2017		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	27.08.2019, Бюл.№ 16		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	28.02.2024, Бюл.№ 9		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2017/064041, 30.11.2017		

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ЗАПАЛЬНИХ СТАНІВ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу лікування запального захворювання або розладу дихальних шляхів або легень суб'єкта, лікування легеневого фіброзного захворювання або розладу у суб'єкта, або запобігання або зниження тяжкості алергічної реакції в дихальних шляхах або легенях суб'єкта, де спосіб включає введення суб'єкту, який потребує цього, однієї або більше доз терапевтично ефективної кількості антагоніста IL-33 в комбінації з однією або більше дозами терапевтично ефективної кількості антагоніста рецептора інтерлейкіну-4 (IL-4R).

UA 127965 C2

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Цей винахід відноситься до способів лікування запального стану, що включають введення суб'єкту, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості антагоніста інтерлейкіну-33 (ІЛ-33) окремо або в комбінації з антагоністом інтерлейкіну-4 (ІЛ-4). Більш конкретно, цей винахід стосується лікування запальних або обструктивних захворювань легень або розладів шляхом введення терапевтично ефективної кількості антитіла проти інтерлейкіну-33 (ІЛ-33) окремо або в комбінації з антитілом проти інтерлейкіну-4R (ІЛ-4Р).

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Запалення ініціюється хазяїном як захисна реакція, але часто може призводити до системних патологій. Кількість запальних захворювань легень, таких як астма, алергія та хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) зростає у розвинених країнах, що призводить до серйозних наслідків для витрат на охорону здоров'я. Деякі запальні клітини та їхні медіатори беруть участь у розвитку і прогресуванні цих захворювань. У деяких випадках ці захворювання відображають імунну відповідь 2 типу, яка характеризується інфільтрацією в тканини еозинофілів, базофілів, тучних клітин, CD4+Т хелперних клітин 2 типу (Th2), вроджених лімфоїдних клітин групи 2 (ILC2), макрофагів, індукованих інтерлейкіном 4 (ІЛ-4) та/або ІЛ-13, а також підвищенням сироваткового ІgЕ і збільшенням цитокінів ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-9 та ІЛ-13.

Один цитокін, який, як вважають, грає роль у запальних захворюваннях легень, є інтерлейкіном-33 (ІЛ -33), прозапальний цитокін, що вивільняється з пошкодженої епітеліальної тканини у відповідь на такі чинники, як алергени, віруси або дим. ІЛ -33 є членом родини інтерлейкіну-1 (ІЛ-1), який потужно стимулює продукцію цитокінів, асоційованих з Т-хелпером 2 типу (Th2) (наприклад, ІЛ-4). ІЛ-33 експресується великою кількістю типів клітин, включаючи фібробласти, тучні клітини, дендритні клітини, макрофаги, остеобласти, ендотеліальні клітини і епітеліальні клітини. Інтерлейкін-33 (ІЛ-33) є лігандом для ST2 (іноді його називають "пригніченням туморогенності 2"), члена супер-сімейства тол-подібного/інтерлейкін-1 рецептора, який зв'язується з акцесорним протеїном, IL-1RAcP ("акцесорний протеїн рецептора інтерлейкіну-1", для оглядів, див., напр., Kakkar and Lee, Nature Reviews – Drug Discovery 7 (10): 827-840 (2008), Schmitz et al., Immunity 23: 479-490 (2005); Liew et al., Nature Reviews – Immunology 10: 103-110 (2010); США 2010/0260770; США 2009/0041718). Після активації ST2/IL-1RAcP з допомогою ІЛ-33, сигнальний каскад ініціюється через молекули, що знаходяться нижче в каскадному ланцюгу, такі як MyD88 (мієлоїдний фактор диференціювання 88) і TRAF6 (фактор 6, асоційований з рецептором ФНП), що призводить до активації NFκB (ядерний фактор-κB), серед інших. Сигналінг ІЛ-33 задіяний як фактор у різних захворюваннях і розладах, включаючи запальні захворювання легень, розкриті в цьому документі. (Liew et al., Nature Reviews – Immunology 10:103-110 (2010)). Інгібітори сигналіngu ІЛ-33 описані, наприклад, в US9,453,072; US8187596; US2013/17373761; US2014/0212412; US2014/0271658; US2014/0271642; US2014/0004107, WO2015/099175; WO2015/106080; WO2011/031600; WO2014/164959; WO2014/152195; WO2013/165894; WO2013/173761; EP1725261; EP10815921A1; і EP2850103A2.

Інтерлейкін-4 (ІЛ-4, також відомий як фактор стимуляції В-клітин або BSF-1) також задіяний як ключовий цитокін, який керує алергічними і Т-хелперними клітинами типу 2 (Th2), поляризованими запальними процесами. Було показано, що ІЛ-4 має широкий спектр біологічних активностей, включаючи стимуляцію росту Т-клітин, тучних клітин, гранулоцитів, мегакаріоцитів і еритроцитів. ІЛ-4 індукує експресію молекул головного комплексу гістосумісності класу II в В-клітинах у стані спокою, і посилює секрецію ізотипів ІgЕ і ІgG1 стимульованими В-клітинами. Вказані біологічні активності ІЛ-4 опосередковуються специфічними рецепторами клітинної поверхні для ІЛ-4. Альфа-рецептор ІЛ-4 людини (hІЛ-4Р) (SEQ ID NO: 347) описаний, наприклад, у патентах США № 5599905, 5767065, і 5840869. Антитіла проти hІЛ-4Р описані в патентах США № 5717072, 7186809 і 7605237. Способи використання антитіл проти ІЛ-4Р описані в патентах США № 5714146; 5985280; 6716587 і 9290574.

Сучасні способи лікування запальних захворювань легень залишають значні можливості для поліпшення безпеки та ефективності у пацієнтів, які страждають, наприклад, від астми та хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ), особливо у зменшенні загострень. Незважаючи на доступність численних інгаляційних комбінацій протизапальних і бронхолітичних препаратів, багато пацієнтів продовжують відчувати загострення. Загострення можуть потребувати застосування системних кортикостероїдів, які є ефективними завдяки їх широкій імунонейтралізуючій здатності, але обтяжені небажаними побічними ефектами, включаючи втрату кісткової тканини та інфекцію. Деякі біологічні способи лікування, більшість з яких спрямовані на окремі імунні медіатори, знаходяться на завершальній стадії розробки для астми

і ХОЗЛ. Однак через складність запального оточення ці агенти, ймовірно, будуть обмежені у своєму застосуванні.

Відповідно, в цій галузі існує незадоволена потреба в нових комбінаціях терапій для лікування та/або попередження запальних захворювань легень, таких як описані в цьому документі.

КОРОТКЕ ВИКЛАДЕННЯ СУТІ ВИНАХОДУ

Згідно з певними аспектами цього винаходу, запропоновані способи лікування запального захворювання або розладу, або, щонайменше, одного симптому, пов'язаного з запальним захворюванням або розладом, вказаний спосіб включає введення суб'єкту, що потребує цього, однієї або більше доз терапевтично ефективної кількості антагоніста інтерлейкіну-33 (ІЛ-33) окремо або в комбінації з однією або кількома дозами терапевтично ефективної кількості антагоніста інтерлейкіну-4 (ІЛ-4) або фармацевтичної композиції, що містить антагоніст ІЛ-33 і антагоніст ІЛ-4α, пацієнту, який потребує цього. В одному варіанті реалізації цього винаходу введення антагоніста ІЛ-33 у комбінації з антагоністом ІЛ-4 призводить до підвищення терапевтичної ефективності порівняно з тією, що спостерігалась при введенні антагоніста тільки ІЛ-33 або антагоніста тільки ІЛ-4.

У деяких варіантах реалізації цього винаходу антагоністом ІЛ-33 є будь-який агент, здатний блокувати, послаблювати або іншим чином перешкоджати сигналіngu ІЛ-33 та/або взаємодії між ІЛ-33 і клітинним рецептором (напр. ST2) або ко-рецептором (напр. IL-1RAcP) або його комплексом. Будь-який з вищезазначених може блокувати або інгібувати щонайменше одну біологічну активність ІЛ-33.

У деяких варіантах реалізації цього винаходу антагоніст ІЛ-33 є антитілом, яке зв'язується з або взаємодіє з ІЛ-33 і блокує взаємодію ІЛ-33 з його рецептором ST2 і запобігає або інгібує взаємодію ST2 з ко-рецептором, ІЛ1-РАсР, або запобігає утворенню сигнального комплексу. В одному варіанті реалізації цього винаходу антагоніст ІЛ-33 є моноклональним антитілом, яке зв'язується з або специфічно взаємодіє з ІЛ-33 людини. В одному варіанті реалізації цього винаходу антагоніст ІЛ-33 є пасткою на основі рецептора, що зв'язується з або специфічно взаємодіє з ІЛ-33 людини.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-4 є антагоністом рецептора інтерлейкіну-4 (ІЛ-4Р).

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-4Р є будь-яким агентом, який зв'язується з або взаємодіє з ІЛ-4Рα або лігандом ІЛ-4Р, і інгібує або послаблює нормальну біологічну сигнальну функцію рецептора ІЛ-4 типу 1 та/або типу 2. В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-4Р є моноклональним антитілом, яке специфічно зв'язується з ІЛ-4Рα людини. В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-4Р є моноклональним антитілом, яке зв'язує ІЛ-4Рα і блокує опосередкований як ІЛ-4, так і ІЛ-13 сигналінг через рецептор типу І або типу ІІ. В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане моноклональне антитіло, яке специфічно зв'язується з ІЛ-4Рα людини і блокує опосередкований як ІЛ-4, так і ІЛ-13 сигналінг, є дупілумабом, або його біоеквівалентом. В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний спосіб лікування запального розладу або стану здійснюється шляхом застосування комбінації REGN3500, що має пару амінокислотних послідовностей SEQ SEQ ID NO: 274/282 варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга (HCVR/LCVR) і дупілумабу, що має пару амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR з SEQ SEQ ID NO: 337/338.

В одному варіанті реалізації цього винаходу, вказане запальне захворювання або розлад, що піддається лікуванню вказаними способами з цього винаходу, обране із групи, що складається з астми, хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ), синдрому перекриття астми і ХОЗЛ (ACOS), atopічного дерматиту, поліпів носа, алергічної реакції, хронічного бронхіту, емфіземи, хронічного риносинуситу з або без поліпів носа, запального захворювання кишечника, хвороби Крона, виразкового коліту, гіперчутливого пневмоніту, розсіяного склерозу, артрити (включаючи остеоартрит, ревматоїдний артрит, псоріатичний артрит), алергічного риніту, фіброзу, еозинофільного езофагіту, васкуліту, кропив'янки, синдрому Черджа-Стросса, запального болю і псоріазу.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказана астма є еозинофільною астмою.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказана астма є нееозинофільною астмою.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказана астма є алергічною астмою.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказана астма є неалергічною астмою.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказана астма є важкою рефрактерною астмою.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказана астма є стійкою до стероїдів астмою.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказана астма є чутливою до стероїдів астмою.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказана астма є стероїдною рефрактерною астмою.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказана астма є загостренням астми.

В одному варіанті реалізації цього винаходу, вказане запальне захворювання або розлад полегшується, або зменшується у тяжкості, тривалості або частоті виникнення, або щонайменше один симптом, пов'язаний з запальним захворюванням або розладом, полегшується, або зменшується по тяжкості, тривалості або частоті виникнення.

В одному варіанті реалізації цього винаходу введення терапевтично ефективної кількості однієї або більше доз антагоніста ІЛ-33 суб'єкту, що потребує цього, окремо, або в комбінації з однією або більше дозами терапевтично ефективної кількості антагоніста ІЛ-4Р призводить до підвищення терапевтичної ефективності, що вимірювалось за будь-яким одним або кількома з наступних параметрів:

зменшення частоти одного або більше з наступних: еозинофілі, активовані В-клітини, активовані CD8 Т-клітини або співвідношення CD4/CD8 Т-клітин у зразку тканини;

зменшення одного або більше з наступних: рівні інтерлейкіну-1 бета (ІЛ-1 β), інтерлейкіну-4 (ІЛ-4), інтерлейкіну-5 (ІЛ-5), інтерлейкіну-6 (ІЛ-6), інтерлейкіну-13 (ІЛ-13), хемоаттрактантного протеїна моноцитів-1 (MCP-1) або фактора некрозу пухлин альфа (ФНП α) у зразку тканини; або

зниження рівня експресії гена одного або декількох з наступних: ІІ4, ІІ5, ІІ6, ІІ9, ІІ13, ІІ1r11, ІІ13ra2, tnф, Tgfb1, Ccl2, Ccl11, Ccl24, Col15a1 або Col24a1 у зразку тканини.

В одному варіанті реалізації цього винаходу введення терапевтично ефективної кількості однієї або більше доз антагоніста ІЛ-33 суб'єкту, що потребує цього лікування, окремо, або в комбінації з однією або більше дозами терапевтично ефективної кількості антагоніста ІЛ-4Р призводить до підвищення терапевтичної ефективності, що далі вимірювалось за будь-яким одним або кількома з наступних параметрів:

d) зниження рівня сироваткового ІgЕ

e) зниження метаплазії келихоподібних клітин в легені;

f) поліпшення консолідації легені; або

g) зменшення субепітеліального фіброзу в легені.

В одному варіанті реалізації цього винаходу, зразок тканини отримують з легені.

В одному варіанті реалізації цього винаходу, вказаний зразок тканини обраний із групи, що складається з печінки, нирок, серця або цільної крові. У деяких варіантах реалізації цього винаходу, для вимірювання одного або більше вказаних вище параметрів можуть бути використані клітини крові, сироватка або плазма.

В одному варіанті реалізації цього винаходу, вказане хронічне обструктивне захворювання легень, яке піддається лікуванню вказаними способами цього винаходу, ускладнене одним або декількома з наступних: астма, вірусне захворювання, бактеріальна інфекція, експозиція до алергену, експозиція до хімічної речовини або хімічних парів або експозиція до подразника з навколишнього середовища або забруднення повітря.

У спорідненому варіанті реалізації цього винаходу астма, що піддається лікуванню вказаними способами з цього винаходу, ускладнена одним або декількома з наступних: вірусне захворювання, бактеріальна інфекція, експозиція до алергену, експозиція до хімічної речовини або хімічних парів, або експозиція до подразника з навколишнього середовища або забруднення повітря.

У певному варіанті реалізації цього винаходу астма, що піддається лікуванню вказаними способами цього винаходу, обрана з групи, що складається з еозинофільної астми, нееозинофільної астми, астми, стійкої до стероїдів і астми, чутливої до стероїдів.

В одному варіанті реалізації цього винаходу, хронічне обструктивне захворювання легень, яке піддається лікуванню вказаними способами цього винаходу, виникло в результаті або частково ускладнене сигаретним димом.

В одному варіанті реалізації цього винаходу, у пацієнтів, які страждають на хронічне обструктивне захворювання легень, що піддається лікуванню вказаними способами цього винаходу, може або не може виявлятися збільшення кількості еозинофілів.

В одному варіанті реалізації цього винаходу, у пацієнтів, які страждають на синдром перекриття астми і ХОЗЛ (ACOS), що піддається лікуванню вказаними способами цього винаходу, може або не може виявлятися збільшення кількості еозинофілів.

Другий аспект цього винаходу пропонує лікування запального захворювання або розладу, або щонайменше одного симптому, пов'язаного з запальним захворюванням або розладом, шляхом введення ефективної кількості одного або більше додаткових терапевтичних агентів, ефективних для полегшення вказаного запального захворювання або розладу, або щонайменше одного симптому вказаного запального захворювання або розладу в поєднанні з

терапевтично ефективною кількістю антагоніста інтерлейкіну-33 (ІЛ-33), напр. антитіла проти ІЛ-33 або пастки ІЛ-33 і терапевтично ефективною кількістю антагоніста інтерлейкіну-4 (ІЛ-4), напр. антитіла проти ІЛ-4Р, такого як дупілумаб, або його терапевтичного еквіваленту.

В одному варіанті реалізації цього винаходу один або більше додаткових терапевтичних агентів обрані із групи, що складається з нестероїдного протизапального засобу (НПЗП), кортикостероїду (напр. інгаляційний кортикостероїд або ICS), β_2 адренергічного агоніста тривалої дії (LABA), мускаринового антагоніста тривалої дії (LAMA), бронходилататора, антигістаміну, епінефрину, деконгестанту, антагоніста стромального лімфопоетину тимусу (TSLP), антагоніста ІЛ-1, антагоніста ІЛ-8, антагоніста ІЛ-13, іншого антагоніста ІЛ-4, подвійного антагоніста ІЛ-4/ІЛ-13, подвійного антагоніста ІЛ-33/ІЛ-13, антагоніста ІЛ-5, антагоніста ІЛ-6, антагоніста ІЛ-12/23, антагоніста ІЛ-22, антагоніста ІЛ-25, антагоніста ІЛ-17, антагоніста ІЛ-31, інгібітора ФНП, інгібітора ІgE, інгібітора лейкотрієну, перорального інгібітора PDE4, метилксантину, недокроміла натрію, кромоліна натрію, агоніста бета 2 тривалої дії та іншого антагоніста ІЛ-33 (напр. іншого антитіла проти ІЛ-33, іншої пастки на основі рецептора ІЛ-33, антагоніста ST2, включаючи антитіло проти ST2, або розчинного рецептора ST2, або антагоніста до іншого рецептора ІЛ-33, відмінного від ST2, або ІЛ-антагоніста 1RacP, включаючи антитіло проти ІЛ-1RacP, або антитіло, яке взаємодіє з комплексом ІЛ-33/ST2).

У деяких варіантах реалізації цей винахід пропонує способи лікування хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) від середнього до високого ступеня тяжкості, що включає одночасне введення антагоніста ІЛ-4Р (напр. дупілумаб) і антагоніста ІЛ-33 (напр. REGN3500), крім фонові терапії, включаючи, наприклад, інгаляційний кортикостероїд (ICS) та/або β_2 адренергічний агоніст тривалої дії (LABA) та/або мускариновий антагоніст тривалої дії (LAMA).

У певних варіантах реалізації цей винахід пропонує способи зниження частоти явищ "втрати контролю астми" (LOAC), що включають лікування пацієнтів, які страждають на астму антагоністом ІЛ-4Р (напр. дупілумабом) у комбінації з антагоністом ІЛ-33 (напр. REGN3500). У деяких варіантах реалізації цього винаходу, вказане комбіноване застосування антагоніста ІЛ-4Р в комбінації з антагоністом ІЛ-33 забезпечує більш ефективний результат, ніж введення окремо антагоніста ІЛ-4Р або окремо антагоніста ІЛ-33.

У спорідненому варіанті реалізації цього винаходу введення вказаного антагоніста ІЛ-33 у комбінації з антагоністом ІЛ-4Р призводить до збільшення імунної відповіді типу 1 та/або зниження імунної відповіді типу 2, викликаного захворюванням, збудником захворювання або алергією.

Третій аспект цього винаходу пропонує спосіб лікування фіброзного захворювання або розладу, або, щонайменше, одного симптому, пов'язаного з фіброзним захворюванням або розладом, вказаний спосіб включає введення комбінації антагоніста ІЛ-33 (антитіла проти ІЛ-33 або пастки ІЛ-33), який специфічно зв'язується з ІЛ-33, і антитіла, яке специфічно зв'язується з ІЛ-4Р α або його антиген-зв'язуючого фрагмента, або фармацевтичної композиції, що містить антагоніст ІЛ-33 і антагоніст ІЛ-4 α , пацієнту, який потребує цього лікування, причому вказане фіброзне захворювання або розлад полегшується або зменшується у тяжкості або тривалості, або щонайменше один симптом, пов'язаний з фіброзним захворюванням або розладом, полегшується, або зменшується в тяжкості, тривалості або частоті виникнення. В одному варіанті реалізації цього винаходу лікування вказаного фіброзного захворювання антагоністом ІЛ-33 в комбінації з антагоністом ІЛ-4Р може призводити до відновлення фіброзної тканини до її нормального стану.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказані фіброзні захворювання або порушення, які піддаються лікуванню шляхом введення анти-ІЛ-33 і ІЛ-4Р антагоністів цього винаходу, таких як антитіла проти ІЛ-33 або ІЛ-33 пастки в комбінації з антитілами проти ІЛ-4Р α , описані в цьому документі, включають фіброз легень (напр. ідіопатичний фіброз легень, індукований блеоміцином фіброз легень, індукований азбестом фіброз легень і облітеруючий бронхіолітичний синдром), хронічну астму, фіброз, пов'язаний з гострим пошкодженням легень і гострою респіраторною недостатністю (напр., фіброз, індукований бактеріальною пневмонією, фіброз, індукований травмою, фіброз, індукований вірусною пневмонією, фіброз, індукований штучною вентиляцією легень, фіброз, індукований не-легеневим сепсисом, фіброз, індукований аспірацією), силікоз, фіброз, індукований опроміненням, хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ, яке може або не може бути пов'язаним з, частково спричиненим, або бути наслідком впливу активного чи пасивного куріння), склеродермія, очний фіброз, фіброз шкіри (напр. склеродермія), фіброз печінки (напр. цироз, індукований алкоголем, фіброз печінки, неалкогольний стеатогепатит (NASH), пошкодження жовчних протоків, первинний біліарний цироз печінки, фіброз печінки, індукований інфекцією або вірусом, аутоімунний гепатит, фіброз

нирок (нирковий), фіброз серця, атеросклероз, рестеноз стента і мієлофіброз.

Четвертий аспект цього винаходу пропонує спосіб попередження або зменшення тяжкості алергічної відповіді, вказаний спосіб включає введення однієї або більше доз терапевтично ефективної кількості антагоніста ІЛ-33 в комбінації з однією або більше доз терапевтично ефективної кількості антагоніста ІЛ-4Р суб'єкту, що потребує цього лікування, причому введення вказаної комбінації призводить до підвищення терапевтичної ефективності для попередження або зменшення тяжкості алергічної відповіді порівняно з тим, що спостерігається при введенні окремо антагоніста ІЛ-33 або окремо антагоніста ІЛ-4Р. Суб'єкт, який отримувач антагоніст ІЛ-33 в комбінації з антагоністом ІЛ-4Р, може демонструвати знижену чутливість до або зменшену алергічну реакцію на алерген, або не відчувати будь-якої чутливості або алергічної реакції на або анафілактичної реакції на алерген після введення вказаної комбінації антагоніста ІЛ-33 і антагоніста ІЛ-4Р або композиції, що містить вказані антагоністи.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-33 для застосування у вказаних способах цього винаходу є моноклональним антитілом або його антигензв'язуючим фрагментом, який зв'язується з або специфічно взаємодіє з ІЛ-33 людини. Вказане антитіло проти ІЛ-33 або його антиген зв'язуючий фрагмент може блокувати взаємодію ІЛ-33 і ST2, або може забезпечувати низьку афінність зв'язування ІЛ-33 з рецептором ST2. При цьому ST2 може усуватись від взаємодії з ІЛ-1RacP. Таким чином, вказані антитіла проти ІЛ-33 цього винаходу, є ефективними зокрема для інгібування опосередкованого ІЛ-33 сигналіну і для лікування захворювань і розладів, викликаних або пов'язаних з активністю та/або сигналіном ІЛ-33.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло проти ІЛ-33 або його антигензв'язуючий фрагмент знижує частоту одного або більше з наступних: еозинофіли, CD4+ Т-клітини, В-клітини, ST2+/CD4+ клітини в популяції Т-клітин або зменшує співвідношення Т-клітин CD4/CD8 у легенях при введенні ссавцю, що має індуковане алергеном запалення легень.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло проти ІЛ-33 або його антигензв'язуючий фрагмент знижує рівень експресії одного або більше з наступних: ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-9, ІЛ-13, Ccl2, Ccl11 Ccl24 або MCP-1 в легенях при введенні ссавцю, що має алерген-індуковане запалення легень.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло до ІЛ-33 або його антигензв'язуючий фрагмент знижує рівні сироваткового IgE, метаплазію келихоподібних клітин або товщину епітеліального колагену в легенях при введенні ссавцю, що має індуковане алергеном запалення легень.

У деяких варіантах реалізації цього винаходу вказані антитіла проти ІЛ-33, які специфічно зв'язуються з ІЛ-33 людини, або їх антиген-зв'язуючі фрагменти, які можуть бути використані у вказаних способах цього винаходу, включають три CDR важкого ланцюга (HCDR1, HCDR2 і HCDR3), що містять в варіабельній ділянці важкого ланцюга (HCVR) амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 і 308; і включає три CDR легкого ланцюга (LCDR1, LCDR2 і LCDR3), що містять на варіабельній ділянці легкого ланцюга (LCVR) амінокислотні послідовності, обрані з групи, що складається з SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 і 316.

У деяких варіантах реалізації цього винаходу вказані антитіла проти ІЛ-33, які специфічно зв'язуються з ІЛ-33 людини, або їх антиген-зв'язуючі фрагменти, які можуть бути використані у вказаних способах цього винаходу, містять варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 і 308, або суттєво подібну до них послідовність, що має, щонайменше, 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу, анти-ІЛ-33 антитіла або їх антиген зв'язуючі фрагменти для застосування у вказаних способах цього винаходу включають варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 і 316, або суттєво подібну до них послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу, анти-ІЛ-33 антитіла або їх антигензв'язуючі фрагменти для застосування у вказаних способах цього винаходу містять пару послідовностей HCVR і LCVR (HCVR/LCVR), обрану з групи, що складається SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 і 308/316.

Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу антитіла проти ІЛ-33 або їх антиген зв'язуючі фрагменти для застосування у вказаних способах цього винаходу включають домен CDR3 важкого ланцюга (HCDR3), що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296 і 314 або суттєво подібну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; і домен CDR3 легкого ланцюга (LCDR3), що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304 і 322, або суттєво подібну їй послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу вказані антитіла проти ІЛ-33 або їх антиген-зв'язуючі фрагменти для застосування у вказаних способах цього винаходу включають пару амінокислотних послідовностей HCDR3/LCDR3, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 8/16, 24/32, 40/48, 56/64, 72/80, 88/96, 104/112, 120/128, 136/144, 152/160, 168/176, 184/192, 200/208, 216/224, 232/240, 248/256, 264/272, 280/288, 296/304 і 314/322.

Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу, вказані анти-ІЛ-33 антитіла або їх антиген зв'язуючі фрагменти для застосування у вказаних способах цього винаходу додатково містять домен CDR1 важкого ланцюга (HCDR1), що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292 і 310, або суттєво аналогічну їм послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; домен CDR2 важкого ланцюга (HCDR2), що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294 і 312 або суттєво аналогічну їм послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; домен CDR1 (LCDR1) легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300 і 318 або суттєво аналогічну їм послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності; і домен CDR2 легкого ланцюга (LCDR2), що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302 і 320, або суттєво подібну до них послідовність, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичності послідовності.

Деякі необмежуючі, ілюстративні анти-ІЛ-33 антитіла і антиген-зв'язуючі фрагменти, які можуть бути використані у вказаних способах цього винаходу, включають HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 домени, відповідно, мають амінокислотні послідовності, вибрані з група, що складається з: SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 (напр. H1M9559N); 20-22-24-28-30-32 (напр. H1M9566N); 36-38-40-44-46-48 (напр. H1M9568N); 52-54-56-60-62-64 (напр. H4H9629P); 68-70-72-76-78-80 (напр. H4H9633P); 84-86-88-92-94-96 (напр. H4H9640P); 100-102-104-108-110-112 (напр. H4H9659P); 116-118-120-124-126-128 (напр. H4H9660P); 132-134-136-140-142-144 (напр. H4H9662P); 148-150-152-156-158-160 (напр. H4H9663P); 164-166-168-172-174-176 (напр. H4H9664P); 180-182-184-188-190-192 (напр. H4H9665P); 196-198-200-204-206-208 (напр. H4H9666P); 212-214-216-220-222-224 (напр. H4H9667P); 228-230-232-236-238-240 (напр. H4H9670P); 244-246-248-252-254-256 (напр. H4H9671P); 260-262-264-268-270-272 (напр. H4H9672P); 276-278-280-284-286-288 (напр. H4H9675P); 292-294-296-300-302-304 (напр. H4H9676P); і 310-312-314-318-320-322 (H1M9565N).

Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу анти-ІЛ-33 антитіла або їх антиген зв'язуючі фрагменти для застосування у вказаних способах цього винаходу, наприклад, для лікування запальних станів, включають CDR домени важкого і легкого ланцюга (HCVR/LCVR), вибраних з групи, що складається з SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 і 308/316. Способи і методи для ідентифікації CDR в амінокислотних послідовностях HCVR і LCVR добре відомі в цій галузі і можуть бути використані для ідентифікації CDR в межах зазначених амінокислотних послідовностей HCVR та/або LCVR, описані в цьому документі. Типові угоди, які можуть бути застосовані для ідентифікації меж CDR, включають, напр., визначення за Кабат, визначення за Чотіа та визначення за AbM. Загалом, визначення за Кабат базується на варіабельності послідовності, визначення за Чотіа базується на розташуванні структурних ділянок петлі, а визначення за AbM є компромісом між підходами Кабат та Чотіа. Див., напр., Кабат, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health,

Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); і Мартін та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Публічні бази даних також доступні для ідентифікації послідовностей CDR в антитілі.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло до ІЛ-33 або антиген-зв'язуючий фрагмент для використання у вказаних способах цього винаходу включає пару амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR CDR важкого і легкого ланцюга з SEQ ID NO: 274/282.

У спорідненому варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло до ІЛ-33 або антиген-зв'язуючий фрагмент для використання у вказаному способі цього винаходу включає домени HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, відповідно, з SEQ ID NO: 276-278-280-284-286-288.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло, яке специфічно зв'язує інтерлейкін-33 (ІЛ-33) людини, або антиген-зв'язуючий фрагмент для використання у вказаних способах цього винаходу включає: (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 274; і (b) варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 282.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло до ІЛ-33 або антиген-зв'язуючий фрагмент для використання у вказаних способах цього винаходу включає пару амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR з SEQ ID NO: 274/282.

В одному варіанті реалізації цього винаходу, вказане антитіло проти ІЛ-33 або його антиген зв'язуючий фрагмент для застосування у вказаних способах цього винаходу взаємодіє з амінокислотною послідовністю, яка знаходиться починаючи приблизно від положення 1 до приблизно положення 12 з SEQ ID NO: 349, та/або амінокислотною послідовністю, яка знаходиться починаючи приблизно від положення 50 до приблизно положення 94 з SEQ ID NO: 349, як визначено за допомогою водень-дейтерієвого обміну.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло до ІЛ-33 або його антиген-зв'язуючий фрагмент для застосування у вказаних способах цього винаходу взаємодіє з амінокислотною послідовністю, яка знаходиться починаючи від приблизно положення 112 до приблизно положення 123 з SEQ ID NO: 348, та/або амінокислотною послідовністю починаючи від приблизно положення 161 до приблизно положення 205 з SEQ ID NO: 348, як визначено за допомогою водень-дейтерієвого обміну.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло до ІЛ-33 або його антиген-зв'язуючий фрагмент для застосування у вказаних способах цього винаходу взаємодіє або з амінокислотною послідовністю з SEQ ID NO: 350, або з амінокислотною послідовністю з SEQ ID NO: 351, або взаємодіє з обома з SEQ ID NO: 350 і 351, як визначено за допомогою водень-дейтерієвого обміну.

В одному варіанті реалізації цього винаходу, вказане антитіло до ІЛ-33 або його антиген зв'язуючий фрагмент для застосування у вказаних способах цього винаходу конкурує за зв'язування з ІЛ-33 з еталонним антитілом, що містить пару амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR з SEQ ID NO: 274/282.

В одному варіанті реалізації цього винаходу, вказане антитіло до ІЛ-33 або його антиген-зв'язуючий фрагмент для застосування у вказаних способах цього винаходу зв'язується з тим же епітопом на ІЛ-33, що і еталонне антитіло, яке містить пару амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR з SEQ ID NO: 274/282.

У п'ятому аспекті цей винахід пропонує молекули нуклеїнової кислоти, що кодують вказані антитіла проти ІЛ-33 або їх антиген зв'язуючі фрагменти для використання у вказаних способах цього винаходу. Рекombінантні вектори експресії, що несуть вказані нуклеїнові кислоти цього винаходу, і клітини-хазяїни, в які були введені такі вектори, також охоплені цим винаходом, а також вказані способи отримання вказаних антитіл шляхом культивування клітин-хазяїв в умовах, що дозволяють продукувати антитіла, і відновлювати продуковані антитіла.

В одному варіанті реалізації цей винахід пропонує способи застосування антитіла або його фрагмента, що специфічно зв'язується з ІЛ-33 людини, що включає HCVR, кодований послідовністю нуклеїнової кислоти, обраною з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 і 307 або суттєво ідентичною послідовністю, що має, щонайменше, 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 %, або щонайменше 99 % гомології з нею.

Цей винахід також пропонує способи застосування антитіла або його фрагмента, який специфічно зв'язується з ІЛ-33 людини, що містить LCVR, кодовану послідовністю нуклеїнової кислоти, обраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297 і 315 або по суттєво ідентичною послідовністю, що

має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 %, або щонайменше 99 % гомології з нею.

Цей винахід також пропонує способи застосування антитіла або антиген-зв'язуючого фрагмента антитіла, що специфічно зв'язується з ІЛ-33 людини, що включає домен HCDR3, кодований нуклеотидною послідовністю, обраною з групи, що складається з ID NO: 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 215, 231, 247, 263, 279, 295 і 313 або суттєво ідентичною послідовністю, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % гомології з нею; домен LCDR3, кодований нуклеотидною послідовністю, обраною з групи, що складається з SEQ ID NO: 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 223, 239, 255, 271, 287, 303 і 321, або суттєво ідентичною послідовністю, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 %, або щонайменше 99 % гомології з нею.

Цей винахід також пропонує способи застосування антитіла або його фрагмента, який специфічно зв'язується з ІЛ-33 людини, що додатково містить домен HCDR1, кодований нуклеотидною послідовністю, обраною з групи, що складається з SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 211, 227, 243, 259, 275, 291 і 309, або суттєво ідентичною послідовністю, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 %, або щонайменше 99 % гомології з нею; домен HCDR2, кодований нуклеотидною послідовністю, обраною з групи, що складається з SEQ ID NO: 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 213, 229, 245, 261, 277, 293 і 311, або суттєво ідентичною послідовністю, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 %, або щонайменше 99 % гомології з нею; домен LCDR1, кодований нуклеотидною послідовністю, обраною з групи, що складається з SEQ ID NO: 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 203, 219, 235, 251, 267, 283, 299 і 317, або суттєво ідентичною послідовністю, що має, принаймні, 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 %, або щонайменше 99 % гомології з нею; домен LCDR2, кодований нуклеотидною послідовністю, обраною з групи, що складається з SEQ ID NO: 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 221, 237, 253, 269, 285, 301 і 319 або суттєво ідентичною послідовністю, що має щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 %, або щонайменше 99 % гомології з нею.

Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу, вказані способи цього винаходу пропонують застосування антитіла або його фрагмента, що специфічно зв'язується з ІЛ-33 людини, який містить CDR послідовності важкого і легкого ланцюга, кодовані послідовностями нуклеїнової кислоти з SEQ ID NO: 1 і 9 (напр. H1M9559N), 17 і 25 (напр. H1M9566N), 33 і 41 (напр. H1M9568N), 49 і 57 (напр. H4H9629P), 65 і 73 (напр. H4H9633P), 81 і 89 (напр. H4H9640P), 97 і 105 (напр. H4H9659P), 113 і 121 (напр. H4H9660P), 129 і 137 (напр. H4H9662P), 145 і 153 (напр. H4H9663P), 161 і 169 (напр. H4H9664P), 177 і 185 (напр. H4H9665P), 193 і 201 (напр. H4H9666P), 209 і 217 (напр. H4H9667P), 225 і 233 (напр. H4H9670P), 241 і 249 (напр. H4H9671P), 257 і 265 (напр. H4H9672P), 273 і 281 (напр. H4H9675P), 289 і 297 (напр. H4H9676P), або 307 і 315 (H1M9565N).

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-33 для застосування в способах цього винаходу є пасткою на основі рецептора ІЛ-33, такою як описана в цьому документі (див. Фіг. 1).

В одному варіанті реалізації цього винаходу пастка на основі рецептора ІЛ-33 включає в себе перший ІЛ-33 зв'язуючий домен (D1), приєднаний до домену мультимеризації (M), причому D1 містить ІЛ-33-зв'язуючу ділянку протеїна ST2.

В одному варіанті реалізації цього винаходу пастка ІЛ-33 для застосування у вказаних способах цього винаходу додатково містить другий ІЛ-33 зв'язуючий домен (D2), приєднаний до D1 та/або M, причому D2 включає позаклітинні частини білка IL-1RAcP. В одному варіанті реалізації цього винаходу D1 приєднаний до N-кінця M. В одному варіанті реалізації цього винаходу D2 приєднаний до N-кінця M. В одному варіанті реалізації цього винаходу D1 приєднаний до N-кінця D2, причому D2 приєднаний до N-кінця M.

В одному варіанті реалізації цього винаходу D1 включає послідовність амінокислот з SEQ ID NO: 328 або 329 або амінокислотну послідовність, що має щонайменше 90 % ідентичності з нею. В одному варіанті реалізації цього винаходу D2 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 330 або 331 або амінокислотну послідовність, що має щонайменше 90 % ідентичності до неї.

В одному варіанті реалізації цього винаходу антагоніст ІЛ-33 для застосування у вказаних способах цього винаходу включає перший зв'язуючий домен ІЛ-33 (D1), приєднаний до першого

домену мультимеризації (M1), і другий ІЛ-33 зв'язуючий домен (D2), приєднаний до другого домену мультимеризації (M2), причому домени D1 та/або D2 містять ІЛ-33-зв'язуючу частину рецептора, вибраного з групи, що складається з ST2 і IL-1RAcP.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-33 для застосування у вказаних способах цього винаходу включає третій ІЛ-33-зв'язуючий домен (D3), приєднаний до D1 або M1, причому D3 містить ІЛ-33-зв'язуючу частину рецептора, вибраного з групи, що складається з ST2 і IL-1RAcP.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-33 для застосування у вказаних способах цього винаходу включає четвертий ІЛ-33-зв'язуючий домен (D4), приєднаний до D2 або M2, причому D4 містить ІЛ-33-зв'язуючу частину рецептора, вибраного з групи, що складається з ST2 і IL-1RAcP.

В одному варіанті реалізації цього винаходу D1 приєднаний до N-кінця M1, і D2 приєднаний до N-кінця M2.

В одному варіанті реалізації цього винаходу D3 приєднаний до N-кінця D1.

В одному варіанті реалізації цього винаходу D3 приєднаний до C-кінця M1.

В одному варіанті реалізації цього винаходу D4 приєднаний до N-кінця D2.

В одному варіанті реалізації цього винаходу D4 приєднаний до C-кінця M2.

В одному варіанті реалізації цього винаходу D3 приєднаний до N-кінця D1, і D1 приєднаний до N-кінця M1; і причому D4 приєднаний до N-кінця D2, і D2 приєднаний до N-кінця M2.

В одному варіанті реалізації цього винаходу D3 є ідентичним або суттєво ідентичним до D4 і причому D1 є ідентичним або суттєво ідентичним до D2.

В одному варіанті реалізації цього винаходу і D3 і D4 включають ІЛ-33-зв'язуючу частину ST2 протеїну; причому і D1 і D2 включають позаклітинну частину протеїну IL-1RAcP.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказана пастка ІЛ-33 для застосування у вказаних способах цього винаходу включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 323, 324, 325, 326 і 327.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-4 для застосування у вказаних способах цього винаходу є антагоністом рецептора інтерлейкіну-4 (ІЛ-4Р).

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-4Р для застосування у вказаних способах цього винаходу є антитілом або його антиген зв'язуючим фрагментом, який зв'язує ІЛ-4Р α і перешкоджає взаємодії ІЛ-4 та/або ІЛ-13 з рецептором ІЛ-4 типу 1 або 2 типу.

В спорідненому варіанті реалізації цього винаходу, вказане антитіло до ІЛ-4Р або його антиген зв'язуючий фрагмент для застосування у вказаних способах цього винаходу перешкоджає взаємодії ІЛ-4 та/або ІЛ-13 з рецепторами ІЛ-4 обох типів 1 і 2.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-4Р для застосування у вказаних способах цього винаходу є моноклональним антитілом, яке специфічно зв'язується з ІЛ-4Р α .

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане моноклональне антитіло, яке специфічно зв'язується з ІЛ-4Р α людини для застосування у вказаних способах цього винаходу є дупілумабом або його біоеквівалентом.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло проти ІЛ-4Р або його антиген-зв'язуючий фрагмент для застосування у вказаних способах цього винаходу включає ділянки, які визначають комплементарність важкого ланцюга (HCDRs) варіабельної ділянки важкого ланцюга (HCVR), які включають амінокислоту послідовність з SEQ ID NO: 335 або SEQ ID NO: 337; і ділянки, які визначають комплементарність легкого ланцюга (LCDR) варіабельної ділянки легкого ланцюга (LCVR), які містять амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 336 або SEQ ID NO: 338.

У спорідненому варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло проти ІЛ-4Р або його антиген-зв'язуючий фрагмент для застосування у вказаних способах цього винаходу включає три HCDR (HCDR1, HCDR2 і HCDR3) і три LCDR (LCDR1, LCDR2 і LCDR3), причому HCDR1 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 339, HCDR2 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 340; HCDR3 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 341; LCDR1 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 342; LCDR2 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 343; LCDR3 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 344.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло проти ІЛ-4 або його антиген-зв'язуючий фрагмент для застосування у вказаних способах цього винаходу включає HCVR, що включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 335 або SEQ ID NO: 337, та LCVR, що включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 336 або SEQ ID NO: 338.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло проти ІЛ-4Р або його антиген-зв'язуючий фрагмент для використання у вказаних способах цього винаходу включає пару

амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR з SEQ ID NO: 335/336 або SEQ ID NO: 337/338.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-4Р для застосування у вказаних способах цього винаходу є дупілумабом (SEQ ID NO: 337/338), або його біоеквівалентом.

5 У деяких варіантах реалізації цього винаходу, вказаний антагоніст ІЛ-33 і антагоніст ІЛ-4Р вводяться в окремих формуляціях.

У деяких варіантах реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-33 і вказаний антагоніст ІЛ-4Р комбінуються для введення пацієнту, який потребує цього лікування.

10 У деяких варіантах реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-33 і антагоніст ІЛ-4Р вводять суб'єкту підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньом'язово або інтраназально.

Вказані антитіла ІЛ-33 і ІЛ-4Р цього винаходу можуть бути повнорозмірними (наприклад, антитілом IgG1 або IgG4) або можуть включати тільки антиген-зв'язуючу частину (наприклад, Fab, F(ab')₂ або фрагмент scFv), і можуть бути модифікованими для зміни функціональності, наприклад, для видалення залишкових ефекторних функцій (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164: 15 1925-1933).

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказані антитіла, які специфічно зв'язуються з інтерлейкіном-33 людини, або ІЛ-4Р людини, є виділеними повністю людськими моноклональними антитілами.

20 У шостому аспекті цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, що включає рекомбінантне антитіло людини або його фрагмент, або пастку, яка специфічно зв'язує ІЛ-33, або антитіло, яке специфічно зв'язує ІЛ-4Р і фармацевтично прийнятний носій. У спорідненому аспекті цей винахід стосується композиції, яка є комбінацією анти-ІЛ-33 антитіла або ІЛ-33 пастки, або антитіла, яке специфічно зв'язує ІЛ-4Р і один або більше додаткових терапевтичних агентів. В одному варіанті реалізації цього винаходу, одним або декількома додатковими 25 терапевтичними агентами є будь-який агент, який ефективно комбінується з антагоністом ІЛ-33 або антагоністом ІЛ-4Р або з ними обома. Типові агенти, які можуть бути ефективними у поєднанні з антагоністом ІЛ-33 та/або антагоністом ІЛ-4Р, включають без обмеження інші агенти, які інгібують активність ІЛ-33 та/або активність ІЛ-4 (включаючи інші антитіла або їх антиген зв'язуючі фрагменти, пептидні інгібітори, низькомолекулярні антагоністи тощо) та/або 30 агенти, які безпосередньо не зв'язують ІЛ-33 або ІЛ-4 або ІЛ-4Р, але тим не менш перешкоджають, блокують або послаблюють сигналінг ІЛ-33 або ІЛ-4. В одному варіанті реалізації цього винаходу один або більше додаткових терапевтичних агентів можуть бути вибрані з групи, що складається з нестероїдного протизапального (NSAID), кортикостероїду (напр. інгаляційний кортикостероїд), бронходилататора, антигістаміна, адреналіна, 35 деконгестанта, антагоніста лімфопоетину строми тимусу (TSLP), антагоніста ІЛ-1, антагоніста ІЛ-8, антагоніста ІЛ-13, іншого антагоніста ІЛ-4, подвійного антагоніста ІЛ-4/ІЛ-13, подвійного антагоніста ІЛ-33/ІЛ-13, антагоніста ІЛ-5, антагоніста ІЛ-6, антагоніста ІЛ-12/23, антагоніста ІЛ-22, антагоніста ІЛ-25, антагоніста ІЛ-17, антагоніста ІЛ-31, інгібітора ФНП, інгібітора ІgE, інгібітора 40 лейкотрієну, перорального інгібітора PDE4, метилксантину, недокроміла натрію, кромоліна натрію, агоніста бета 2 тривалої дії (LABA), мускаринового антагоніста тривалої дії (LAMA), інгаляційного кортикостероїда (ICS) та іншого антагоніста ІЛ-33 або ІЛ-4 або іншого антитіла проти ІЛ-33 або ІЛ-4 або ІЛ-4Р, та іншого ІЛ-33 антагоніста.

У деяких варіантах реалізації цього винаходу вказаний антагоніст цитокіну може бути низькомолекулярним інгібітором (синтетичним або природним) або протеїном (напр. антитілом), 45 що взаємодіє або з самим цитокіном, або з рецептором вказаного цитокіну, або з комплексом, що включає як цитокін, так і його рецептор(и). Додаткові комбіновані терапії та комбіновані формуляції, що включають анти-ІЛ-33-антитіла цього винаходу та/або ІЛ-4Р -антитіла, описані в інших частинах цього документа.

В іншому аспекті цей винахід пропонує терапевтичні способи для інгібування активності 50 сигналінгу ІЛ-33, та/або ІЛ-4 з використанням антагоніста анти-ІЛ-33 (такого як антитіло проти ІЛ-33 або пастка ІЛ-33) і антитіло до ІЛ-4Р або антиген зв'язуюча частина одного або більше антитіл цього винаходу, причому вказані терапевтичні способи включають введення терапевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції, що містить антитіло проти ІЛ-33 або пастку ІЛ-33, або окремо, або у комбінації з антитілом проти ІЛ-4Р або антиген-зв'язуючим 55 фрагментом одного або більше антитіл цього винаходу. Розладом, що піддається лікуванню є будь-яке захворювання або стан, яке покращується, пом'якшується, пригнічується або запобігається шляхом усунення, інгібування або зменшення сигналінгу ІЛ-33 та/або ІЛ-4. Вказані антагоністи анти-ІЛ-33 та/або ІЛ-4Р цього винаходу при сумісному застосуванні можуть функціонувати для блокування взаємодії між ІЛ-33 і ІЛ-33-зв'язуючим партнером, і ІЛ-4 і ІЛ-4- 60 зв'язуючим партнером або іншим чином інгібувати сигнальну активність як ІЛ-33, так і ІЛ-4. В

одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-4Р є антитілом, яке зв'язується з ІЛ-4Р α і таким чином запобігає сигналінгу як ІЛ-4, так і ІЛ-13 через рецептори типу I або типу II. В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний ІЛ-4Р α антагоніст є дупілумабом або його біоеквівалент. Враховуючи подвійну блокуючу активність дупілумабу як для ІЛ-4, так і для ІЛ-13, вважається, що при використанні в комбінації з антагоністами ІЛ-33 цього винаходу комбінована схема лікування призведе до посиленого інгібування небажаної запальної активності, що частково є результатом сигналінгу через сигнальні шляхи ІЛ-4, ІЛ-13 і ІЛ-33, що можуть виникати під час запалення.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-33 являє собою антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, який специфічно зв'язується з ІЛ-33 і блокує взаємодію ІЛ-33 і його рецептора ST2 (також відомого як ІЛ1RL1).

У деяких варіантах реалізації цього винаходу вказані антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, що специфічно зв'язується з ІЛ-33 людини, включає три CDR важкого ланцюга (HCDR1, HCDR2 і HCDR3), що містять амінокислотну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга (HCVR), обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 і 308; і включає три CDR легкого ланцюга (LCDR1, LCDR2 і LCDR3), що містять амінокислотну послідовність варіабельної ділянки (LCVR) легкого ланцюга, обрану з групи, що складається з ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 і 316.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, який специфічно зв'язується з ІЛ-33, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 і 308.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, що специфічно зв'язується з ІЛ-33, містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 і 316.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, що специфічно зв'язується з ІЛ-33, включає:

(а) домен HCDR1, що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292 і 310;

(b) домен HCDR2, має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294 і 312;

(с) домен HCDR3, що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296 і 314;

(d) домен LCDR1, що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284 і 318;

(е) домен LCDR2, що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286 і 320;

(f) домен LCDR3, що має амінокислотну послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 і 322.

В одному варіанті реалізації цього винаходу, вказане антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, який специфічно зв'язується з ІЛ-33, містить пару амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 і 308/316.

Цей винахід включає також застосування антагоніста ІЛ-33 окремо або в комбінації з антагоністом ІЛ-4Р у виробництві лікарського засобу для лікування захворювання або розладу, пов'язаного з або викликаного активністю або сигналінгом ІЛ-33 та/або ІЛ -4 у пацієнта. В одному варіанті реалізації цього винаходу вказане захворювання або розлад, пов'язаний або викликаний активністю ІЛ-33 та/або активністю ІЛ-4 у пацієнта, є запальним захворюванням або розладом, причому запальне захворювання або розлад вибрано із групи, що складається з астми (еозинофільної або нееозинофільної), хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ), синдрому перекриття астми і ХОЗЛ (АСОС), atopічного дерматиту, поліпів носа, алергічної реакції, хронічного бронхіту, емфіземи, хронічного риносинуситу з або без поліпів носа, запального захворювання кишечника, хвороби Крона, виразкового коліту, гіперчутливого пневмоніту, розсіяного склерозу, артриту (включаючи остеоартрит, ревматоїдний артрит і псоріатичний артрит), алергічного риніту, фіброзу, еозинофільного езофагіту, васкуліту,

кропив'янки, синдрому Чорджа Строса, запального болю і псоріазу. Цей винахід також включає терапевтично ефективну кількість антагоніста ІЛ-33 в поєднанні з терапевтично ефективною кількістю антагоніста ІЛ-4Р для застосування при лікуванні запального захворювання або розладу, або щонайменше одного симптому запального захворювання або розладу, причому введення антагоніста ІЛ-33 у поєднанні з антагоністом ІЛ-4Р призводить до підвищення терапевтичної ефективності порівняно з тим, що спостерігається при введенні окремо антагоніста ІЛ-33 або окремо антагоніста ІЛ-4Р. Будь-який з обговорюваних в цьому документі способів також охоплює застосування ІЛ-33 та/або ІЛ-4Р антагоністів (напр.антитіл) для лікування, або для терапії захворювань, розладів та/або симптомів, що обговорюються стосовно методів.

Інші варіанти реалізації цього винаходу будуть очевидні з огляду наступного докладного опису.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

На Фіг. 1 показані чотири ілюстративні схеми окремих компонентів антагоністів ІЛ-33 один відносно одного. Панель А показує схему, в якій перший ІЛ-33-зв'язуючий домен (D1) приєднаний до N-кінця першого домену мультимеризації (M1), і другий ІЛ-33-зв'язуючий домен (D2) приєднаний до N-кінця другого домену мультимеризації (M2). D1 показаний білим квадратом, а D2 показаний чорним квадратом, що вказує, що D1 і D2 походять від різних ІЛ-33 зв'язуючих протеїнів. Панель В показує розташування, в якому перший ІЛ-33-зв'язуючий домен (D1) приєднаний до N-кінця першого домену мультимеризації (M1), і другий ІЛ-33-зв'язуючий домен (D2) приєднаний до C-кінця другого домену мультимеризації (M2). D1 показаний білим квадратом, а D2 показаний чорним квадратом, що вказує, що D1 і D2 походять від різних ІЛ-33 зв'язуючих протеїнів. Панелі С і D демонструють схему, що включає чотири ІЛ-33-зв'язуючі домен, D1, D2, D3 і D4. У цих схемах D3-D1-M1 і D4-D2-M2 об'єднані в тандемі, причому D3 приєднаний до N-кінця D1, і D1 приєднаний до N-кінця M1; і D4 приєднаний до N-кінця D2, і D2 приєднаний до N-кінця M2. На панелі С D3 і D4 ідентичні або суттєво ідентичні один одному, і D1 і D2 ідентичні або суттєво ідентичні один одному. На панелі D, D1 і D4 ідентичні або суттєво ідентичні один одному, і D3 і D2 ідентичні або суттєво ідентичні один одному.

На Фіг. 2 показано, що експозиція до HDM індукує подібне збільшення активних еозинофілів в легенях ІЛ-33-, ІЛ-4- і ІЛ-4Р α -потрійно гуманізованих мишей і мишей дикого типу. Статистичну значущість визначали двофакторним ANOVA з тестом множинного порівнянь Тьюкі. Для позначення статистично значущих відмінностей були використані наступні символи: зірочкою "*" позначають порівняння між мишами, яким вводили фізіологічний розчин і HDM, одного генотипу; "&" символом амперсанд позначають порівняння з відповідною групою мишей дикого типу, підданих впливу фізіологічного розчину або HDM. Збільшення числа символів вказує на збільшення значення: 1x=p $\leq$ 0.05; 2x = p $\leq$ 0,01; 3x=p $\leq$ 0,001; 4x=p $\leq$ 0,0001. Скорочення: WT = дикий тип. Всі миші мали змішаний фенотип C57BL/6NTac/129S6SvEvTac.

На Фіг. 3 показано, що комбіноване введення REGN3500 і дупіумабу блокує індуковане експозицією до HDM збільшення відносної ваги легень. Відносна вага легень виражається як відношення сирої маси легень (в мг) до маси тіла (в г). Статистичну значущість визначали за допомогою однофакторного ANOVA Крускала-Уолліса з тестом множинного порівняння Данна за отриманими результатами. Наступні символи були використані для позначення статистично значущих відмінностей: зірочка "*" позначає порівняння між усіма групами 19-тижневої експозиції до HDM; і "#" хештеги позначають порівняння тварин, підданих впливу фізіологічного розчину, інтактних тварин з усіма іншими групами. Збільшення числа символів вказує на збільшення значення: 1x=p $\leq$ 0.05; 2x=p $\leq$ 0,01; 3x=p $\leq$ 0,001. Скорочення: wk = тиждень; IgG4^P = ізотипне контрольне антитіло, REGN1945.

На Фіг. 4А і 4В показано ефект REGN3500 і дупіумабу, окремо і в комбінації, на індуковану експозицією до HDM еозинофільну інфільтрацію легень. Статистичну значущість визначали за допомогою однофакторного ANOVA Крускала-Уолліса з тестом множинного порівняння Данна по отриманих результатах. Наступні символи використовувалися для позначення статистично значущих відмінностей: зірочки "*" позначають порівняння між усіма групами 19-тижневої експозиції до HDM; хештеги "#" позначають порівняння тварин, підданих впливу фізіологічного розчину, інтактних тварин, з усіма іншими групами; і "+" знаком плюс позначають порівняння групи 11-тижневої експозиції до HDM, інтактних тварин з усіма іншими групами. Збільшення числа символів вказує на збільшення значення: 1x=p $\leq$ 0.05; 2x = p $\leq$ 0,01; 3x=p $\leq$ 0,001; 4x=p $\leq$ 0,0001. Скорочення: wk = тиждень; IgG4^P = ізотипне контрольне антитіло, REGN1945.

На Фіг. 5 показано, що REGN3500, окремо або в поєднанні з дупіумабом, блокує індуковану експозицією до HDM інфільтрацію легень ST2⁺CD4⁺ Т-клітинами. Статистичну значущість визначали за допомогою однофакторного ANOVA з тестом множинного порівняння Тьюкі по

отриманих результатах. Наступні символи використовувалися для позначення статистично значущих відмінностей: зірочки "*" позначають порівняння між усіма групами 19-тижневої експозиції до HDM; хештеги "#" позначають порівняння тварин, підданих впливу фізіологічного розчину, інтактних тварин, з усіма іншими групами; і "+" знаком плюс позначають порівняння групи 11-тижневої експозиції до HDM, інтактних тварин з усіма іншими групами. Збільшення числа символів вказує на збільшення значення: $1x=p\leq 0.05$; $2x=p\leq 0.01$; $3x=p\leq 0.001$; $4x=p\leq 0.0001$. Скорочення: wk = тиждень; IgG4^P = ізотипне контрольне антитіло, REGN1945.

На Фіг. 6 показано, що комбіноване введення REGN3500 і дупілумабу блокує індуковане експозицією до HDM підвищення рівня протеїну MPO в легені, маркера нейтрофільної інфільтрації. Статистичну значущість визначали за допомогою однофакторного ANOVA Крускала-Уолліса з тестом множинного порівняння Данна по отриманих результатах. Наступні символи були використані для позначення статистично значущих відмінностей: зірочка "*" позначає порівняння між усіма групами 19-тижневої експозиції до HDM; і "#" хештеги позначають порівняння тварин, підданих впливу фізіологічного розчину, інтактних тварин з усіма іншими групами. Збільшення числа символів вказує на збільшення значення: $1x=p\leq 0.05$; $2x=p\leq 0.01$; $3x=p\leq 0.001$. Скорочення: wk = тиждень; IgG4^P = ізотипне контрольне антитіло, REGN1945.

На Фіг. 7A і 7B показано вплив REGN3500 і дупілумабу, окремо або в комбінації, на індуковане експозицією до HDM підвищення рівня протеїну ІЛ-5 і ІЛ-6 в легені. Легені (верхню і середню частки правої легені) збирали, а рівні протеїнів ІЛ-5 (A) і ІЛ-6 (B) вимірювали за допомогою мультиплексного імуноаналізу. Рівні протеїнів ІЛ-5 і ІЛ-6 тканини легень виражали як кількість протеїну (pg) на легеневу частку. Статистичну значущість визначали за допомогою однофакторного ANOVA Крускала-Уолліса з тестом множинного порівняння Данна по отриманих результатах. Наступні символи були використані для позначення статистично значущих відмінностей: зірочка "*" позначає порівняння між усіма групами 19-тижневої експозиції до HDM; і "#" хештеги позначають порівняння тварин, підданих впливу фізіологічного розчину, інтактних тварин з усіма іншими групами. Збільшення числа символів вказує на збільшення значення: $1x=p\leq 0.05$; $2x=p\leq 0.01$; $3x=p\leq 0.001$. Скорочення: wk = тиждень; IgG4^P = ізотипне контрольне антитіло, REGN1945.

На Фіг. 8 показано, що REGN3500 окремо або у поєднанні з дупілумабом блокує індуковане експозицією до HDM підвищення рівнів циркулюючого протеїна SAA. Через чотири дні після останньої ін'єкції антитіл цільну кров збирали серцевою пункцією і виділяли сироватку. Рівні циркулюючого протеїна SAA вимірювали, використовуючи комерційно доступний набір ELISA. Рівні циркулюючого протеїна SAA виражені як кількість протеїна SAA (мкг) на мл сироватки. Статистичну значущість визначали за допомогою однофакторного ANOVA Крускала-Уолліса з тестом множинного порівняння Данна по отриманих результатах. Наступні символи були використані для позначення статистично значущих відмінностей: зірочка "*" позначає порівняння між усіма групами 19-тижневої експозиції до HDM; і "#" хештеги позначають порівняння тварин, підданих впливу фізіологічного розчину, інтактних тварин з усіма іншими групами. Збільшення числа символів вказує на збільшення значення: $1x=p\leq 0.05$; $2x=p\leq 0.01$; $3x=p\leq 0.001$. Скорочення: wk = тиждень; IgG4^P = ізотипне контрольне антитіло, REGN1945.

На Фіг. 9 показано, що рівні циркулюючого протеїна IgE збільшуються у відповідь на експозицію до HDM. Цільну кров збирали серцевою пункцією і виділяли сироватку. Рівні циркулюючого протеїна IgE вимірювали, використовуючи комерційно доступний набір ELISA. Рівні циркулюючого протеїна IgE виражені як кількість протеїна IgE (мкг) на мл сироватки. Статистичну значущість визначали за допомогою однофакторного ANOVA Крускала-Уолліса з тестом множинного порівняння Данна по отриманих результатах. Наступні символи були використані для позначення статистично значущих відмінностей: зірочка "*" позначає порівняння між усіма групами 19-тижневої експозиції до HDM; і "#" хештеги позначають порівняння тварин, підданих впливу фізіологічного розчину, інтактних тварин з усіма іншими групами. Збільшення числа символів вказує на збільшення значення: $1x=p\leq 0.05$; $2x=p\leq 0.01$; $3x=p\leq 0.001$. Скорочення: wk = тиждень; IgG4^P = ізотипне контрольне антитіло, REGN1945.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС СУТІ ВИНАХОДУ

Перед описом цього винаходу слід розуміти, що цей винахід не обмежується конкретними методами і описаними експериментальними умовами, оскільки такі способи і умови можуть змінюватися. Слід також розуміти, що термінологія, що використовується в цьому описі, призначена тільки для опису конкретних варіантів реалізації цього винаходу, і не є обмежуючою, оскільки обсяг цього винаходу обмежений тільки доданою формулою винаходу.

Якщо не зазначено інше, всі технічні та наукові терміни, що використовуються в цьому документі, мають те ж саме значення, яке зазвичай розуміється фахівцем у цій галузі, до якої

належить цей винахід. Як використовується в цьому документі, термін "приблизно", коли він використовується у зв'язку з наведеним конкретним числовим значенням, означає, що значення може змінюватися від вказаного значення не більше ніж на 1 %. Наприклад, як використовується в цьому документі, вираз "приблизно 100" включає 99 і 101 і всі значення між ними (напр. 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 і т.д.).

Хоча будь-які способи і матеріали, подібні або еквівалентні описаним в цьому документі, можуть бути використані в практиці або тестуванні цього винаходу, зараз описані бажані способи і матеріали. Всі патенти, заявки та не патентні публікації, згадані в цьому описі, включені в цьому документі у вигляді посилання у повному об'ємі.

Визначення

Терміни "інтерлейкін-33", "ІЛ-33" і т.п., як використовуються в цьому документі, стосуються протеїна ІЛ-33 людини і охоплюють непроцесований повно розмірний ІЛ-33 з 270 амінокислотами (див., наприклад, SEQ ID NO: 348, або номер доступу UniProtKB 095760), а також будь-яку форму ІЛ-33, що є результатом процесингу в клітині (див., наприклад, SEQ ID NO: 349, що містить амінокислотні залишки 112-270 повнорозмірного протеїна). Інші процесовані форми ІЛ-33 описані в Lefrançois, та ін. (Lefrançois, et al., (2012), Proc. Natl. Acad. Sci. 109 (5): 1693-1678). Вказаний термін також охоплює варіанти ІЛ-33, природного походження, наприклад, сплайс-варіанти (див., наприклад, Hong, et. al., (2011), J. Biol. Chem. 286 (22): 20078-20086, або), або алельні варіанти, або будь-яка інша ізоформа ІЛ-33, така як описана в WO2016/156440. Всі посилання на протеїни, поліпептиди і фрагменти протеїнів у цьому документі призначені для позначення варіанту відповідного протеїну людини, поліпептиду або фрагмента протеїну, якщо явно не вказано, що він походить від виду, що не є людиною.

Термін "антагоніст ІЛ-33", як використовується в цьому документі, означає будь-який агент, який здатний блокувати, послаблювати або іншим чином перешкоджати сигналіngu ІЛ-33 та/або взаємодії між ІЛ-33 і рецептором клітинної поверхні (напр., ST2, також відомий як IL1RL1) або ко-рецептором (напр. IL1-RAcP), або їхнім комплексом. Наприклад, "антагоніст ІЛ-33", який також називають "інгібітором ІЛ-33", або "блокатором ІЛ-33" включає будь-який з наступного: (1) агент, який зв'язується з ІЛ або взаємодіє з ІЛ-33; або (2) агент, який зв'язується з рецептором ІЛ-33 або взаємодіє з ним (іноді його називають "пригніченням туморогенності" або "ST2"; також відомий як "IL1RL1"); або (3) агент, який зв'язується або взаємодіє з ко-рецептором ІЛ-33 (акцесорний протеїн рецептора інтерлейкіну-1 або IL1-RAcP); або (4) агент, який зв'язується з комплексом ІЛ-33/ST2; або (5) агент, який зв'язується з ST2/IL1-RAcP або взаємодіє з ним. Будь-яке з вищезазначених може призвести до інгібування або послаблення принаймні однієї біологічної активності ІЛ-33, такої як, але не обмежуючись цим, біологічна сигнальна функція, яка виникає при зв'язуванні ІЛ-33 з рецепторним/ко-рецепторним комплексом.

В одному варіанті реалізації цього винаходу "антагоніст ІЛ-33" є антитілом, яке специфічно зв'язується з ІЛ-33 або взаємодіє з ним і запобігає зв'язуванню ІЛ-33 з ST2 і таким чином запобігає взаємодії ST2 з ко-рецептором IL-1RAcP. В одному варіанті реалізації цього винаходу, "антагоніст ІЛ-33" є антитілом, яке специфічно зв'язується або з ST2, або з комплексом ST2/IL-1RAcP, і запобігає зв'язуванню ІЛ-33 з ST2 або з рецепторним комплексом ST2/IL1-RAcP. В одному варіанті реалізації цього винаходу, "антагоніст ІЛ-33" є антитілом, яке зв'язується з комплексом ІЛ-33/ST2 і потім перешкоджає взаємодії ST2 з ко-рецептором IL-1RAcP. В одному варіанті реалізації цього винаходу, "антагоніст ІЛ-33" є антитілом, яке зв'язується з ІЛ-33 і забезпечує низько афінне зв'язування з ST2, але в той же час, таке низько афінне зв'язування може перешкоджати подальшій взаємодії ST2 з ко-рецептором IL-1RAcP.

"Антагоніст ІЛ-33" може також бути агентом, таким як розчинний рецептор ST2, або пасткою на основі рецептора ІЛ-33, такі як описані в цьому документі і розкриті в US2014/0271642. Будь-який агент, який блокує ІЛ-33-опосередковану сигналізацію, вважається "антагоністом ІЛ-33". Вказаний "антагоніст ІЛ-33" може представляти собою невелику органічну молекулу, протеїн, такий як антитіло або його фрагмент, або розчинну пастку на основі рецептора ІЛ-33 (як описано в цьому документі), або нуклеїнову кислоту, таку як антисмислова молекула або siRNA. Як використовується в цьому документі, "антитіло, яке зв'язує ІЛ-33" або "анти-ІЛ-33 антитіло", включає антитіла і їх антиген зв'язуючі фрагменти, які зв'язують протеїн ІЛ-33 людини або його біологічно активний фрагмент (наприклад, Див. SEQ ID NO: 348, 349, 350 і 351).

Вираз "рецептор інтерлейкіну-4" або "ІЛ-4Р", що використовується в цьому документі, стосується ІЛ-4Р α рецептора людини, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 347.

Як використовується в цьому документі, "антагоніст ІЛ-4Р" (також згадуваний тут як "інгібітор ІЛ-4Р", "антагоніст ІЛ-4Р α ", "блокатор ІЛ-4Р", "блокатор ІЛ-4Р α "), тощо є будь-яким агентом, який зв'язується або взаємодіє з ІЛ-4Р α або лігандом ІЛ-4Р, і інгібує або послаблює нормальну

біологічну сигнальну функцію рецептора 2 ІЛ-4 типу 1 та/або типу. Рецептор ІЛ-4 типу 1 є димерним рецептором, що включає ланцюг ІЛ-4Р α і ланцюг γ . Рецептор ІЛ-4 типу 2 є димерним рецептором, що включає ланцюг ІЛ-4Р α і ланцюг ІЛ-13Р α 1. Рецептори ІЛ-4 типу 1 взаємодіють з ІЛ-4 і стимулюються ним, тоді як ІЛ-4-рецептори типу 2 взаємодіють як з ІЛ-4, так і з ІЛ-13 і стимулюються ними. Таким чином, вказані антагоністи ІЛ-4Р, які можуть бути використані у вказаних способах цього винаходу, можуть функціонувати шляхом блокування опосередкованого ІЛ-4 сигналіngu, опосередкованого ІЛ-13 сигналіngu, або опосередкованого як ІЛ-4-, так і ІЛ-13- сигналіngu. Вказані антагоністи ІЛ-4Р цього винаходу можуть, таким чином, перешкоджати взаємодії ІЛ-4 та/або ІЛ-13 з рецептором типу 1 або 2. Необмежуючі приклади категорій антагоністів ІЛ-4Р включають низькомолекулярні інгібітори ІЛ-4Р, аптамери анти-ІЛ-4Р, інгібітори ІЛ-4Р на основі пептидів (напр.молекули "пептитіла"), "рецепторні тіла" (напр., сконструйовані молекули, що містять ліганд-зв'язуючий домен ІЛ-4Р компонента), і антитіла або антиген-зв'язуючі фрагменти антитіл, які специфічно зв'язують людський ІЛ-4Р α . Як використовується в цьому документі, антагоністи ІЛ-4Р також включають антиген-зв'язуючі протеїни, які специфічно зв'язують ІЛ-4 та/або ІЛ-13.

Вказаний термін "антитіло", як використовується в цьому документі, означає будь-яку антигензв'язуючу молекулу або молекулярний комплекс, що включає щонайменше одну ділянку, що визначає комплементарність (CDR), що специфічно зв'язується або взаємодіє з певним антигеном (напр., ІЛ-33 або ІЛ-4Р). Вказаний термін "антитіло" включає молекули імуноглобуліну, що містять чотири поліпептидні ланцюги, два важкі (H) ланцюги і два легких (L) ланцюги, зв'язані між собою дисульфідними зв'язками, а також їх мультимери напр., IgM). Кожний важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (скорочено в цьому документі як HCVR або V_H) і константну ділянку важкого ланцюга. Константна ділянка важкого ланцюга включає три домени, C_{H1} , C_{H2} і C_{H3} . Кожний легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (скорочено в цьому документі LCVR або V_L) і константну ділянку легкого ланцюга. Вказана константна ділянка легкого ланцюга включає один домен (C_{L1}). Вказані V_H і V_L ділянки можуть бути додатково поділені на ділянки гіперваріабельності, які називаються ділянками, що визначають комплементарність (CDRs), перемішані з ділянками, які є більш консервативними, що називаються каркасними ділянками (FR). Кожна V_H і V_L складається з трьох CDR і чотирьох FR, розташованих від аміно-кінця до карбокси-кінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. У різних варіантах реалізації цього винаходу FR-антитіло проти ІЛ-33 (або його антиген-зв'язуюча частина) або антитіло проти ІЛ-4Р можуть бути ідентичними до послідовностей зародкової лінії людини або можуть бути природними або штучно модифікованими. Консенсусна послідовність амінокислот може бути визначена на основі паралельного аналізу двох або більше CDR.

Вказаний термін "антитіло", як використовується в цьому документі, також включає антиген-зв'язуючі фрагменти повних молекул антитіл. Вказані терміни "антиген-зв'язуюча частина" антитіла, "антиген-зв'язуючий фрагмент" антитіла і т.п., як використовується в цьому документі, включають будь-який природний, отриманий з допомогою ферментів, синтетичний або генетично сконструйований поліпептид або глікопротеїн, який специфічно зв'язує антиген для утворення комплексу. Антиген-зв'язуючі фрагменти антитіла можуть бути отримані, напр.від повних молекул антитіл, використовуючи будь-які відповідні стандартні методики, такі як протеолітичне розщеплення або рекомбінантні методи генної інженерії, що включають маніпуляцію та експресію ДНК, що кодує варіабельні і додатково константні домени антитіла. Така ДНК відома і/або легко отримується з, напр., комерційних джерел, бібліотек ДНК (у тому числі, напр. бібліотеки фагових антитіл), або може бути синтезована. Вказана ДНК може бути секвенована і маніпульована хімічно або з використанням методів молекулярної біології, наприклад, для організації одного або декількох варіабельних і/або константних доменів у відповідній конфігурації, або для вставки кодонів, утворення залишків цистеїну, модифікації, додавання або видалення амінокислот і т.д.

Необмежуючі приклади антиген зв'язуючих фрагментів включають: (i) Fab фрагменти; (ii) F(ab')₂ фрагменти; (iii) Fd фрагменти; (iv) Fv фрагменти; (v) одноланцюгові молекули Fv (scFv); (vi) dAb фрагменти; та (vii) мінімальні одиниці розпізнавання, що складаються з амінокислотних залишків, які імітують гіперваріабельну ділянку антитіла (напр. ізольовану ділянку, що визначає комплементарність (CDR), таку як пептид CDR3), або пептид з обмеженою конформаційною свободою FR3-CDR3-FR4. Інші сконструйовані молекули, такі як домен-специфічні антитіла, ододоменні антитіла, антитіла з видаленим доменом, химерні антитіла, антитіла з прищепленою CDR, діатіла, триатіла, тетратіла, міні-антитіла, нанотіла (напр. моновалентні нанотіла, бівалентні нанотіла і т.д.), імунофармацевтичні препарати на основі модульного протеїна малого розміру (SMIP), а також варіабельні IgNAR домени акули, також включені у

вираз "антиген-зв'язуючий фрагмент", як використовується у цьому документі.

Антиген-зв'язуючий фрагмент антитіла зазвичай буде включати щонайменше один варіабельний домен. Вказаний варіабельний домен може бути будь-якого розміру або амінокислотного складу і зазвичай буде включати щонайменше одну CDR, яка є суміжною до

або в рамці зчитування з однією або більше послідовностями каркасу. У антиген зв'язуючих фрагментах, що мають V_H домен, пов'язаний з V_L доменом, V_H і V_L домени можуть бути розташовані один відносно одного в будь-якому прийнятному порядку. Наприклад, варіабельна ділянка може бути димерною і містити V_H - V_H , V_H - V_L або V_L - V_L димери. Альтернативно, вказаний антиген-зв'язуючий фрагмент антитіла може містити мономерний V_H або V_L домен.

У певних варіантах реалізації цього винаходу антиген-зв'язуючий фрагмент антитіла може містити принаймні один варіабельний домен, ковалентно зв'язаний щонайменше з одним константним доменом. Необмежуючі, ілюстративні конфігурації варіабельних і константних доменив, які можуть бути знайдені в антиген зв'язуючому фрагменті антитіла цього винаходу, включають: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; і (xiv) V_L - C_L . У будь-якій конфігурації варіабельних і константних доменив, включаючи будь-яку з наведених вище зразкових конфігурацій, вказані варіабельні і константні домени можуть бути або безпосередньо зв'язані один з одним, або можуть бути зв'язані через повнорозмірну або часткову шарнірну або лінкерну ділянку. Шарнірна ділянка може складатися щонайменше з 2 (напр., 5, 10, 15, 20, 40, 60 або більше) амінокислот, що призводить до гнучкого або напівгнучкого зв'язків між сусідніми варіабельними та/або константними доменами в одній поліпептидній молекулі. Більш того, антиген-зв'язуючий фрагмент антитіла цього винаходу може містити гомодимер або гетеродимер (або інший мультимер) будь-якої з конфігурацій варіабельних і константних доменив, перерахованих вище в нековалентній асоціації один з одним і/або з одним або декількома мономерними V_H або V_L доменами (напр., за допомогою дисульфідних(ого) зв'язків (a)).

Як і у випадку повних молекул антитіл, антиген-зв'язуючі фрагменти можуть бути моноспецифічними або мультиспецифічними (напр., біспецифічні). Мультиспецифічний антиген-зв'язуючий фрагмент антитіла зазвичай буде включати щонайменше два різних варіабельних домени, причому кожен варіабельний домен здатний специфічно зв'язуватися з окремим антигеном або з іншим епітопом на тому ж самому антигені. Будь-який мультиспецифічний формат антитіл, включаючи ілюстративні формати біспецифічних антитіл, описаних у цьому документі, може бути адаптований для використання в контексті антиген-зв'язуючого фрагмента антитіла за цим винаходом з використанням рутинних технологій, доступних в цій галузі техніки. Наприклад, цей винахід включає способи, що включають застосування біспецифічних антитіл, в яких одне плече імуноглобуліну є специфічним для ІЛ-4R α або його фрагмента, або імуноглобуліну, специфічного для ІЛ-33, або його фрагмента, і інше плече імуноглобуліну є специфічним для другої терапевтичної мішені або кон'юговане з терапевтичним фрагментом. Ілюстративні біспецифічні формати, які можуть використовуватися в контексті цього винаходу, включають, без обмежень, напр., формати на основі scFv або біспецифічних діатіл, злиття IgG-scFv, подвійний варіабельний домен (DVD) -Ig, квадрогібриду, виступи -в-западини, звичайний легкий ланцюг (напр., звичайний легкий ланцюг з виступами -в-западини, і т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED) тіло, лейцинова застібка, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG подвійної дії, і Mab² біспецифічні формати (див., напр., Klein та ін... 2012, mAbs 4:6, 1-11 і посилання, наведені в ньому, для перегляду вищезгаданих форматів). Біспецифічні антитіла також можуть бути сконструйовані з використанням кон'югації пептиду/нуклеїнової кислоти, напр. де амінокислоти, що не зустрічаються в природі, з ортогональною хімічною реактивністю використовуються для отримання сайт-специфічних антитіло-олігонуклеотидних кон'югатів, які потім самостійно збираються в мультимерні комплекси з визначеним складом, валентністю і геометрією. (Див., напр., Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

У певних варіантах реалізації цього винаходу вказані анти-ІЛ-33 і антитіла проти ІЛ-4R цього винаходу є антитілами людини. Вказаний термін "людське антитіло", як використовується в цьому документі, призначений для включення антитіл, які мають варіабельні і константні ділянки, що походять від послідовностей імуноглобуліну зародкової лінії людини. Вказані антитіла людини цього винаходу можуть включати амінокислотні залишки, що не кодуються послідовностями імуноглобулінів зародкової лінії людини (наприклад, мутації, введені випадковим або сайт-специфічним мутагенезом *in vitro* або шляхом соматичної мутації *in vivo*), наприклад, в CDR і, зокрема, CDR3. Однак термін "антитіло людини", як використовується в цьому документі, не призначений для включення антитіл, в яких послідовності CDR, що

походять з зародкової лінії інших видів ссавців, таких як миші, були прищеплені на каркасні послідовності людські. Вказаний термін включає антитіла, рекомбінантно отримані від ссавця, що не є людиною, або в клітинах ссавця, що не є людиною. Термін не призначений для включення антитіл, виділених або утворених у людини.

Вказані антитіла цього винаходу можуть, в деяких варіантах реалізації цього, бути рекомбінантними антитілами людини. Термін "рекомбінантне антитіло людини", як він використовується в цьому документі, призначений для включення всіх антитіл людини, які отримують, експресуються, створюють або виділяють за допомогою рекомбінантних засобів, таких як антитіла, експресовані з використанням рекомбінантного вектора експресії, трансфікованого в клітину-хазяїна (описано нижче), антитіла, виділені з рекомбінантної, комбінаторної бібліотеки антитіл людини (описаної нижче), антитіла, виділені з тварини (наприклад, миші), яка є трансгенною для генів імуноглобуліну людини (див., наприклад, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295) або антитіла, отримані, експресовані, утворені або виділені будь-яким іншим способом, який включає сплайсинг послідовностей генів імуноглобуліна людини з іншими послідовностями ДНК. Такі рекомбінантні антитіла людини мають варіабельні і константні ділянки, що походять з послідовностей імуноглобуліну зародкової лінії людини. Однак, в деяких варіантах реалізації цього винаходу, такі рекомбінантні антитіла людини піддаються мутагенезу *in vitro* (або, коли для послідовності Ig людини використовуються послідовності трансгенної тварини, соматичний мутагенез *in vivo*) і, таким чином, вказані амінокислотні послідовності V_H і V_L ділянок рекомбінантних антитіл є послідовностями, які, одночасно походять від і споріднені з послідовностями V_H і V_L зародкової лінії людини, можуть не зустрічатись природним чином в репертуарі зародкової лінії антитіла людини *in vivo*.

Антитіла людини можуть існувати у двох формах, що пов'язані з гетерогенністю шарніра. В одній формі молекула імуноглобуліну включає в себе стабільний чотирьох ланцюговий конструктор масою приблизно 150-160 кДа, в якому димери утримуються разом міжланцюговим дисульфідним зв'язком важкого ланцюга. У другій формі вказані димери не зв'язані міжланцюговими дисульфідними зв'язками і утворюється молекула масою приблизно 75-80 кДа, що складається з ковалентно зв'язаного легкого і важкого ланцюга (напів-антитіло). Ці форми надзвичайно важко відокремити навіть після афінної очистки.

Частота появи другої форми в різних інтактних ізотипах IgG обумовлена, але не обмежується, структурними відмінностями, пов'язаними з ізотипом шарнірної ділянки антитіла. Одиначна амінокислотна заміна у вказаній шарнірній ділянці шарніра IgG4 людини може значно зменшити ймовірність появи другої форми (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30: 105) до рівнів, які зазвичай спостерігаються з використанням шарніру IgG1 людини. Цей винахід включає антитіла, які мають одну або більше мутацій в шарнірі, C_H2 або C_H3 ділянка, яка може бути бажаною, наприклад, у отриманні, для поліпшення виходу бажаної форми антитіла.

Вказані антитіла цього винаходу можуть бути ізольованими антитілами. Термін "виділене антитіло", як використовується в цьому документі, означає антитіло, яке було ідентифіковано і виділено та/або отримано зі щонайменше одного компонента його природного середовища. Наприклад, антитіло, яке було виділене або отримане зі щонайменше одного компонента організму, або з тканини або клітини, в якій вказане антитіло природно існує або виробляється природним шляхом, є "ізольованим антитілом" для цілей цього винаходу. Ізольоване антитіло також включає антитіло *in situ* в рекомбінантній клітині. Ізольовані антитіла є антитілами, які були піддані щонайменше одному етапу очищення або виділення. Згідно з певними варіантами реалізації цього винаходу, ізольоване антитіло може бути значно очищеним від іншого клітинного матеріалу та/або хімічних речовин.

Цей винахід включає нейтралізацію та/або блокування анти-ІЛ-33 антитіл і ІЛ-4Р антитіл. "Нейтралізуюче" або "блокуюче" антитіло, як використовується в цьому документі, призначене для позначення антитіла, зв'язування якого з молекулою-мішенню, напр. або ІЛ-33 або ІЛ-4Р: (i) перешкоджає взаємодії між молекулою-мішенню і або її рецептором (у випадку антитіл проти ІЛ-33), або її лігандом (у випадку антитіл проти ІЛ-4Р); та/або (ii) призводить до інгібування щонайменше однієї біологічної функції молекули-мішені, напр. сигналінг. Інгібування, викликане нейтралізуючим або блокуючим антитілом проти ІЛ-33 або проти ІЛ-4Р, не обов'язково повинно бути повним за умови, що воно може бути виявлене за допомогою відповідного аналізу.

Антитіла, описані в цьому документі можуть містити одну або більше амінокислотних замінок, вставок і/або делецій в каркасних і/або CDR ділянках варіабельних доменів важкого і легкого ланцюгів у порівнянні з відповідними послідовностями зародкової лінії, з яких вказані антитіла були отримані. Такі мутації можуть бути легко встановлені шляхом порівняння амінокислотних послідовностей, описаних в цьому документі, з послідовностями зародкової лінії, доступними,

наприклад, з публічних баз даних послідовностей антитіл. Цей винахід включає антитіла та їх антиген зв'язуючі фрагменти, які походять від будь-якої з описаних в цьому документі амінокислотних послідовностей, де одна або більше амінокислот в межах однієї або більше каркасних і/або CDR ділянок мутували до відповідного(них) залишку(ків) послідовності зародкової лінії, від якої було отримано антитіло, або до відповідного(них) залишку(ків) іншої послідовності зародкової лінії людини або консервативної амінокислотної заміни відповідним залишком(ками) зародкової лінії (такі зміни послідовності згадуються тут в сукупності як "мутації зародкової лінії"). Фахівець у цій галузі техніки, починаючи з послідовностей варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюга, описаних у цьому документі, може легко отримувати численні антитіла і антиген-зв'язуючі фрагменти, які містять одну або більше окремих мутацій зародкової лінії або їх комбінацій. У певних варіантах реалізації цього винаходу всі каркасні та/або CDR залишки всередині V_H та/або V_L доменів мутовані зворотньо до залишків, знайдених у вихідній послідовності зародкової лінії, з якої було отримано антитіло. В інших варіантах реалізації цього винаходу тільки певні залишки мутують зворотньо до вихідної послідовності зародкової лінії, напр. тільки ті мутовані залишки, які виявлені в межах перших 8 амінокислот FR1 або в межах останніх 8 амінокислот FR4, або тільки ті мутовані залишки, які виявлені в межах CDR1, CDR2 або CDR3. В інших варіантах реалізації цього винаходу один або більше каркасних та/або CDR залишків мутовані до відповідного залишку(ків) іншої послідовності зародкової лінії тобто послідовність зародкової лінії, яка відрізняється від послідовності зародкової лінії, з якої походить антитіло). Крім того, вказані антитіла цього винаходу можуть містити будь-яку комбінацію двох або більше мутацій зародкової лінії в каркасній і/або CDR ділянці, напр., де певні окремі залишки мутовані до відповідного залишку певної послідовності зародкової лінії, в той час як деякі інші залишки, які відрізняються від вихідної послідовності зародкової лінії, збережені або мутовані до відповідного залишку іншої послідовності зародкової лінії. Після отримання, антитіла і антиген-зв'язуючі фрагменти, які містять одну або більше мутацій зародкової лінії, можуть бути легко протестовані на одну або більше бажаних властивостей, таких як, поліпшена специфічність зв'язування, підвищена афінність зв'язування, поліпшені або посилені антагоністичні або агоністичні біологічні властивості (за певних умов) зменшена імуногенність і т.д. Антитіла і антиген-зв'язуючі фрагменти, отримані цим загальним способом, включені в цей винахід.

Цей винахід також включає антитіла, що містять варіанти будь-якої з амінокислотних послідовностей HCVR, LCVR та/або CDR, описаних в цьому документі, мають одну або більше консервативних замін. Наприклад, цей винахід включає антитіла, що мають послідовності амінокислот HCVR, LCVR та/або CDR з, напр., 10 або менше, 8 або менше, 6 або менше, 4 або менше, і т.д. консервативними амінокислотними замінами, зв'язаними з будь-якими з амінокислотними послідовностями HCVR, LCVR та/або CDR, описаними в цьому документі.

Термін "епітоп" стосується антигенної детермінанти, яка взаємодіє зі специфічним сайтом зв'язування антигену на варіабельній ділянці молекули антитіла, відомої як паратоп. Один антиген може мати більш ніж один епітоп. Таким чином, різні антитіла можуть зв'язуватися з різними ділянками на антигені і можуть мати різні біологічні ефекти. Епітопи можуть бути конформаційними або лінійними. Конформаційний епітоп утворюється просторово суміщеними амінокислотами з різних сегментів лінійного поліпептидного ланцюга. Лінійний епітоп є таким, що утворюється сусідніми амінокислотними залишками в поліпептидному ланцюзі. За певних обставин епітоп може включати фрагменти сахаридів, фосфорильних груп або сульфонільних груп на антигені.

Термін "суттєва ідентичність" або "суттєво ідентичний", коли мається на увазі нуклеїнова кислота або її фрагмент, вказує на те, що при оптимальному вирівнюванні з відповідними нуклеотидними інсерціями або делеціями з іншою нуклеїновою кислотою (або її комплементарним ланцюгом) ідентичність нуклеотидної послідовності щонайменше, приблизно 95 %, і більш бажано, щонайменше, приблизно 96 %, 97 %, 98 % або 99 % нуклеотидних основ, як виміряно будь-яким відомим алгоритмом ідентичності послідовності, таким як FASTA, BLAST або Gap, як обговорюється нижче. Молекула нуклеїнової кислоти, що має суттєву ідентичність з еталонною молекулою нуклеїнової кислоти, може, в деяких випадках, кодувати поліпептид, що має таку ж або суттєво подібну амінокислотну послідовність, що і поліпептид, який кодується еталонною молекулою нуклеїнової кислоти.

Що стосується поліпептидів, вказаний термін "суттєва подібність" або "суттєво подібний" означає, що дві пептидні послідовності, коли оптимально вирівняні, за допомогою таких програм як GAP або BESTFIT з використанням штрафів за делецію за замовчуванням, мають принаймні 95 % ідентичності послідовності, ще більш бажано щонайменше 98 % або 99 % ідентичності послідовності. Бажано, щоб позиції залишків, які не є ідентичними, відрізнялися

консервативними амінокислотними замінами. "Консервативна амінокислотна заміна" є такою, в якій амінокислотний залишок заміщений іншим амінокислотним залишком, що має бічний ланцюг (R-групу) з подібними хімічними властивостями (наприклад, заряд або гідрофобність). Загалом, консервативна амінокислотна заміна не суттєво змінить функціональні властивості протеїна. У тих випадках, коли дві або більше амінокислотних послідовностей відрізняються одна від одної консервативними замінами, вказаний відсоток ідентичності послідовності або ступінь подібності може бути скоригований в більший бік, щоб виправити консервативний характер заміни. Засоби для здійснення цієї корекції добре відомі фахівцям в цій області. Див., напр., Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включена в цей документ шляхом посилання. Приклади груп амінокислот, які мають бічні ланцюги з подібними хімічними властивостями, включають (1) аліфатичні бічні ланцюги: гліцин, аланін, валін, лейцин і ізолейцин; (2) аліфатично-гідроксильні бічні ланцюги: серин і треонін; (3) амідвмісні бічні ланцюги: аспарагін і глутамін; (4) ароматичні бічні ланцюги: фенілаланін, тирозин і триптофан; (5) основні бічні ланцюги: лізин, аргінін і гістидин; (6) кислотні бічні ланцюги: аспартат і глутамат, і (7) сірковмісні бічні ланцюги - цистеїн і метіонін. Бажаними консервативними групами заміщення амінокислот є: валін-лейцин-ізолейцин, фенілаланін-тирозин, лізин-аргінін, аланін-валін, глутамат-аспартат і аспарагін-глутамін. Альтернативно, консервативна заміна являє собою будь-яку зміну, що має позитивне значення в матриці логарифмічної правдивості PAM250, розкритої в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, включена в цей документ шляхом посилання. "Помірно консервативна" заміна є будь-якою зміною, що має не негативне значення в матриці логарифмічної правдивості PAM250.

Подібність послідовності для поліпептидів, яка також називається ідентичністю послідовності, зазвичай вимірюється за допомогою програмного забезпечення для аналізу послідовностей. Програмне забезпечення аналізу білків співставляє подібні послідовності, використовуючи параметри схожості, призначені для різних замінів, делецій та інших модифікацій, включаючи консервативні амінокислотні заміни. Наприклад, програмне забезпечення GCG містить програми, такі як Gap і Bestfit, які можуть бути використані з параметрами за замовчуванням для визначення гомології послідовності або ідентичності послідовностей між близько спорідненими поліпептидами, такими як гомологічні поліпептиди від різних видів організмів або між протеїном дикого типу і його мутантним варіантом. Див., напр., GCG Версія 6.1. Поліпептидні послідовності також можуть бути порівняні за допомогою FASTA з використанням стандартних або рекомендованих параметрів, програма в GCG Version 6.1. FASTA (наприклад, FASTA2 і FASTA3) забезпечує вирівнювання і відсоток ідентичності послідовностей областей кращого перекриття між послідовностями запиту і пошуку (Pearson (2000) вище). Іншим бажаним алгоритмом при порівнянні послідовності цього винаходу з базою даних, що містить велику кількість послідовностей від різних організмів, є комп'ютерна програма BLAST, особливі BLASTP або TBLASTN, з використанням параметрів за замовчуванням. Див., напр., Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 і Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402, кожна з яких включена в цьому документі шляхом посилання.

"Захворювання або розлад", що використовується в цьому документі, є будь-яким станом, що піддається лікуванню вказаними антагоністами ІЛ-33 і ІЛ-4 цього винаходу. "Запальне захворювання або розлад", що використовується в цьому документі, стосується захворювання, розладу або патологічного стану, при яких патологія, повністю або частково, походить від, напр., зміни кількості, зміни швидкості міграції або зміни активації клітин імунної системи. Клітини імунної системи включають, наприклад, Т-клітини, В-клітини, моноцити або макрофаги, вроджені лімфоїдні клітини, антиген-презентуючі клітини (APC), дендритні клітини, мікроглія, NK-клітини, нейтрофіли, еозинофіли, тучні клітини або будь-які інші клітини, специфічно пов'язані з імунологією, наприклад, цитокін-продукуючі ендотеліальні або епітеліальні клітини. Як використовується в цьому документі, в одному варіанті реалізації цього винаходу вказане "запальне захворювання або розлад" є імунним розладом або станом, вибраним з групи, що складається з астми (включаючи астму, стійку до стероїдів, астму, чутливу до стероїдів, еозинофільну астму або не еозинофільну астму), алергії, анафілаксії, розсіяного склерозу, запального розладу кишечника (напр. хвороба Крона або виразковий коліт), хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ, яке може бути або не бути пов'язаним з, частково викликаним або виникнути в результаті впливу цигаркового диму при активному або пасивному курінні), синдрому перекриття астми і ХОЗЛ (ACOS), еозинофільного езофагіту, хронічного бронхіту, емфіземи, хронічного риносинусита з або без поліпів носа, вовчака, atopічного дерматиту, псоріазу, склеродермії та інших фіброзних захворювань, синдрому Шегрена, васкуліту (синдрому Бечета, гігантоклітинного артеріїту, пурпури Геноха-Шонлейна і синдрому Чорджа Штрауса) запального болю і артриту. В одному варіанті реалізації цього винаходу

артрит обраний із групи, що складається з ревматоїдного артриту, остеоартриту і псоріатичного артриту.

В одному варіанті реалізації цього винаходу, "запальне захворювання або розлад" є імунним розладом або станом, що включає відповідь типу 1 та/або відповідь типу 2.

"Імунна відповідь типу 1" визначається клітинами Т хелперами 1 (T_H1) і T_H17 клітинами, цитотоксичними Т-клітинами, вродженими лімфоїдними клітинами групи 1 і групи 3 і імуноглобуліном М (IgM), IgA і специфічними класами IgG антитіл і цитокінами, включаючи, наприклад, ФНП, ІЛ-1 β і ІЛ-6. Ця ефекторна відповідь опосередковує імунітет до багатьох мікроорганізмів, включаючи бактерії, віруси, гриби і найпростіші. Елементи імунітету 1-го типу також допомагають підтримувати пухлинний імунний нагляд.

"Імунна відповідь 2 типу" характеризується CD4+Т хелперними (T_H2) клітинами, вродженими лімфоїдними клітинами групи 2 (ILC), еозинофілами, базофілами, тучними клітинами, ІЛ-4 та/або ІЛ-13 активованими макрофагами, підкласом антитіл IgE і цитокінами, включаючи, наприклад, ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-9, ІЛ-13, лімфопоетином строми тимусу, ІЛ-25 і ІЛ-33. Імунітет 2-го типу забезпечує захист від великих позаклітинних паразитів, підвищуючи захисні бар'єри. Елементи імунної відповіді типу 2 також допомагають підтримувати метаболічний гомеостаз і посилювати ремоделювання тканини після травми. Цей тип відповіді також може бути ініційований у відповідь на алергени.

Фраза "інгібує або послаблює ІЛ-33-опосередкований сигналінг", як використовується в цьому документі, стосується ступеня, до якого ІЛ-33 стимулює трансдукцію сигналу через його рецептор ST2 і ко-рецептор IL-1RAcP, що зменшується в присутності антагоніста, такого як антитіло проти ІЛ-33, або пастка ІЛ-33, як описано в цьому документі, відносно ступеня, до якого ІЛ-33 стимулює трансдукцію сигналу через ST2 і IL-1RAcP у відсутності антагоніста, такого як антитіло проти ІЛ-33 або пастка ІЛ-33, як описано в цьому документі. Фраза "пригнічує або послаблює ІЛ-4Р-опосередкований сигналінг", як використовується в цьому документі, стосується ступеня, до якого ІЛ-4 стимулює трансдукцію сигналу через рецептор ІЛ-4 типу 1 та/або типу 2, що зменшується в присутності антагоніста, такого як антитіло проти ІЛ-4 або ІЛ-4Р, як описано в цьому документі, відносно ступеня, до якого ІЛ-4 стимулює трансдукцію сигналу через рецептор ІЛ-4 типу 1 та/або 2 типу за відсутності антагоніста, такого як антитіло проти ІЛ-4 або ІЛ-4Р, як описано в цьому документі. Для дослідження ступеня інгібування зразок обробляли потенційним інгібітором/антагоністом і порівнювали з контрольним зразком без вказаного інгібітора/антагоніста. Контрольним зразком, тобто, не обробленим антагоністом, призначають відносні значення 100 % активності. Інгібування досягається, коли значення активності відносно контролю становить приблизно 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, або 20 % або менше. Результат інгібування може включати заздалегідь визначену кількість або відсоток напр., індикатора запалення або дегрануляції клітин, секреції або активації, таких як вивільнення цитокіну. Інгібування трансдукції сигналу ІЛ-33 через ST2 і IL-1RAcP може бути визначено шляхом аналізу трансдукції сигналу ІЛ-33 в *in vitro*, такого як відомий фахівцям в цій галузі техніки. Крім того, *in vivo* аналізи можуть бути використані для визначення, чи є молекула антагоністом ІЛ-33. Наприклад, *in vivo* аналіз може бути використаний для оцінки впливу антитіла проти ІЛ-33 на запалення легень у алерген-сенсibilізованих тварин, які є гомозиготними для експресії ІЛ-33 людини. Після сенсibilізації вказаних тварин алергеном підгрупі вказаних тварин вводять або анти- ІЛ-33 антитіло цього винаходу, або негативне антитіло ізотипного контролю. Потім тварин умертвляють і легені відбирають для оцінки клітинних інфільтратів, а також вимірювання цитокінів (ІЛ-4 і ІЛ-5). Антитіло до ІЛ-33, яке є ефективним як антагоніст, повинно продемонструвати тенденцію до зменшення запальних клітин в легені, а також тенденцію до зниження цитокінів, таких як ІЛ-4 і ІЛ-5. Подібні аналізи можна проводити для оцінки здатності антагоніста ІЛ-4Р блокувати сигнальну трансдукцію після зв'язування ІЛ-4 з рецептором типу 1 та/або 2 типу *in vivo* або *in vivo*. Більш того, будь-який з вищезазначених аналізів може бути модифікований з метою порівняння ефектів використання тільки антагоніста ІЛ-33, тільки антагоніста ІЛ-4 або ІЛ-4Р, або ефекту використання комбінації антагоніста ІЛ-33 з антагоністом ІЛ-4 або ІЛ-4Р разом.

В іншому аспекті, цей винахід пропонує способи зниження частоти прояву або рецидиву астми або ХОЗЛ, або загострення астми або ХОЗЛ у пацієнта, що потребує цього лікування, що включає введення фармацевтичної композиції, яка містить антагоніст рецептора інтерлейкіну-4 (ІЛ-4Р) пацієнту у комбінації з фармацевтичною композицією, що містить антагоніст ІЛ-33. Як використовується у цьому документі, вираз "загострення астми або ХОЗЛ" означає збільшення тяжкості та/або частоти та/або тривалості одного або більше симптомів або ознак астми або ХОЗЛ. "Загострення астми або ХОЗЛ" також включає в себе будь-яке погіршення стану

респіраторного здоров'я пацієнта, що вимагає і/або може лікуватись терапевтичним втручанням для астми або ХОЗЛ (наприклад, лікування стероїдами, лікування інгаляційним кортикостероїдом, госпіталізація і т.д.)

"Зниження частоти прояву або рецидиву" загострення астми або ХОЗЛ означає, що пацієнт, який отримав фармацевтичні композиції цього винаходу, має меншу кількість загострень астми або ХОЗЛ (тобто, щонайменше, на одне загострення менше) після лікування, ніж до лікування, або не має загострення астми або ХОЗЛ протягом щонайменше 4 тижнів (наприклад, 4, 6, 8, 12, 14 або більше тижнів) після початку лікування фармацевтичною композицією цього винаходу. "Зниження частоти прояву або рецидиву" загострення астми або ХОЗЛ альтернативно означає, що після введення фармацевтичної композиції цього винаходу ймовірність того, що пацієнт має загострення астми або ХОЗЛ зменшується щонайменше на 10 % (наприклад, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % або більше) у порівнянні з пацієнтом, який не отримав фармацевтичну композицію цього винаходу.

"Фіброзне захворювання або розлад", що використовується в цьому документі, стосується умов, які включають надлишок фіброзної сполучної тканини в тканині або органі. "Фіброз" стосується патологічного процесу, який включає утворення рубця і підвищене утворення позаклітинного матриксу сполучною тканиною у відповідь на пошкодження тканини. Використовувані в цьому документі приклади "фібротичних захворювань або розладів", які піддаються лікуванню шляхом введення анти-ІЛ-33 і антагоністів ІЛ-4Р цього винаходу, включають фіброз легень (напр., ідіопатичний фіброз легень, індукований блеоміцином фіброз легень, індукований азбестом фіброз легень і синдром облітеруючого бронхіоліту), хронічна астма, фіброз, асоційований з гострим пошкодженням легень і гострою легеневою недостатністю (напр., фіброз, індукований бактеріальною пневмонією, фіброз, індукований травмою, фіброз, індукований вірусною пневмонією, фіброз, індукований штучною вентиляцією легень, фіброз, індукований не легеневим сепсисом і фіброз, індукований аспірацією), силікоз, фіброз, індукований опроміненням, хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ, яке може бути або не бути пов'язаним з, викликатись частково або бути спричиненим впливом цигаркового диму в результаті активного або пасивного куріння), склеродермію, очний фіброз, фіброз шкіри (напр., склеродермія), фіброз печінки (напр., цироз печінки, індукований алкоголем фіброз печінки, неалкогольний стеатогепатит (NASH), пошкодження жовчних шляхів, первинний біліарний цироз, індукований інфекцією або вірусом фіброз печінки, аутоімунний гепатит, фіброз нирок (нирковий), фіброз серця, атеросклероз, рестеноз стента і мієлофіброз. Хоча астма і ХОЗЛ, загалом, вважаються запальними станами, відомо, що кожен з них також демонструє властивості фіброзних розладів.

"Реакція" пацієнта або "реагування пацієнта" на лікування або терапію, наприклад, лікування, що включає антагоніст ІЛ-33 (наприклад, антагоніст, що зв'язує ІЛ-33 або ST2), або антагоніст ІЛ-4, стосується клінічної або терапевтичної переваги, наданої пацієнту, який перебуває під ризиком або який має ІЛ-33-опосередкований розлад (наприклад, астму, ХОЗЛ, АСОС, поліпи носа, або фіброз легень, наприклад, ідіопатичний фіброз легень) від або в результаті лікування. Така перевага може включати клітинні або біологічні відповіді, повну відповідь, часткову відповідь, стабільне захворювання (без прогресування або рецидиву) або відповідь з пізнішим рецидивом пацієнта від або в результаті терапії з антагоністом. Спеціаліст, що володіє професійними навичками в цій галузі, легко зможе визначити, чи пацієнт реагує. Наприклад, пацієнт, що страждає від астми, який реагує на терапію, яка включає антагоніст ІЛ-33 та/або антагоніст ІЛ-4, може демонструвати видиме та/або вимірне зменшення або відсутність одного або декількох з наведених нижче типових симптомів: рецидивуюча бронхообструкція, кашель, ускладнення дихання, напруженість у грудях, симптоми, які виникають або погіршуються вночі, симптоми, що викликаються холодним повітрям, фізичними вправами або впливом алергенів.

Крім того, "підвищена терапевтична ефективність" може бути визначена шляхом оцінки того, чи терапія з комбінацією антагоніста ІЛ-33 плюс антагоніста ІЛ-4Р призводить до помітного поліпшення принаймні одного симптому захворювання або розладу, або поліпшення щонайменше принаймні одного з біологічних параметрів, як визначено тут (наприклад, запалення легень, вивільнення цитокіну тощо) при порівнянні з результатами, досягнутими, коли вказаний антагоніст ІЛ-33 або антагоніст ІЛ-4Р використовують окремо. Будь-які біологічні показники ефективності, описані в цій заявці, можуть бути використані для визначення терапевтичної ефективності або її посилення.

Антагоністи ІЛ-33 і антагоністи ІЛ-4Р

Вказані способи по цьому винаходу включають введення пацієнту, що страждає на запальне захворювання або розлад, терапевтично ефективної кількості антагоніста ІЛ-33 у комбінації з

терапевтично ефективною кількістю антагоніста ІЛ-4Р.

Антагоністи ІЛ-33.

Термін "інтерлейкін-33 людини" або "ІЛ-33 людини" або "hІЛ-33", або "ІЛ-33" стосується 270 амінокислотного, повнорозмірного, непроцесованого ІЛ-33 (див., наприклад, SEQ ID NO: 348, або обліковий номер UniProtKB O95760), або його біологічно активного фрагменту, а також 5 будь-якої форми ІЛ-33, яка є результатом процесингу в клітині (див., наприклад, SEQ ID NO: 349, який містить амінокислотні залишки 112-270 вказаного повнорозмірного протеїну). Вказаний термін також охоплює варіанти ІЛ-33, природного походження, наприклад, сплайс- 10 варіанти (див., наприклад, Hong, et. al., (2011), J. Biol. Chem. 286 (22): 20078-20086), або алельні варіанти, або будь-яку іншу ізоформу ІЛ-33, таку як окислені або відновлені форми ІЛ-33, описані в WO2016/156440. Активність ІЛ-33, яку можна нейтралізувати, інгібувати, блокувати, скасувати, послабити, зменшити або порушити антитілом або його антиген-зв'язуючим 15 фрагментом згідно з цим винаходом, або пасткою ІЛ-33 згідно з цим винаходом, включає, але не обмежується, інгібування сигналіngu, опосередкованого рецептором ІЛ-33, або інгібування запалення, опосередкованого ІЛ-33.

Термін "антагоніст ІЛ-33", що використовується в цьому документі (також згадуваний в цьому документі як "інгібітор ІЛ-33", або "блокатор ІЛ-33") є будь-яким агентом, який інгібує 20 взаємодію ІЛ-33 з одним або кількома його партнерами зв'язування і таким чином може інгібувати ІЛ-33-опосередкований сигналінг. Наприклад, "антагоніст ІЛ-33" може зв'язуватися і/або взаємодіяти з ІЛ-33, або з рецептором ІЛ-33, який називається "пригнічення 25 туморогенності" ("ST2"), або з ко-рецептором ІЛ-33, який називають "акцесорним протеїном рецептора інтерлейкіну-1 ("IL-1RAcP"), або з комплексом будь-якого з наступного: ІЛ-33/ST2, або ST2/IL-1RAcP і таким чином, може інгібувати опосередкований ІЛ-33 сигналінг.

Необмежуючі приклади категорій антагоністів ІЛ-33 включають низькомолекулярні інгібітори 25 ІЛ-33, або антагоністи рецепторів, або нуклеїнові кислоти, які гібридизуються при жорстких умовах з послідовностями нуклеїнових кислот, що кодують або ІЛ-33, або рецептор ІЛ-33 або ко-рецептор (наприклад, короткі інтерферуючі RNA (siRNA) або короткі регулярно кластеризовані паліндромні повтори RNA (CRISPR-RNA або crRNA), включаючи одиночні 30 направляючі RNA (sgRNAs), що мають crRNA і послідовність tracrRNA, як описано в Mali et al. (Science. 339: 823-26, 2013), яка включена в цей документ шляхом посилання у повному об'ємі). Інші антагоністи ІЛ-33 включають протеїни, що містять ліганд-зв'язуючу частину рецептора ІЛ-33 (напр. ST2), каркасні ІЛ-33-зв'язуючі молекули (напр., DARPins, протеїни з HEAT повторами, протеїни з ARM повторами, протеїни з тетратрикопептидним повтором, каркасні конструкти на основі фібронектину та інші каркаси на основі природних протеїнів з повторами тощо. Лив., 35 напр., Boersma and Pluckthun, 2011, Curr. Opin. Biotechnol. 22:849-857 і посилання, наведені в ньому)), і анти-ІЛ-33 аптамери або їх частини.

Антитіла проти ІЛ-33

Згідно з певними варіантами реалізації цього винаходу, антагоністи або інгібітори ІЛ-33, які 40 можуть бути використані в контексті цього винаходу, є анти-ІЛ-33 антитілами або антиген-зв'язуючими фрагментами антитіл, які специфічно зв'язують ІЛ-33 людини. Ідентифікатори амінокислотних послідовностей для зразкових анти-ІЛ-33 антитіл для використання в описаних в цьому документі способах показані в Таблиці 1, а вказані ідентифікатори послідовності нуклеїнових кислот, що кодують ці ІЛ-33 антитіла, наведені в Таблиці 2.

В одному варіанті реалізації цього винаходу анти-ІЛ-33 антитіла, вказані в цьому документі, 45 для використання у вказаних способах цього винаходу, описані в US9,453,072, включеному в цей документ шляхом посилання.

Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу анти-ІЛ-33 антитіла, що використовуються в способах цього винаходу, специфічно зв'язуються з ІЛ-33. Термін "специфічно зв'язує" або подібні йому, означає, що антитіло або його антиген-зв'язуючий 50 фрагмент утворює комплекс з антигеном, який є відносно стабільним за фізіологічних умов. Способи для визначення того, чи специфічно антитіло зв'язується з антигеном, добре відомі в цій галузі і включають, наприклад, рівноважний діаліз, поверхневий плазмонний резонанс тощо. Наприклад, антитіло, яке "специфічно зв'язує" ІЛ-33, використовуване в контексті цього винаходу, включає антитіла, які зв'язуються з ІЛ-33 або його біологічно активною частиною з К_d 55 менше, ніж приблизно 1000 нМ, менше, ніж приблизно 500 нМ, менше, ніж приблизно 300 нМ, менше, ніж приблизно 200 нМ, менше, ніж приблизно 100 нМ, менше, ніж приблизно 90 нМ, менше, ніж приблизно 80 нМ, менше, ніж приблизно 70 нМ, менше, ніж приблизно 60 нМ, менше, ніж приблизно 50 нМ, менше, ніж приблизно 40 нМ, менше, ніж приблизно 30 нМ, менше, ніж приблизно 20 нМ, менше, ніж приблизно 10 нМ, менше, ніж приблизно 5 нМ, менше, 60 ніж приблизно 4 нМ, менше, ніж приблизно 3 нМ, менше, ніж приблизно 2 нМ, менше, ніж

приблизно 1 нМ або менше, ніж приблизно 0,5 нМ, як виміряно в аналізі поверхневого плазмонного резонансу. Ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язує ІЛ-33 людини, може, однак, мати перехресну реактивність з іншими антигенами, такими як молекули ІЛ-ІЛ-33 від інших видів (які не є людиною).

Згідно з деякими ілюстративними варіантами реалізації цього винаходу, вказаний антагоніст ІЛ-33 є антитілом проти ІЛ-33 або його антиген-зв'язуючим фрагментом, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), та/або ділянки, що визначають комплементарність (CDR), що включають будь-яку з амінокислотних послідовностей анти-ІЛ-33 антитіл, як викладено в Патенті США № 9,453,072 і в Таблиці 1, розкритій в цьому документі. У певних варіантах реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-33 є антитілом проти ІЛ-33, що має характеристики зв'язування еталонного антитіла, описаного в US9,453,072. В певних варіантах реалізації цього винаходу вказане анти-ІЛ-33 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, який може застосовуватись у вказаних способах цього винаходу включає ділянки, які визначають комплементарність важкого ланцюга (HCDRs) варіабельної ділянки важкого ланцюга (HCVR), які включають амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 274 і ділянки, які визначають комплементарність легкого ланцюга (LCDR) варіабельної ділянки легкого ланцюга (LCVR), які включають амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 282. Згідно певних варіантів реалізації цього винаходу вказане анти-ІЛ-33R антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент включає три HCDR (HCDR1, HCDR2 і HCDR3) і три LCDR (LCDR1, LCDR2 і LCDR3), причому вказана HCDR1 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 276, вказана HCDR2 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 278; вказана HCDR3 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 280; вказана LCDR1 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 284; вказана LCDR2 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 286; і вказана LCDR3 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 288. В інших варіантах реалізації цього винаходу анти-ІЛ-33 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містить HCVR, що включає SEQ ID NO: 274, і LCVR, що включає SEQ ID NO: 282.

В одному варіанті реалізації цього винаходу вказаний антагоніст ІЛ-33 є антитілом проти ІЛ-33, яке позначене як REGN3500, яке містить HCVR, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 274, і LCVR, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 282 і ділянки, що визначають комплементарність важкого ланцюга (HCDR1-HCDR2-HCDR3), що мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 276-278-280, відповідно і ділянки, що визначають комплементарність легкого ланцюга (LCDR1-LCDR2-LCDR3), що мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 284-286-288, відповідно.

Інші анти-ІЛ-33 антитіла та їх антиген-зв'язуючі фрагменти, які можуть бути використані в описаних в цьому документі способах, розкриті в EP1725261, US8187596, WO2011031600, WO2015099175, WO2015106080 (ANB020), US2016/0168242, WO2016/077381, WO2016/077366, або WO2016/156440, кожне з яких включене в цьому документі шляхом посилання у повному об'ємі.

ІЛ-33 пастки

Згідно з певними варіантами реалізації цього винаходу, антагоністи або інгібітори ІЛ-33, які можуть бути використані в контексті цього винаходу, є пастками на основі рецепторів ІЛ-33, такими як описані в цьому документі.

Описані в цьому документі пастки ІЛ-33 містять, щонайменше, один ІЛ-33-зв'язуючий домен, який містить ІЛ-33-зв'язуючу ділянку протеїна рецептора ІЛ-33, позначений ST2. У деяких варіантах пастка ІЛ-33 додатково містить позаклітинні частини ко-рецептора ІЛ-33, названі аксесорним протеїном рецептора ІЛ-1, або IL-1RAcP. Вказана пастка ІЛ-33 може також містити, щонайменше, один компонент, що мультимеризується, який функціонує для з'єднання різних компонентів пастки один з одним. Вказані різні компоненти пасток ІЛ-33 описані нижче і показані на Fig. 1.

В одному варіанті реалізації цього винаходу, описані в цьому документі ІЛ-33 пастки для використання у вказаних способах винаходу розкриті в US2014/0271642 і WO2014/152195, включені в цей документ шляхом посилання у повному об'ємі.

Коротко, вказані ІЛ-33 пастки включають перший ІЛ-33 зв'язуючий домен (D1), приєднаний до домену мультимеризації (M). У певних варіантах реалізації цього винаходу, антагоністи ІЛ-33, вказані у цьому винаході, містять другий ІЛ-33-зв'язуючий домен (D2), приєднаний до D1 та/або M. Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу, D1 містить ІЛ-33-зв'язуючу частину протеїна ST2. Згідно з певними варіантами реалізації цього винаходу, D2 включає позаклітинну частину протеїна IL-1RAcP.

Окремі компоненти ІЛ-33 пасток можуть бути розташовані один відносно одного різними способами, що призводить до появи функціонально антагоністичних молекул, здатних

зв'язувати ІЛ-33. Наприклад, D1 та/або D2 можуть бути приєднані до N-кінця М. В інших варіантах реалізації цього винаходу D1 та/або D2 приєднані до С-кінця М. В інших варіантах реалізації цього винаходу D1 приєднаний до N-кінця D2 і D2 приєднаний до N-кінця М, в результаті чого відбувається одноосьове злиття, від N- до С-кінця, молекули антагоніста, представленої формулою D1-D2-M. Інші орієнтації окремих компонентів розкриті в іншій частині документу на Фіг.1.

Необмежуючі приклади ІЛ-33 пасток для використання у вказаних способах цього винаходу показані в Таблицях 3a і 3b і включають вказані ІЛ-33 пастки, позначені "hST2-hFc," "hST2-mFc, hST2-hIL1RAcP-mFc," "hST2-hIL1RAcP-hFc" і "mST2-mIL1RAcP-mFc". Вони відповідають SEQ ID NO: 323, 324, 325, 326 і 327, відповідно. Цей винахід включає пастки на основі рецептора ІЛ-33, що мають амінокислотну послідовність, яка є щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною будь-якій зі ілюстративних пасток на основі рецептора ІЛ-33, викладені в цьому документі (наприклад, SEQ ID NO: 323, 324, 325, 326 і 327).

Стандартні молекулярно-біологічні методи (напр., технологія рекомбінантної ДНК) може бути використана для конструювання будь-якої з пасток ІЛ-33 цього винаходу або його варіантів.

Вказані ІЛ-33 пастки для застосування у вказаних способах цього винаходу включають щонайменше один ІЛ-33-зв'язуючий домен (іноді згаданий тут за назвою "D", "D1", "D2" тощо). У деяких варіантах реалізації цього винаходу, ІЛ-33-зв'язуючий домен містить ІЛ-33-зв'язуючу ділянку білка ST2. ІЛ-33-зв'язуюча частина протеїна ST2 може містити або складатися з цілісного або частини позаклітинного домену білка ST2. У деяких варіантах реалізації цього винаходу протеїн ST2 є протеїном ST2 людини. "Протеїн ST2 людини", як використовується в цьому документі, стосується протеїна ST2, як показано в амінокислотах 1-556 номера доступу NP_057316.3, показаного також як SEQ ID NO: 352. У певних варіантах реалізації цього винаходу протеїн ST2 є протеїном ST2 від виду, що не є людиною (напр., ST2 миші, ST2 мавпи і т.д.). Зразкова ІЛ-33-зв'язуюча частина протеїна ST2 описана в цьому документі як амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 328 (що відповідає позаклітинному домену ST2 людини [номер доступу NCBI K19-S328. NP_057316.3]). Інші приклади ІЛ-33-зв'язуючої частини протеїну ST2 викладені в цьому документі як амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 329 (що відповідає позаклітинному домену ST2 миші [номер доступу NCBI S27-R332. P14719]).

У деяких варіантах реалізації цього винаходу, ІЛ-33-зв'язуючий домен містить позаклітинну частину протеїна IL-1RAcP. У деяких варіантах реалізації цього винаходу протеїн IL-1RAcP є протеїном IL-1RAcP людини. Використовуваний в цьому документі "протеїн IL-1RAcP людини" стосується протеїна IL-1RAcP, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 353. У певних варіантах реалізації цього винаходу вказаний протеїн IL-1RAcP є протеїном IL-1RAcP від виду, що не є людиною (напр., IL-1RAc миші, IL-1RAc мавпи і т.д.). Зразкова позаклітинна частина протеїна IL-1RAcP викладена в цьому описі як амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 330 (що відповідає позаклітинному домену IL-1RAcP людини [номер доступу NCBI S21-E359. Q9NPH3]). Інший приклад позаклітинної частини білка IL-1RAcP викладений у цьому документі як амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 331 (що відповідає позаклітинному домену IL-1RAcP миші [номер доступу NCBI S21-E359. Q61730]).

Цей винахід включає пастки ІЛ-33, що включають компоненти D1 та/або D2, що мають амінокислотну послідовність, яка є щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною будь-якій з амінокислотних послідовностей зразкового компонента ІЛ-33-зв'язуючого домену, викладені в цьому документі (напр., SEQ ID NO: 328, 329, 330 і 331).

Вказані антагоністи ІЛ-33 цього винаходу також містять щонайменше один домен мультимеризації, (іноді згадуваний тут аббревіатурою "М", "M1", "M2" і т.д.). Загалом, домен(и) мультимеризації цього винаходу функціону(є)ють для з'єднання вказаних різних компонентів антагоністів ІЛ-33 (напр., вказані(ний) ІЛ-33-зв'язуючі(ий) домен(и)) один з одним. Як використовується в цьому описі, "домен мультимеризації" є будь-якою макромолекулою, яка має здатність асоціювати (ковалентно або нековалентно) з другою макромолекулою тієї ж самої або подібної структури або будови. Наприклад, домен мультимеризації, може бути поліпептидом, що включає імуноглобулін C_{H3} домен. Необмежуючим прикладом домену мультимеризації, є Fc-частина імуноглобуліну, напр. домен Fc IgG, вибраний з ізотипів IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4, а також будь-який аллотип у кожній групі ізотипу.

Необмежуючі ілюстративні домени мультимеризації, які можуть бути використані в антагоністах ІЛ-33 цього винаходу, включають Fc-IgG1 людини (ID NO: 332) або Fc миші IgG2a (ID NO: 333). Цей винахід включає антагоністи ІЛ-33, що включають М-компоненти, які мають

амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичності до будь-якої зі ілюстративних амінокислотних послідовностей М-компонентів, викладених в цьому документі (напр. ID NO: 332 або 333).

У певних варіантах реалізації цього винаходу, антагоністи ІЛ-33 цього винаходу містять два домени мультимеризації, М1 і М2, де М1 і М2 ідентичні один одному. Наприклад, М1 може бути Fc-доменом, що має певну амінокислотну послідовність, і М2 є Fc-доменом з тією ж амінокислотою послідовністю, що і М1.

Окремі компоненти вказаних антагоністів ІЛ-33 цього винаходу (напр., D1, D2, М і т.д.) можуть бути розташовані один відносно одного різними способами. Необмежуючі приклади всіх вищезазначених розташувань схематично проілюстровані на Фіг.1.

Необмежуючі ілюстративні приклади ІЛ-33 пасток для застосування у вказаних методах цього винаходу, що включають два домени мультимеризації (М1 і М2) і чотири ІЛ-33 зв'язуючих домени (D1, D2, D3 і D4) також показані на Фіг.1, розташування С і D).

Окремі компоненти вказаних ІЛ-33 пасток по цьому винаходу (напр., D1, D2, М1, М2 тощо) можуть бути приєднані один до одного безпосередньо (напр., D1 та/або D2 можуть бути безпосередньо приєднані до М і т.д.); альтернативно, окремі компоненти можуть бути приєднані один до одного через лінкерний компонент (напр. D1 та/або D2 можуть бути приєднані до М через лінкер, орієнтований між окремими компонентами; D1 може бути приєднаний до D2 через лінкер; і т.д.). У будь-якому з описаних тут розташувань, де один компонент описується як "приєднаний" до іншого компонента, приєднання може бути через лінкер (навіть якщо воно спеціально не позначено). Як використовується в цьому документі, "лінкер" є будь-якою молекулою, яка з'єднує два поліпептидні компоненти разом.

Біологічні характеристики вказаних ІЛ-33 пасток для використання у вказаних способах цього винаходу описані в US2014/0271642 і в WO2014/152195, включеному шляхом посилання у повному об'ємі у цьому документі.

Інші антагоністи ІЛ-33

Поліпептиди, які зв'язують ІЛ-33 та/або його рецептор (ST2 та/або ІЛ-1 RAcP) і блокують ліганд-рецепторну взаємодію, розглядаються як антагоністи ІЛ-33 і розкриті в WO2014/152195, яке включене шляхом посилання у повному об'ємі. Інші агенти, які можуть діяти як антагоністи ІЛ-33 і які можуть бути використані у вказаних способах цього винаходу, включають імуноадгезини, пептитіла і розчинний ST2 або їх похідні; антитіла проти ІЛ-33 рецепторів (наприклад, анти-ST2-антитіла, наприклад, AMG-282 (Amgen) або STLM15 (Janssen) або будь-які антитіла проти ST2, описані в WO2012/113813, WO 2013/173761, WO 2013/165894, US8,444,987 або US 7,452,980, які кожне включене в цей документ шляхом посилання у повному об'ємі. Інші антагоністи ІЛ-33 для застосування у вказаних способах цього винаходу включають білки ST2-Fc, такі як описані в WO2013/173761 або WO 2013/165894, які кожне включене в цей документ у якості посилання у повному об'ємі.

ІЛ-4Р антагоністи

Як використовується в цьому документі, "антагоніст ІЛ-4Р" (також згадуваний в цьому документі як "інгібітор ІЛ-4Р", "антагоніст ІЛ-4Р α ", "блокатор ІЛ-4Р", "блокатор ІЛ-4Р α ", тощо) є будь-яким агентом, який зв'язується або взаємодіє з ІЛ-4Р α або лігандом ІЛ-4Р, і інгібує або послаблює нормальну біологічну сигнальну функцію рецептора 2 ІЛ-4 типу 1 та/або типу. Термін "ІЛ-4Р людини" або "hІЛ-4Р", як використовується в цьому документі, стосується ІЛ-4Р, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 347, або її біологічно активний фрагмент. Рецептор ІЛ-4 типу 1 є димерним рецептором, що включає ланцюг ІЛ-4Р і ланцюг γ с. Рецептор ІЛ-4 типу 2 є димерним рецептором, що включає ланцюг ІЛ-4Р і ланцюг ІЛ-13R α 1. Рецептори ІЛ-4 типу 1 взаємодіють з ІЛ-4 і стимулюються ним, тоді як ІЛ-4-рецептори типу 2 взаємодіють як з ІЛ-4, так і з ІЛ-13 і стимулюються ними. Таким чином, вказані антагоністи ІЛ-4Р, які можуть бути використані у вказаних способах цього винаходу, можуть функціонувати шляхом блокування опосередкованого ІЛ-4 сигналіну, опосередкованого ІЛ-13 сигналіну, або опосередкованого як ІЛ-4-, так і ІЛ-13- сигналіну. Вказані антагоністи ІЛ-4Р цього винаходу можуть, таким чином, перешкоджати взаємодії ІЛ-4 та/або ІЛ-13 з рецептором типу 1 або 2.

Необмежуючі приклади категорій ІЛ-4Р -антагоністів включають низькомолекулярні ІЛ-4Р -антагоністи, інгібітори експресії або активності ІЛ-4Р на основі нуклеїнової кислоти напр., siRNA або анти-смыслові), молекули на основі пептидів, які специфічно взаємодіють з ІЛ-4Р (напр., пептитіла), "рецептор-тіла" (напр. зконструйовані молекули, що включають ліганд-зв'язуючий домен компонента ІЛ-4Р), ІЛ-4Р -зв'язуючі каркасні молекули (напр., DARPins, протеїни з HEAT-повторами, протеїни з ARM повторами, протеїни з тетратрикопептидними повторами, конструкти каркасів на основі фібронектину та інші каркаси на основі природних протеїнів з повторами тощо. Див., напр., Boersma та Pluckthun, 2011, Curr. Opin. Biotechnol. 22:849-857 і

посилання, наведені в ньому)), і анти-ІЛ-4Р аптамери або їх частини. Згідно з певними варіантами реалізації цього винаходу, антагоністи або інгібітори ІЛ-4Р, які можуть бути використані в контексті цього винаходу, є анти-ІЛ-4Р антитілами або антиген-зв'язуючими фрагментами антитіл, які специфічно зв'язують ІЛ-4Р людини.

5 В одному варіанті реалізації цього винаходу анти-ІЛ-4Р -антитіло, яке описано в цьому документі для використання у вказаних способах цього винаходу, є дупілумабом (див. також Патенти США 7,605,237; 7,608,693 і 9,290,574).

Анти-ІЛ-4Р антитіла

10 Згідно з деякими ілюстративними варіантами реалізації цього винаходу антагоніст ІЛ-4Р є антитілом проти ІЛ-4Р α або його антиген-зв'язуючим фрагментом, який специфічно зв'язується з ІЛ-4Р α . Термін "специфічно зв'язує" або подібні йому, означає, що антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент утворює комплекс з антигеном, який є відносно стабільним за фізіологічних умов. Способи для визначення того, чи специфічно антитіло зв'язується з антигеном, добре відомі в цій галузі і включають, наприклад, рівноважний діаліз, поверхневий
15 плазмонний резонанс тощо. Наприклад, антитіло, яке "специфічно зв'язує" ІЛ-4, використовуване в контексті цього винаходу, включає антитіла, які зв'язують ІЛ-4 α або їх біологічно активну частину з K_D менше, ніж приблизно 1000 нМ, менше, ніж приблизно 500 нМ, менше, ніж приблизно 300 нМ, менше, ніж приблизно 200 нМ, менше, ніж приблизно 100 нМ, менше, ніж приблизно 90 нМ, менше, ніж приблизно 80 нМ, менше, ніж приблизно 70 нМ,
20 менше, ніж приблизно 60 нМ, менше, ніж приблизно 50 нМ, менше, ніж приблизно 40 нМ, менше, ніж приблизно 30 нМ, менше, ніж приблизно 20 нМ, менше, ніж приблизно 10 нМ, менше, ніж приблизно 5 нМ, менше, ніж приблизно 4 нМ, менше, ніж приблизно 3 нМ, менше, ніж приблизно 2 нМ, менше, ніж приблизно 1 нМ або менше, ніж приблизно 0,5 нМ, як виміряно в аналізі поверхневого плазмонного резонансу. Ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язує ІЛ-4 α людини, може, однак, мати перехресну реактивність з іншими антигенами, такими як молекули ІЛ-4Р α від інших видів (які не є людиною).

Згідно з деякими ілюстративними варіантами реалізації цього винаходу, вказаний антагоніст ІЛ-4Р є анти-ІЛ-4Р α антитілом або його антиген зв'язуючим фрагментом, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR),
30 та/або ділянки, що визначають комплементарність (CDR), що включають будь-яку з амінокислотних послідовностей анти-ІЛ-4Р антитіл, як викладено в Патенті США №7,605,237 і 7,608,693. У певних варіантах реалізації цього винаходу антагоніст ІЛ-4Р є антитілом проти ІЛ-4Р, що має характеристики зв'язування еталонного антитіла, згаданого в цьому описі як дупілумаб (див. US7,605,237 та US, 608,693). В певних варіантах реалізації цього винаходу вказане анти-ІЛ-4 α антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, який може застосовуватись у вказаних способах цього винаходу включає ділянки, які визначають комплементарність важкого ланцюга (HCDRs) варіабельної ділянки важкого ланцюга (HCVR), які включають амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 337 і ділянки, які визначають комплементарність легкого ланцюга (LCDR) варіабельної ділянки легкого ланцюга (LCVR), які включають амінокислотну
40 послідовність з SEQ ID NO: 338. Згідно певних варіантів реалізації цього винаходу вказане анти-ІЛ-4Р α антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент включає три HCDR (HCDR1, HCDR2 і HCDR3) і три LCDR (LCDR1, LCDR2 і LCDR3), причому вказана HCDR1 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 339, вказана HCDR2 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 340; вказана HCDR3 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 341; вказана LCDR1 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 342; вказана LCDR2 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 343; і вказана LCDR3 включає амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 344. В інших варіантах реалізації цього винаходу анти-ІЛ-4 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містить HCVR, що включає SEQ ID NO: 337, і LCVR, що включає SEQ ID NO: 338. В інших варіантах реалізації цього винаходу вказане анти-ІЛ-4Р
50 антитіло або його антиген- зв'язуючий фрагмент містить HCVR, що включає SEQ ID NO: 335, і LCVR, що включає SEQ ID NO: 336. В інших варіантах реалізації цього винаходу анти- ІЛ-4Р антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга (HC), як викладено в ID NO: 345, і амінокислотну послідовність легкого ланцюга (LC), як викладено в ID NO: 346. Згідно з деякими ілюстративними варіантами реалізації цього винаходу, вказані способи по справжньому винаходу включають застосування анти-ІЛ-4Р α антитіла, згаданого і відомого в цій галузі техніки, як дупілумаб, або його біоеквіваленту. Дупілумаб містить HCVR, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 337, і LCVR, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 338 і ділянки, що визначають комплементарність важкого ланцюга (HCDR1-HCDR2-HCDR3), мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 339-
60 340-341, відповідно і ділянки, що визначають комплементарність легкого ланцюга (LCDR1-

LCDR2-LCDR3), мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 342-343-344, відповідно.

Інші анти-ІЛ-4Р α -антитіла, які можуть бути використані в контексті вказаних способів цього винаходу, включають, напр. вказане антитіло, що згадується і відоме в цій галузі техніки як AMG317 (Corren et al., 2010, Am J Respir Crit Care Med., 181(8): 788-796), або MEDI 9314, або
 5 будь-яке з антитіл проти ІЛ-4Р α , як викладено в Патенті США №7,186,809, Патенті США №7,605,237, Патенті США №7,638,606, Патенті США № 8,092,804 Патент США № 8,679,487 або Патент США №8,877,189.

pH-залежні характеристики анти-ІЛ-4 та/або анти-ІЛ-33 антитіл

Вказані анти-ІЛ-4Р α і ІЛ-33 антитіла, що використовуються в контексті способів по цьому
 10 винаходу, можуть мати pH-залежні зв'язувальні характеристики. Наприклад, анти-ІЛ-4Р α -антитіло або анти-ІЛ-33-антитіло для застосування в способах цього винаходу може демонструвати знижене зв'язування з ІЛ-4Р α , або ІЛ-33 відповідно, при кислому pH порівняно з нейтральним pH. Альтернативно, анти-ІЛ-4Р α -антитіло цього винаходу або анти-ІЛ-33-антитіло
 15 цього винаходу може проявляти підвищене зв'язування з його антигеном при кислому pH порівняно з нейтральним pH. Вираз "кислий pH" включає значення pH менше приблизно 6,2, напр., приблизно 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 або менше. Як використовується в цьому документі, вираз "нейтральний pH" означає pH приблизно від 7,0 до приблизно 7,4. Вираз "нейтральний pH" включає значення pH близько 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 і 7,4.

У деяких випадках, "знижене зв'язування з ІЛ-4Р α при кислому pH порівняно з нейтральним pH", або "знижене зв'язування з ІЛ-33 при кислому pH порівняно з нейтральним pH" виражається через співвідношення значення K_D зв'язування вказаного антитіла з ІЛ-4Р α , або ІЛ-33, відповідно при кислому pH до значення K_D зв'язування антитіла з ІЛ-4Р α , або ІЛ-33, відповідно при нейтральному pH (або навпаки). Наприклад, антитіло або його антиген-
 25 зв'язуючий фрагмент можна вважати таким, що проявляє "знижене зв'язування з ІЛ-4Р α при кислому pH порівняно з нейтральним pH", або "знижене зв'язування з ІЛ-33 при кислому pH порівняно з нейтральним pH" для цілей цього винаходу, якщо антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент демонструє коефіцієнт співвідношення K_D кислий/нейтральний приблизно 3,0 або більше. У певних зразкових варіантах реалізації цього винаходу коефіцієнт співвідношення K_D кислий/ нейтральний для антитіла або антиген-зв'язуючого фрагмента по
 30 цьому винаходу може становити близько 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, \ t 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 або більше.

Можуть бути отримані антитіла з pH-залежними характеристиками зв'язування, напр.
 35 шляхом скринінгу популяції антитіл для зниженого (або посиленого) зв'язування з певним антигеном при кислому pH порівняно з нейтральним pH. Крім того, модифікації вказаного антиген-зв'язуючого домену на рівні амінокислот можуть давати антитіла з pH-залежними характеристиками. Наприклад, шляхом заміщення однієї або більше амінокислот антиген-зв'язуючого домену (напр. в межах CDR) залишком гістидину може бути отримано антитіло зі
 40 зниженим антиген-зв'язуванням при кислому pH щодо нейтрального pH. Як використовується в цьому описі, вираз "кислий pH" означає pH 6,0 або менше.

Біологічні ефекти антагоністів ІЛ-33 та ІЛ-4Р, що застосовуються у комбінованій терапії

Цей винахід включає застосування антагоніста ІЛ-33 в комбінації з антагоністом ІЛ-4Р для лікування запального стану. В одному варіанті здійснення, застосування антитіла проти ІЛ-33 в
 45 комбінації з антитілом проти ІЛ4R у моделі фіброзу і запалення легень на тваринах демонструє підвищену ефективність порівняно з результатами, отриманими, коли кожне антитіло застосовується окремо в якості монотерапії.

Наприклад, в описаній тут моделі на тваринах (яка називається моделлю запалення і фіброзу легень під дією кліща домашнього пилу (HDM) рівень деяких цитокінів в легенях значно
 50 підвищений. Це включає підвищення ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-1 β і MCP-1. Спостерігалася також тенденція до підвищення рівнів ІЛ-13 і ФНП α в легенях мишей після введення алергену кліща домашнього пилу. Однак, при тестуванні в цій моделі, комбіноване застосування вказаного антитіла проти ІЛ-33 і антитіла проти ІЛ-4Р призводило до зниження рівнів цитокінів ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-13, ІЛ-1 β , MCP-1 і ФНП α в легенях оброблених мишей. Вплив на рівні цитокінів легень,
 55 що спостерігається при поєднанні анти-ІЛ-33 і анти-ІЛ-4Р антитіл був більшим, ніж терапія будь-яким індивідуальним антитілом при використанні окремо, як показано в Прикладі 4.

Крім того, рівні генів цитокінів, генів хемокинів і генів колагену, включаючи ІЛ4, ІЛ13, ІЛ6, Ccl2, Tgfb1, ІЛ13ra2 і Col24a1, були підвищені у мишей, які отримували алергени домашнього пилу мишей. Відзначалася тенденція до підвищення рівнів ІЛ5, ІЛ9, Ccl11, Ccl24, Tnf, ІЛ1rl1, і
 60 Col15a1 в цій моделі. Після терапії комбінацією анти-ІЛ-33-антитіла і анти-ІЛ-4Р -антитіла

спостерігалось значне зниження експресії IL6, Ccl2, Ccl11 і Ccl24, у порівнянні з рівнями, які спостерігаються при терапії будь-яким з цих антитіл окремо. Також спостерігалася тенденція до зниження IL4, IL5, IL13, IL9, Tnf, Tgfb1, IL1rl1, IL13ra2, Col15a1 і Col24a1 коли мишам вводили анти-IL-33 антитіло плюс анти-IL-4P -антитіло, порівняно з терапією будь-яким з цих антитіл окремо.

Інший біологічний ефект, пов'язаний з комбінованим застосуванням анти-IL-33 плюс анти-IL-4P антитіл, спостерігався, коли був проведений аналіз на легеневих клітинних інфільтратах в моделі кліща домашнього пилу. Як показано в Прикладі 4, частота еозинофілів, активованих В-клітин, активованих клітин CD8, ST2+CD4+ Т-клітин і співвідношення CD4/CD8 Т-клітин була значно вищою у мишей, які отримували алерген кліщів домашнього пилу. Спостерігалася також тенденція до збільшення частоти активованих CD4+ Т-клітин у легенях мишей, які отримували алерген кліща домашнього пилу. Спостерігалася тенденція до зниження частоти еозинофілів, активованих В-клітин, активованих клітин CD8, ST2+CD4+ Т-клітин і співвідношення CD4/CD8 Т-клітин у мишей, які отримували як анти-IL-33 антитіло, так і анти-IL-4P -антитіло у порівнянні з тим, що спостерігали, коли будь-яке антитіло застосовувалося окремо.

Крім того, миші, які отримували алерген кліщів домашнього пилу, також демонструють збільшення метаплазії келихоподібних клітин в легенях. Аналогічним чином, у цій моделі на мишах спостерігалось також збільшення консолідації легень (накопичення твердого або рідкого матеріалу в альвеолярному просторі) і субепітеліальний фіброз (надлишок відкладення інтерстиціального колагену під легеневим епітелієм). Лікування цих мишей анти-IL-33 антитілом у комбінації з анти-IL-4P антитілом призвело до зниження метаплазії келихоподібних клітин і товщини субепітеліального колагену і значного зниження консолідації легень порівняно з результатами коли одне з двох антитіл було використане окремо.

Миші, які отримували алерген кліщів домашнього пилу, також продемонстрували збільшення рівня циркулюючих IgE, а також тенденцію до збільшення IgG1, специфічних до кліщів домашнього пилу (HDM). Введення як анти-IL-33 антитіла, так і антитіла проти IL-4P призводило до значного зниження рівнів сироваткового IgE і тенденції до зниження HDM-специфічних IgG1 порівняно з рівнями IgE і HDM-специфічних IgG1, що спостерігалися, коли антитіла використовували окремо.

Антагоніст IL-33 і антагоніст IL-4P, такі як описані тут антитіла для застосування в якості комбінованої терапії для лікування запальних легеневих порушень або станів, можуть інгібувати або послаблювати IL-33-опосередкований сигналінг і IL-4P -опосередкований сигналінг і можуть проявляти одне або більше біологічних властивостей, що спостерігаються в моделі HDM, описаній в цьому документі, наприклад, (1) зниження рівнів цитокінів, які підвищені у свавця в результаті експозиції до алергену, напр. IL-4 або IL-5; (2) інгібування запалення легень внаслідок гострої або хронічної експозиції до алергену (напр. кліщі домашнього пилу (HDM)); (3) зниження клітинної інфільтрації легень, що виникає внаслідок гострої або хронічної експозиції до алергену (напр. кліщі домашнього пилу (HDM)); (4) поліпшення складної легеневої макропатології.

Інгібування IL-33-опосередкованого сигналінгу або IL-4P –опосередкованого сигналінгу може бути виміряно в біотестах на основі клітин і означає, що анти-IL-33 антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент або анти-IL-4P антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент інгібує або зменшує сигнал, що продукується в клітинах, які експресують рецептор IL-33 або рецептор IL-4, і репортерний елемент, який виробляє сигнал, що детектується у відповідь на зв'язування IL-33 або зв'язування IL-4. Наприклад, цей винахід включає антитіла і їх антиген-зв'язуючі фрагменти, які блокують IL-33-опосередкований сигналінг або опосередкований IL-4 сигналінг в клітинах, що експресують ST2 людини, або в клітинах, що експресують рецептор IL-4, відповідно, з IC₅₀ менше ніж приблизно 2 нМ, менше ніж приблизно 1 нМ, менше ніж приблизно 900 пМ, менше ніж приблизно 800 пМ, менше ніж приблизно 700 пМ, менше ніж приблизно 600 пМ, менше ніж приблизно 500 пМ, менше ніж приблизно 400 пМ, менше ніж приблизно 350 пМ, менше ніж приблизно 300 пМ, менше ніж приблизно 250 пМ, менше ніж приблизно 200 пМ, менше ніж приблизно 150 пМ, менше ніж приблизно 100 пМ, менше ніж приблизно 90 пМ, менше ніж приблизно 80 пМ, менше, ніж приблизно 70 пМ, менш ніж приблизно 60 пМ, менше ніж приблизно 50 пМ, менше ніж приблизно 40 пМ, менше ніж приблизно 30 пМ, менше ніж приблизно 20 пМ, або менше ніж приблизно 10 пМ, як виміряно в клітинному блокувальному біоаналізі.

Антитіла по цьому винаходу можуть демонструвати один або більше з вищезазначених біологічних ефектів або будь-яку їх комбінацію. Інші біологічні ефекти антитіл цього винаходу будуть очевидні для фахівця в цій області техніки з огляду цього опису, включаючи робочі Приклади, наведені в цьому документі. Використання інших антагоністів IL-33 в комбінації з

антагоністом ІЛ-4 може демонструвати подібні ефекти.

Фармацевтичні композиції та введення

Цей винахід забезпечує фармацевтичні композиції, що включають антагоністи ІЛ-33, та/або антагоністи ІЛ-4Р цього винаходу. Вказані антагоністи ІЛ-33 і антагоністи ІЛ-4Р можуть бут
5 приготовлені у вигляді окремих композицій, або вони можуть бути у приготовлені в одній композиції. Фармацевтичні композиції цього винаходу є готуються з відповідними носіями, наповнювачами та іншими агентами, які забезпечують поліпшення переносу, доставки, толерантності тощо. Багато відповідних препаратів можна знайти у рецептурному формулярі, відомому всім фармацевтичним хімікам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing
10 Company, Easton, PA. Ці формуляції включають, наприклад, порошки, пасти, мазі, желе, воски, масла, ліпіди, ліпідвмісні (катіонні або аніонні) везикули (такі як LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), кон'югати ДНК, безводні абсорбційні пасти, емульсії масло-у-воді і вода-в-маслі, емульсії карбоваксу (поліетиленгліколі різних молекулярних мас), напівтверді гелі і напівтверді суміші, що містять карбовакс. Див. також Powell et al. "Compendium of excipients for
15 parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Вказана доза антитіла, що вводиться пацієнту, може змінюватися в залежності від віку і розміру пацієнта, цільового захворювання, умов, способу введення тощо. Переважна доза зазвичай розраховується відповідно до маси тіла або площі поверхні тіла. Коли антитіло по цьому винаходу використовується для лікування стану або захворювання, пов'язаного з
20 активністю ІЛ-33, та/або ІЛ-4 у дорослого пацієнта, може бути перевагою внутрішньовенне введення антитіла цього винаходу зазвичай в одноразовій дозі від приблизно 0,01 до приблизно 20 мг/кг ваги тіла, більш бажано приблизно від 0,02 до приблизно 7, приблизно від 0,03 до приблизно 5 або від приблизно 0,05 до приблизно 3 мг/кг ваги тіла. Залежно від тяжкості стану, частоту і тривалість лікування можна корегувати. Ефективні дози і графіки введення антитіл проти ІЛ-33 можуть бути визначені емпірично; наприклад, прогрес пацієнта може контролюватися періодичною оцінкою, і доза регулюється відповідно. Більше того, міжвидове масштабування доз може бути виконане з використанням добре відомих методів в цій галузі
25 техніки (напр., Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Відомі різні системи доставки, які можуть бути використані для введення фармацевтичної композиції цього винаходу, напр., інкапсулювання в ліпосоми, мікрочастинки, мікрокапсули, рекомбінантні клітини, здатні експресувати мутантні віруси, опосередкований рецептором ендцитоз (див., наприклад, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способи введення включають, але не обмежуються ними, внутрішньошкірні, внутрішньом'язові, внутрішньобрюшинні, внутрішньовенні, підшкірні, інтраназальні, епідуральні та пероральні шляхи. Вказану композицію можна вводити будь-яким зручним способом, наприклад, шляхом інфузії або болюсної ін'єкції, шляхом абсорбції через епітеліальні або слизові оболонки (наприклад, слизова оболонка порожнини рота, ректальна і слизова оболонка кишечника тощо) і можуть вводитися разом з іншими біологічно активними агентами. Введення може бути системним або місцевим.
30

Фармацевтична композиція по цьому винаходу може бути доставлена підшкірно або внутрішньовенно стандартною голкою і шприцом. Крім того, що стосується підшкірної доставки, шприц-ручка придатний для доставки фармацевтичної композиції цього винаходу. Такий шприц-ручка може бути багаторазовим або одноразовим. Багаторазовий шприц-ручка зазвичай використовує змінний картридж, який містить фармацевтичну композицію. Після введення всієї фармацевтичної композиції з картриджу і спорожнення картриджу, порожній картридж можна легко викинути і замінити новим картриджем, який містить фармацевтичну композицію. Далі шприц-ручку можна повторно використовувати. На одноразовому шприці-ручці немає змінного картриджа. Точніше, вказаний одноразовий шприц-ручка поставляється попередньо заповненим фармацевтичної композицією, що міститься в резервуарі всередині пристрою. Як
45 тільки резервуар спорожнюється від фармацевтичної композиції, весь пристрій викидається.

Численні багаторазові шприци-ручки і шприц-тубик мають застосування для підшкірної доставки фармацевтичної композиції по цьому винаходу. Приклади включають, але не обмежуються ними, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручка DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Швейцарія), шприц-ручка HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручка HUMALOG™, HUMALIN 70/30™ шприц-ручка (Eli Lilly & Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II і III (Ново Нордиск, Копенгаген, Данія), NOVOPEN JUNIOR™ (Ново Нордиск, Копенгаген, Данія), BD™ шприц-пен (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ і OPTICLIK™ (санофі-авентіс, Франкфурт, Німеччина), щоб назвати лише декілька. Приклади одноразових шприц-ручок, що мають застосування для
50 доставки фармацевтичної композиції по цьому винаходу, включають, але не обмежуються,

шприц-ручками SOLOSTAR™ (санофі-авентіс), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) і KWIKPEN™ (Eli. Lilly), шприц-тюбик SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Німеччина), EPIPEN (Dey, LP), і HUMIRA™ шприц-ручка (Abbott Labs, Abbott Park IL), щоб назвати лише декілька.

У певних ситуаціях вказана фармацевтична композиція може бути доставлена в системі контрольованого вивільнення. В одному варіанті реалізації цього винаходу може використовуватися насос (див. Langer, вище; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В іншому варіанті реалізації цього винаходу можна використовувати полімерні матеріали; див. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Ще в одному варіанті реалізації цього винаходу система контрольованого вивільнення може бути розміщена в безпосередній близькості від мішені композиції, таким чином потрібна лише частка системної дози (див. напр., Goodson, 1984, Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Інші системи регульованого вивільнення обговорюються в огляді Langer, 1990, Science 249: 1527-1533.

Препарати для ін'єкцій можуть включати лікарські форми для внутрішньовенних, підшкірних, внутрішньошкірних та внутрішньом'язових ін'єкцій, крапельних інфузій тощо. Ці ін'єкційні препарати можуть бути отримані загальновідомими способами. Наприклад, можуть бути приготовані ін'єкційні препарати, напр. шляхом розчинення, суспендування або емульгування вказаного антитіла або його солі, описаного вище, в стерильному водному середовищі або масляному середовищі, звичайно використовуваному для ін'єкцій. В якості водного середовища для ін'єкцій є, наприклад, фізіологічний розчин, ізотонічний розчин, що містить глюкозу та інші допоміжні агенти і т.д., які можуть бути використані в комбінації з відповідним солюбілізуючим агентом, таким як спирт (наприклад, етанол), поліспирт (наприклад, пропіленгліколь, поліетиленгліколь), неіонні поверхнево-активні речовини [наприклад, полісорбат 80, HCO-50 (поліоксетилен (50 моль) аддукт гідрованої касторової олії)] і т.д. В якості масляного середовища використовують, наприклад, кунжутне масло, соєве масло і т.д., які можуть бути використані в комбінації з солюбілізуючим агентом, таким як бензилбензоат, бензиловий спирт і т.д. Отриманою таким чином ін'єкцією бажано наповнити відповідну ампулу.

Переважно, фармацевтичні композиції для перорального або парентерального застосування, описані вище, готуються в лікарських формах в одиничній дозі, придатній для дози прийому вказаних активних інгредієнтів. Такі лікарські форми в одиничній дозі включають, наприклад, таблетки, пігулки, капсули, ін'єкції (ампули), супозиторії та ін. Кількість зазначених вище антагоністів, як правило, становить від приблизно 5 до приблизно 500 мг на лікарську форму в одиничній дозі; особливо у формі ін'єкції, бажано, щоб вищезазначені антагоністи містилися в кількості приблизно від 5 до приблизно 100 мг і приблизно від 10 до приблизно 250 мг для інших лікарських форм.

Дозування

Вказана кількість ІЛ-33 і антагоніста ІЛ-4Р, введеного суб'єкту згідно способів цього винаходу, є, як правило, терапевтично ефективною кількістю. Як використовується в цьому описі, фраза "терапевтично ефективна кількість" означає кількість антагоніста ІЛ-33 і антагоніста ІЛ-4Р, яка при використанні в комбінації призводить до значної зміни в одному або більше з наступного: (а) попередження запалення; (б) лікування або зниження тяжкості запалення; (с) зниження частоти одного або декількох з наступних: еозинофілів, активованих В-клітин, активованих CD8 Т-клітин або співвідношення CD4/CD8 Т-клітин у легенях; (д) зниження одного або більше з наступних: інтерлейкін-1 бета (ІЛ-1β), інтерлейкін-4 (ІЛ-4), інтерлейкін-5 (ІЛ-5), інтерлейкін-6 (ІЛ-6), інтерлейкін-13 (ІЛ-13), моноцитарний хемоатрактантний протеїн-1 (MCP-1) або альфа-фактор некрозу пухлини (ФНП α) рівні в легенях; (е) зниження рівня експресії гена одного або декількох з наступних: ІЛ4, ІЛ5, ІЛ6, ІЛ9, ІЛ13, ІЛ11 α , ІЛ13 α 2, *tnf*, *Tgfb1*, *Ccl2*, *Ccl11*, *Ccl24*, *Col15a1* або *Col24a1* в легені; (ф) зниження рівнів сироваткового IgE; (г) зниження метаболізму келихоподібних клітин в легені; або (h) зменшення консолідації легень, як описано в цьому документі. У той час як введення антагоніста ІЛ-33 окремо або антагоніста ІЛ-4Р окремо може призводити до позитивного терапевтичного ефекту, вимірюваного з використанням одного або декількох вищезазначених параметрів, застосування антагоністів ІЛ-33 і ІЛ-4Р в комбінації покажуть значне поліпшення (напр. адитивний або синергічний ефект) у будь-якому одному або декількох параметрах порівняно з тим, що спостерігається при використанні монотерапії або тільки антагоністом ІЛ-33, або тільки антагоністом ІЛ-4Р.

У випадку антагоніста ІЛ-33 або антагоніста ІЛ-4Р терапевтично ефективна кількість може становити від приблизно 0,05 мг до приблизно 600 мг. напр. приблизно 0,05 мг, приблизно 0,1 мг, приблизно 1,0 мг, приблизно 1,5 мг, приблизно 2,0 мг, приблизно 10 мг, приблизно 20 мг, приблизно 30 мг, приблизно 40 мг, приблизно 50 мг, приблизно 60 мг, приблизно 70 мг,

приблизно 80 мг, приблизно 90 мг, приблизно 100 мг, приблизно 110 мг, приблизно 120 мг, приблизно 130 мг, приблизно 140 мг, приблизно 150 мг, приблизно 160 мг, приблизно 170 мг, приблизно 180 мг, приблизно 190 мг, приблизно 200 мг, приблизно 210 мг, приблизно 220 мг, приблизно 230 мг, приблизно 240 мг, приблизно 250 мг, приблизно 260 мг, приблизно 270 мг, приблизно 280 мг, приблизно 290 мг, приблизно 300 мг, приблизно 310 мг, приблизно 320 мг, приблизно 330 мг, приблизно 340 мг, приблизно 350 мг, приблизно 360 мг, приблизно 370 мг, приблизно 380 мг, приблизно 390 мг, приблизно 400 мг, приблизно 410 мг, приблизно 420 мг, приблизно 430 мг, приблизно 440 мг, приблизно 450 мг, приблизно 460 мг, приблизно 470 мг, приблизно 480 мг, приблизно 490 мг, приблизно 500 мг, приблизно 510 мг, приблизно 520 мг, приблизно 530 мг, приблизно 540 мг, приблизно 550 мг, приблизно 560 мг, приблизно 570 мг, приблизно 580 мг, приблизно 590 мг або приблизно 600 мг. У певних варіантах реалізації цього винаходу 75 мг, 150 мг, 200 мг або 300 мг антагоніста ІЛ-4Р вводять суб'єкту в комбінації з антагоністом ІЛ-33. У певних варіантах реалізації цього винаходу 75 мг, 150 мг, 200 мг або 300 мг антагоніста ІЛ-33 вводять суб'єкту в комбінації з антагоністом ІЛ-4.

Кількість антагоніста ІЛ-33 або антагоніста ІЛ-4Р, що міститься в індивідуальних дозах, може бути виражена в міліграмах антитіла на кілограм ваги тіла пацієнта (тобто, мг/кг). Наприклад, вказаний антагоніст ІЛ-33 або антагоніст ІЛ-4Р можна вводити пацієнту в дозі від приблизно 0,0001 мг/кг до приблизно 25 мг/кг ваги тіла пацієнта. У певних варіантах реалізації цього винаходу кожен з антагоністів ІЛ-4Р і ІЛ-33 може вводитися в дозах приблизно 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1,0 мг/кг, 3,0 мг/кг або 10 мг/кг.

Вказана комбінація антагоніста ІЛ-33 і антагоніста ІЛ-4Р може вводитися суб'єкту підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньо м'язово або інтраназально. Вони можуть вводитися одночасно або послідовно.

Терапевтичне використання антитіл

Експерименти з використанням модельної системи мишей, проведені авторами цього винаходу, сприяли ідентифікації різних захворювань і станів, які можна лікувати, запобігати і/або полегшувати комбінованим антагонізмом ІЛ-33 і ІЛ-4Р. Наприклад, у моделі запалення легень і фіброзу легень, викликаних кліщем домашнього пилу, терапія комбінацією антитіла проти ІЛ-33 і антитіла проти ІЛ-4Р призводила до зниження рівня цитокінів в легенях, зниження легеневої інфільтрації клітин в легенях (еозинофіли, активовані В-клітини, активовані CD8 позитивні клітини, ST2+CD4+ Т-клітини і співвідношення CD4/CD8 Т-клітини), а також поліпшення консолідації легень і субепітеліального фіброзу порівняно з результатами, отриманими, коли кожне антитіло використовувалось окремо в якості монотерапії.

Вказані антитіла цього винаходу є ефективними, зокрема для лікування, запобігання та/або полегшення будь-якого захворювання або розладу, пов'язаного з, або опосередкованого експресією ІЛ-33 та експресією ІЛ-4, сигналіном або активністю, або яке піддається лікуванню шляхом блокування взаємодії між ІЛ-33 і рецептором ІЛ-33 (напр. ST2), або блокування взаємодії між ІЛ-4 і рецептором ІЛ-4, або іншим чином інгібують активність ІЛ-33 і ІЛ-4 та/або сигналінг. У певних варіантах реалізації цього винаходу антагоніст ІЛ-4Р є антитілом, яке взаємодіє з ІЛ-4Р α або взаємодіючи, блокує сигнальні шляхи як ІЛ-4, так і ІЛ-13 через рецептори ІЛ-4Р типу 1 і типу 2. Таким чином, використання цього подвійного антагоніста ІЛ-4 і ІЛ-13 в комбінації з антагоністом ІЛ-33 може забезпечити додаткові клінічні переваги при введенні пацієнтам, які мають запальний стан, опосередкований частково всіма трьома сигнальними шляхами. Наприклад, цей винахід пропонує способи терапії астми (алергічна астма, неалергічна астма, важка рефрактерна астма, загострення астми, стійка до стероїдів астма або стероїдна рефрактерна астма, чутлива до стероїдів астма, еозинофільна астма або нееозинофільна астма і т.д.), хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) та загострення ХОЗЛ, синдрому перекриття астми та ХОЗЛ (АСОС), хронічного бронхіту, емфіземи, гіперчутливого пневмоніту, atopічного дерматиту, кропив'янки, псоріазу, алергії, алергічного риніту, хронічного риносинуситу з або без поліпів носової порожнини, еозинофільного езофагіту, анафілаксії, серцево-судинних захворювань, захворювань центральної нервової системи, болю (включаючи запальний біль), артриту (напр., ревматоїдний артрит, остеоартрит, псоріатичний артрит та ін.), гігантськолітинних артеріїтів, васкуліту (хвороба Бечета і синдром Черджа-Строса), пурпури Шенлейна-Геноха, розсіяного склерозу, запального розладу кишечника (напр. хвороба Крона або виразковий коліт), вовчака, синдрому Шегрена та інших запальних захворювань або розладів, частково опосередкованих сигналіном ІЛ-33 та/або ІЛ-4.

Антитіла по цьому винаходу є також ефективними для терапії, профілактики та/або полегшення одного або більше фіброзних захворювань або розладів. Використовувані в цьому документі типові "фібротичні захворювання або розлади", які піддаються лікуванню шляхом

введення анти-ІЛ-33 і антагоністів ІЛ-4Р цього винаходу, включають фіброз легень (напр., ідіопатичний фіброз легень, індукований блеоміцином фіброз легень, індукований азбестом фіброз легень і синдром облітеруючого бронхіоліту), фіброз, асоційований з гострим пошкодженням легень і гострою легеневою недостатністю (напр., фіброз, індукований бактеріальною пневмонією, фіброз, індукований травмою, фіброз, індукований вірусною пневмонією, фіброз, індукований штучною вентиляцією легень, фіброз, індукований не легенеvim сепсисом і фіброз, індукований аспірацією), силікоз, фіброз, індукований опроміненням, склеродермія, очний фіброз, фіброз шкіри (напр., склеродермія), фіброз печінки (напр., цироз печінки, фіброз печінки, індукований алкоголем, неалкогольний стеатогепатит (NASH), пошкодження жовчних шляхів, первинний біліарний цироз, індукований інфекцією або вірусом фіброз печінки, аутоімунний гепатит, фіброз нирок (нирковий), фіброз серця, атеросклероз, рестеноз стента і мієлофіброз.

У контексті способів лікування, описаних в цьому документі, анти-ІЛ-33 антитіло і антитіло проти ІЛ-4Р можна вводити разом (тобто в якості єдиної схеми терапії) або в комбінації з одним або кількома додатковими терапевтичними агентами (приклади яких описані в інших частинах цього документу).

Комбіновані терапії

Цей винахід включає застосування композицій і терапевтичних формуляцій, що містять будь-який з антагоністів анти-ІЛ-33 і антагоністів ІЛ-4Р, описаних в цьому документі, в комбінації з одним або декількома додатковими терапевтично активними компонентами і способи лікування, що включають введення таких комбінацій суб'єктам, які потребують такого лікування. Як використовується в цьому документі, вираз "у поєднанні з" означає, що додаткові терапевтичні агенти вводять до, після або одночасно з фармацевтичною композицією, що містить антагоніст ІЛ-33 і антагоніст ІЛ-4Р. Термін "в комбінації з" також включає послідовне або сумісне введення антагоніста ІЛ-4Р і антагоніста ІЛ-33 і одного або декількох додаткових терапевтичних агентів. Цей винахід включає фармацевтичні композиції, в яких антагоніст ІЛ-33 і антагоніст ІЛ-4Р по цьому винаходу є у ко-формуляції з одним або більше додатковим терапевтично активним компонентом.

Наприклад, при введенні "перед" фармацевтичними композиціями, що включають вказаний антагоніст ІЛ-33 і вказаний антагоніст ІЛ-4Р, додатковий терапевтичний агент може вводитися приблизно за 72 години, приблизно за 60 годин, приблизно за 48 годин, приблизно за 36 годин, приблизно за 24 години, приблизно за 12 годин, приблизно за 10 годин, приблизно за 8 годин, приблизно за 6 годин, приблизно за 4 години, приблизно за 2 години, приблизно за 1 годину, приблизно за 30 хвилин, приблизно за 15 хвилин або приблизно за 10 хвилин до введення фармацевтичних композицій, що включають антагоніст ІЛ-33 і антагоніст ІЛ-4Р. При введенні "після" вказаних фармацевтичних композицій, що містять вказаний антагоніст ІЛ-33 і вказаний антагоніст ІЛ-4Р, додатковий терапевтичний агент може вводитися приблизно за 10 хвилин, приблизно за 15 хвилин, приблизно за 30 хвилин, приблизно за 1 годину, приблизно за 2 години, приблизно за 4 годин, приблизно за 6 годин, приблизно за 8 годин, приблизно за 10 годин, приблизно за 12 годин, приблизно за 24 годин, приблизно за 36 годин, приблизно за 48 годин, приблизно за 60 годин або приблизно за 72 години після введення фармацевтичної композиції, що включає вказаний антагоніст ІЛ-33 і вказаний антагоніст ІЛ-4Р. Введення "одночасне" або з вказаними фармацевтичними композиціями, що включають вказаний антагоніст ІЛ-33 і вказаний антагоніст ІЛ-4Р, означає, що додатковий терапевтичний агент вводиться суб'єкту в дозованій лікарській формі менш ніж за 5 хвилин (до, після або в той же час) введення фармацевтичних композицій, що включають вказаний антагоніст ІЛ-33 і вказаний антагоніст ІЛ-4Р, або вводять суб'єкту як єдиний комбінований препарат, що містить як додатковий терапевтичний агент, антагоніст ІЛ-33, так і ІЛ-4Р антагоніст.

Додатковим терапевтичним агентом може бути, напр. інший антагоніст ІЛ-33, інший антагоніст ІЛ-4Р, антагоніст ІЛ-1 (у тому числі, напр. антагоніст ІЛ-1, як викладено в US 6,927,044), антагоніст ІЛ-6, антагоніст ІЛ-6R (у тому числі, напр. анти-ІЛ-6R антитіло, як викладено в US 7,582,298), антагоніст ІЛ-13, антагоніст ФНП, антагоніст ІЛ-8, антагоніст ІЛ-9, антагоніст ІЛ-17, антагоніст ІЛ-5 (напр. меполізумаб або NUCALA®), антагоніст ІgE (напр. омалізумаб або XOLAIR®), антагоніст CD48, антагоніст ІЛ-31 (включаючи, наприклад, як викладено в US 7 531 637), антагоніст стромального лімфопоетину тимуса (TSLP) (включаючи, наприклад, як викладено в US 2011/027468), інтерферон-гамма (IFN γ), антибіотики, кортикостероїди (включаючи інгальційні кортикостероїди, або ICS), β адренергічні агоністи 2 (LABA) тривалої дії, мускаринові антагоністи тривалої дії (LAMA), такролімус, пімекролімус, циклоспорин, азатіоприн, метотрексат, кромолін натрію, інгібітори протеїнази, антигістаміни або їх комбінації.

Схеми введення

Згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу, багаторазові дози антагоніста ІЛ-33 і антагоніста ІЛ-4Р (або фармацевтична композиція, що включає комбінацію антагоніста ІЛ-33, антагоніста ІЛ-4Р і будь-якого з додаткових терапевтично активних агентів, згадані в цьому документі), можуть вводитися суб'єкту протягом визначеного часу. Вказані способи згідно з цим аспектом цього винаходу включають послідовне введення суб'єкту декількох доз антагоніста ІЛ-33 і антагоніста ІЛ-4Р цього винаходу. Як використовується в цьому документі, "послідовне введення" означає, що кожна доза вказаного антагоніста ІЛ-33 і вказаного антагоніста ІЛ-4Р вводиться суб'єкту в різний момент часу, напр., в різні дні, розділені заздалегідь заданим інтервалом (напр., години, дні, тижні або місяці). Цей винахід включає способи, які включають послідовне введення пацієнту однієї початкової дози антагоніста ІЛ-33 і антагоніста ІЛ-4Р, за яким слідує одна або більше вторинних доз вказаного антагоніста ІЛ-33 і вказаного антагоніста ІЛ-4Р, і потім додатково одна або декілька третинних доз вказаного антагоніста ІЛ-33 і вказаного антагоніста ІЛ-4Р.

Терміни "початкова доза", "вторинні дози" і "третинні дози" стосуються часової послідовності введення антагоніста ІЛ-33 і антагоніста ІЛ-4Р цього винаходу. Таким чином, "початкова доза" є дозою, яку вводять на початку схеми лікування (також називають "базовою дозою"); "вторинні дози" - це дози, які вводять після вказаної початкової дози; і "третинні дози" являють собою дози, які вводять після вказаних вторинних доз. Вказані початкова, вторинні і третинні дози можуть містити однакову кількість антагоніста ІЛ-33 і антагоніста ІЛ-4Р, але зазвичай можуть відрізнятися один від одного за частотою введення. Однак, в деяких варіантах реалізації цього винаходу, вказана кількість антагоніста ІЛ-33 і антагоніста ІЛ-4Р, що міститься в початкових, вторинних і/або третинних дозах, змінюються відносно одна одної (напр. корегуються вверх або вниз відповідно до доцільності) під час курсу терапії. У певних варіантах реалізації цього винаходу дві або більше (напр., 2, 3, 4 або 5) дози вводять на початку схеми лікування як "насичуючі дози", за якими слідує наступні дози, які вводяться на менш частій основі (напр., "підтримуючі дози").

У деяких ілюстративних варіантах реалізації цього винаходу кожен вторинну і/або третинну дозу вводять з 1 по 26 (напр., 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ або більше) тижнів після безпосередньо попередньої дози. Фраза "безпосередньо попередня доза", що використовується в цьому документі, означає, в послідовності декількох введень, вказану дозу антагоніста ІЛ-33 і антагоніста ІЛ-4Р, яка вводиться пацієнту перед введенням наступної дози у вказаній послідовності без проміжних доз.

Вказані способи згідно з цим аспектом цього винаходу можуть включати введення пацієнту будь-якої кількості вторинних та/або третинних доз антагоніста ІЛ-33 і антагоніста ІЛ-4Р. Наприклад, у певних варіантах реалізації цього винаходу вказаному пацієнту вводять тільки одну вторинну дозу. В інших варіантах реалізації цього винаходу два або більше (напр., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або більше) вторинних доз вводять вказаному пацієнту. Аналогічно, у певних варіантах реалізації цього винаходу вказаному пацієнту вводять тільки одну третинну дозу. У певних варіантах реалізації цього винаходу дві або більше (напр., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або більше) третинні дози вводять вказаному пацієнту.

У варіантах реалізації цього винаходу, що включають кілька вторинних доз, кожна вторинна доза може бути введена з такою ж частотою, що й інші вторинні дози. Наприклад, кожен вторинну дозу можна вводити пацієнту 1-2 тижні або 1-2 місяці після безпосередньо попередньої дози. Аналогічно, у варіантах, які включають в себе кілька третинних доз, кожна третинна доза може бути введена з такою ж частотою, що й інші третинні дози. Наприклад, кожен третинну дозу можна вводити пацієнту через 2-12 тижнів після безпосередньо попередньої дози. У певних варіантах реалізації цього винаходу частота, з якою вторинні та/або третинні дози вводять пацієнту, може змінюватися протягом вказаної схеми терапії. Вказана частота введення може також корегуватися в процесі терапії лікарем в залежності від потреб окремого пацієнта після клінічного обстеження.

Цей винахід включає схеми введення, в яких пацієнту вводять від 2 до 6 насичуючих доз з першою частотою (напр. один раз на тиждень, один раз кожен два тижні, один раз кожен три тижні, один раз на місяць, один раз на два місяці і т.д.), з подальшим введенням двох або більше підтримуючих доз пацієнту на менш частій основі. Наприклад, згідно з цим аспектом винаходу, якщо насичуючі дози вводять з частотою один раз на місяць, тоді підтримуючі дози можна вводити пацієнту раз на шість тижнів, один раз на два місяці, один раз на три місяці, і т.д.).

ПРИКЛАДИ

Наступні приклади викладені таким чином, щоб забезпечити фахівцю в цій області техніки повне розкриття і опис як створити і використовувати способи і композиції цього винаходу, і не призначені для обмеження обсягу того, що винахідники вважають їхнім винаходом. Були зроблені спроби забезпечити точність стосовно використовуваних чисел (наприклад, кількості, температури тощо), але слід враховувати деякі експериментальні похибки та відхилення. Якщо не вказано інше, частки є масовими частками, молекулярна маса є середньою молекулярною масою, температура вказується у градусах Цельсія, а тиск - атмосферний або близький до атмосферного.

Приклад 1. Створення антитіл людини до ІЛ-33 людини

Анти-ІЛ-33 антитіла людини створювали, як описано в патенті США № 9,453,072. У таблиці 1 наведено пари амінокислотних послідовностей важкого і легкого ланцюга і послідовності CDR, вибраних анти-ІЛ-33 антитіл та їх відповідних ідентифікаторів антитіл. У таблиці 2 наведено послідовності нуклеїнових кислот, що кодують пари амінокислотних послідовностей вказаного важкого і вказаного легкого ланцюга, а також послідовності CDR, вибраних анти-ІЛ-33 антитіл та їх відповідних ідентифікаторів антитіл.

Таблиця 1

Ідентифікатори послідовності амінокислот

Позначення антитіл	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M9559N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1M9566N	18	20	22	24	26	28	30	32
H1M9568N	34	36	38	40	42	44	46	48
H4H9629P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4H9633P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4H9640P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H9659P	98	100	102	104	106	108	110	112
H4H9660P	114	116	118	120	122	124	126	128
H4H9662P	130	132	134	136	138	140	142	144
H4H9663P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4H9664P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H9665P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4H9666P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4H9667P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4H9670P	226	228	230	232	234	236	238	240
H4H9671P	242	244	246	248	250	252	254	256
H4H9672P	258	260	262	264	266	268	270	272
H4H9675P	274	276	278	280	282	284	286	288
H4H9676P	290	292	294	296	298	300	302	304
H1M9565N	308	310	312	314	316	318	320	322

Таблиця 2

Ідентифікатори послідовності нуклеїнових кислот

Позначення антитіл	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M9559N	1	3	5	7	9	11	13	15
H1M9566N	17	19	21	23	25	27	29	31
H1M9568N	33	35	37	39	41	43	45	47
H4H9629P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4H9633P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4H9640P	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H9659P	97	99	101	103	105	107	109	111
H4H9660P	113	115	117	119	121	123	125	127
H4H9662P	129	131	133	135	137	139	141	143
H4H9663P	145	147	149	151	153	155	157	159
H4H9664P	161	163	165	167	169	171	173	175
H4H9665P	177	179	181	183	185	187	189	191
H4H9666P	193	195	197	199	201	203	205	207
H4H9667P	209	211	213	215	217	219	221	223
H4H9670P	225	227	229	231	233	235	237	239
H4H9671P	241	243	245	247	249	251	253	255
H4H9672P	257	259	261	263	265	267	269	271
H4H9675P	273	275	277	279	281	283	285	287
H4H9676P	289	291	293	295	297	299	301	303
H1M9565N	307	309	311	313	315	317	319	321

Антитіла, як правило, згадуються тут згідно з наступною номенклатурою: префікс Fc (напр. "H1M" або "H4H"), за яким йде числовий ідентифікатор (напр. "9559," "9566" або "9629", як показано в Таблиці 1), за якими слідують суфікс "P" або "N". Таким чином, згідно з цією номенклатурою, антитіло може згадуватися в цьому документі як напр., "H1M9559N", "H1M9566N", "H4H9629P", тощо префікси H1M і H4H на позначеннях антитіл, що використовуються в цьому документі, вказують на конкретний ізотип Fc ділянки вказаного антитіла. Наприклад, антитіло "H1M" має Fc IgG1 миші, тоді як антитіло "H4H" має Fc IgG4 людини. Як буде зрозуміло фахівцям в цій галузі техніки, антитіло, що має конкретний ізотип Fc, може бути перетворене в антитіло з іншим ізотипом Fc (напр., антитіло з Fc IgG1 миші може бути перетворено в антитіло з IgG4 людини і т.д.), але у будь-якому випадку, варіабельні домени (включаючи CDR) - які позначені числовими ідентифікаторами, показаними в Таблиці 1, залишаються тими ж самими, і вказані зв'язуючі властивості, як очікується, будуть ідентичними або суттєво аналогічними незалежно від природи домену Fc.

Приклад 2: Конструювання антагоністів ІЛ-33 (ІЛ-33 пасток)

Пастки для анти-ІЛ-33 людини створювали, як описано в патенті США № 2014/0271642. У таблиці 3а наведено коротке викладення вказаних ідентифікаторів послідовності амінокислот для різних компонентів вказаних пасток ІЛ-33, а в Таблиці 3b наведено повно розмірні амінокислотні послідовності вказаних пасток.

П'ять різних типових антагоністів ІЛ-33 цього винаходу були сконструйовані, використовуючи стандартні методи молекулярної біології. Перший антагоніст ІЛ-33 (hST2-hFc, ID NO: 323) складається з розчинної позаклітинної ділянки ST2 людини (SEQ ID NO: 328), злитої на її C-кінці з N-кінцем ділянки Fc IgG1 людини (SEQ ID NO: 332). Другий антагоніст ІЛ-33 (hST2-mFc, SEQ ID NO: 324) складається з розчинної позаклітинної ділянки ST2 людини (SEQ ID NO: 328), злитої на її C-кінці з N-кінцем ділянки Fc IgG2a миші (SEQ ID NO: 333). Третій антагоніст ІЛ-33 (hST2-hIL1RAcP-mFc, SEQ ID NO: 325) складається з лінійного злиття, що має ST2 людини (SEQ ID NO: 328) на його N-кінці, за яким слідує позаклітинна ділянка ІЛ-1RAcP людини (SEQ ID NO: 330), за яким слідує Fc IgG2a миші (SEQ ID NO: 333) на його C-кінці. Четвертий антагоніст ІЛ-33 (mST2-mIL1RAcP-mFc, SEQ ID NO: 326) складається з лінійного злиття, що має ST2 миші (SEQ ID NO: 329) на його N-кінці, за яким слідує позаклітинна ділянка ІЛ-1RAcP миші (SEQ ID NO: 331), за яким слідує Fc IgG2a миші (SEQ ID NO: 333) на його C-кінці. П'ятий антагоніст ІЛ-33

- 5 (hST2-hlL1RAcP-hFc, SEQ ID NO: 327) складається з лінійного злиття, що має ST2 людини (SEQ ID NO: 328) на його N-кінці, за яким слідує позаклітинна ділянка ІЛ-1RAcP людини (SEQ ID NO: 330), за яким слідує Fc IgG1a людини (SEQ ID NO: 332) на його C-кінці. У таблиці 3а наведено короткий опис ідентифікаторів амінокислотної послідовності для різних антагоністів ІЛ-33 та їхніх складових частин. У таблиці 3b наведено амінокислотні послідовності вказаних антагоністів ІЛ-33 та їхніх складових частин.

Таблиця 3а

Короткий опис антагоністів ІЛ-33 та їхніх складових частин

Антагоністи ІЛ-33	Амінокислотна послідовність повнорозмірної молекули антагоніста	D1 Компонент	D2 Компонент	M Компонент
hST2-hFc	SEQ ID NO:323	позаклітинний ST2 людини (SEQ ID NO:328)	Відсутній	IgG1 Fc людини (SEQ ID NO:332)
hST2-mFc	SEQ ID NO: 324	позаклітинний ST2 людини (SEQ ID NO:328)	Відсутній	IgG2a Fc миші (SEQ ID NO:333)
hST2-hlL1RAcP-mFc	SEQ ID NO: 325	позаклітинний ST2 людини (SEQ ID NO:328)	позаклітинний ІЛ-1RAcP людини (SEQ ID NO:330)	IgG2a Fc миші (SEQ ID NO:333)
mST2-mL1RAcP-mFc	SEQ ID NO: 326	позаклітинний ST2 миші (SEQ ID NO:329)	позаклітинний ІЛ-1RAcP миші (SEQ ID NO:331)	IgG2a Fc миші (SEQ ID NO:333)
hST2-hlL1RAcP-hFc	SEQ ID NO: 327	позаклітинний ST2 людини (SEQ ID NO:328)	позаклітинний ІЛ-1RAcP людини (SEQ ID NO:330)	IgG1 Fc людини (SEQ ID NO:332)

Таблиця 3b

амінокислотні послідовності

Ідентифікатор	Послідовність
SEQ ID NO:323 (hST2-hFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQLL KFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSEKN SKIYCPIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEADAGDYTCFI HNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKNANLTCSACF GKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNSFSNGLACLDMLVRIADVK EEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 324 (hST2-mFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQLL KFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSEKN SKIYCPIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEADAGDYTCFI HNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKNANLTCSACF GKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNSFSNGLACLDMLVRIADVK DLLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSEPRGPTIKPCPPCKAPNLLGG PSVFIFPPKIDVLMISLSPVITCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHRE DYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVY VLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSY FMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

амінокислотні послідовності

Ідентифікатор	Послідовність
SEQ ID NO: 325 (hST2- hIЛ1RAcP-mFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQLLK FLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSEKNSK IYCPTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEADAGDYTCFKFIH ENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKANLTCSACFGKG TQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFNSGLACLDMLRIADVKEEDLL LQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSSERCDDWGLDTRMQIQVFEDEPARIK CPLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLWFRP TLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFPLEVVQKDSCFNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITC PNVDGYFPSSVKPTITWYMGCKYKQNFNNVIPEGMNLSFLIALISNNGNYTCVVTYP ENGRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSFLM DSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSSEDLKRSYVCH ARSAKGEVAKAAKVQKVPAPRYTVESGEPGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNST LRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPE EEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYFMYSKL RVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 326 (mST2- mIЛ1RAcP-mFc)	SKSSWGLENEALIVRCPRGRSTYPVEWYYSQTNESIPTQKRNRIFVSRDRLKFLP ARVEDSGIYACVIRSPNLNKTGYLNVTHKKPPSCNIPDYLMYSTVRGSDKNFKITCP TIDLYNWTAPVQWFKNCALQEPRFRAHRSYLFIDNVTHDDEGDYTCQFTHAENG TNYIVTATRSFTVEEKGFMSFPVITNPPYNHTMEVEIGKPASIACSACFGKGSFLA DVLWQINKTVVGNFGEARIQEEEGRNESSNDMDCLTSVLRTGVTEKDLSEYDC LALNLHGMIRHTIRLRKQPIDHRSERCDDWGLDTRMQIQVFEDEPARIKCPLEHFL LKYNYSTAHSSGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLWFRPTLLNDT GNYTCMLRNTTYCSKVAFPLEVVQKDSCFN SAMRFPVHKMYIEHGIHKITCPNVDG YFPSSVKPSVTWYKGCTEIVDFHNVLPEGMNLSFFIPLVSNNNGNYTCVVTYPENGR LFHLTRTVTVKVVGSPKDALPPQIYSPNDRVVEKEPGEELVIPCKVYFSFIMDSHN EWWWIDGKKPDDVTVDITINESVSYSSTEDETRTQILSIKKVTPEDLRNRYVCHAR NTKGEAEQAQAAKVQKVIIPRYTVESGEPGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI PKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLR VVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEE MTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYFMYSKL RV EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 327 (hST2- hIЛ1RAcP-hFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQLLK FLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSEKNSK IYCPTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEADAGDYTCFKFIH ENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKANLTCSACFGKG TQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFNSGLACLDMLRIADVKEEDLL LQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSSERCDDWGLDTRMQIQVFEDEPARIK CPLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLWFR PTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFPLEVVQKDSCFNSPMKLPVHKLYIEYGIQRIT CPNVDGYFPSSVKPTITWYMGCKYKQNFNNVIPEGMNLSFLIALISNNGNYTCVVTY PENGRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSF LMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSSEDLKRSY VCHARSAKGEVAKAAKVQKVPAPRYTVEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 328 (позаклітинний домен ST2 людини)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQLLK FLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSEKNS KIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEADAGDYTCFKFIH NENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKANLTCSACFGK GTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFNSGLACLDMLRIADVKEEDL LLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHS

амінокислотні послідовності

Ідентифікатор	Послідовність
SEQ ID NO:329 (позаклітинний домен ST2 миші)	SKSSWGLENEALIVRCRGRSTYPVEWYYSDTNEIPTQKRNRIFVSRDRLKFLP ARVEDSGIYACVIRSPNLNKTGYLNVTHKKPPSCNIPDYLMYSTVRGSDKNFKITCP TIDLYNWTAPVQWFKNCALQEPRFRAHRSYLFIDNVTHDDEGDYTCQFTHAENG NYIVTATRSFTVEEKGFMSFPVITNPPYNHTMEVEIGKPASACFSGKSHFLAD VLWQINKTVVGNFGEARIQEEEGRNESSNDMDCLTSVLRITGVTEKDLSEYDCL ALNLHGMIRHTIRLRKQPIDHR
SEQ ID NO:330 (позаклітинний домен ІЛ1RαP людини)	SERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLIYWTRQD RDLEEPINFRLPENRISKEKDVLWFRPTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFPLEV VQKDSCFNPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTITWYMGYKIQNFNNV IPEGMNLFLIALISNNGNYTCVVTYPENGRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSP NDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISHS RTEDETRTQILSIKKVTSDELKRSYVCHARSAKGEVAKAAKVQKVPAPRYTVE
SEQ ID NO: 331 (позаклітинний домен ІЛ1RαP миші)	SERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSTAHSSGLTLIYWTRQ DRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLWFRPTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFPLEV VQKDSCFNPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPSVTWYKGCTEIVDF HNVLPEGMNLSFFIPLVSNNGNYTCVVTYPENGRLFHLTRTLTVKVVGSPKDALP PQIYSPNDRVVYEKEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTIN ESVSYSSTEDETRTQILSIKKVTPEDLRRNYVCHARNTKGAEAAKVQKVPAPRYTVE
SEQ ID NO:332 (IgG1 Fc людини)	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
SEQ ID NO:333 (IgG2a Fc миші)	EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSISPIVTCVVVDVSEDDPD VQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNK DLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTPEVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH TTKSFSRTPGK
SEQ ID NO:334 (ІЛ-33-6His M. fascicularis)	SITGISPITESLASLSTYNDQSITFALEDESIEYVEDLKKDKKKDKVLLSYYESQHP SSESGDGVGDKMLMVTLSPTKDFWLQANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNR SFNCVSFECKTDPGVFVGKDNHLALIKVDYSENLSSENILFKLSEILENNHHHHH

Приклад 3: Антагоністичні антитіла до ІЛ-4Р

Анти-ІЛ-4Р антитіла людини створювали, як описано в патенті США №7,608,693. Вказане ілюстративне антитіло проти ІЛ-4Р, що використовується в наступному прикладі, є антитілом миші, специфічним для ІЛ-4Р миші, і має наступні амінокислотні послідовності: варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), що містить SEQ ID NO: 335 і варіабельний домен легкого ланцюга (LCVR), що включає SEQ ID NO: 336. Вказане анти-ІЛ-4Р -антитіло людини, згадуване як дупіумаб, специфічно зв'язується з ІЛ-4Р людини і містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), що містить SEQ ID NO: 337, і варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), що містить SEQ ID NO: 338, ділянку 1, яка визначає комплементарність важкого ланцюга (HCDR1), що містить SEQ ID NO: 339, HCDR2, що містить SEQ ID NO: 340, HCDR3, що містить SEQ ID NO: 341, ділянку, що визначає комплементарність легкого ланцюга (LCDR1), що містить SEQ ID NO: 342, LCDR2, що містить SEQ ID NO: 343, і LCDR3, що містить SEQ ID NO: 344. Повно розмірний важкий ланцюг дупіумаба показаний як SEQ ID NO: 345 і повно розмірний легкий ланцюг показаний як SEQ ID NO: 346.

Приклад 4: Хронічна модель фіброзу і тяжкого запалення легень, індукованого кліщем домашнього пилу (HDM), для вивчення ролі ІЛ-33 у запаленні легень. Порівняння ефективності анти-ІЛ-33 антитіла, антитіла проти ІЛ-4Р або комбінації обох.

Хронічні запальні захворювання дихальних шляхів є наслідком рецидивуючих епізодів запалення дихальних шляхів, переважно внаслідок повторного впливу алергенів або інших патогенів. У людей такі хронічні пошкоджуючі чинники викликають широкий спектр патологій, які включають легеневу інфільтрацію імунними клітинами, збільшення продукції цитокінів, виробництво слизу і відкладення колагену (Hirota, (2013) Chest. Sep;144(3):1026-32.; Postma, (2015), N Engl J Med., Sep 24;373(13):1241-9). Це збільшення запальних цитокінів і інфільтратів імунних клітин, що супроводжуються інтенсивним ремоделюванням дихальних шляхів,

призводить до звуження дихальних шляхів, гіперреактивності до вдихуваних тригерів, таких як алергени або патогени, обструкції дихальних шляхів і втрати функції легень.

Для визначення ефекту інгібування анти-ІЛ-33 у відповідних моделях *in vivo*, дослідження хронічного фіброзу і важкого запалення легень і ремоделювання, індукованих екстрактом кліща домашнього пилу (HDM), було проведене на мишах, які були гомозиготними по експресії ІЛ-33 людини замість ІЛ-33 миші (миші ІЛ-33 HumIn; Див. Патентну заявку США 2015/0320021 і 2015/0320022). Хронічна експозиція до екстракту HDM викликає серйозне запалення легень, що призводить до значного клітинного інфільтрату, експресії цитокінів і ремоделювання. У цій моделі порівнювали ефективність анти-ІЛ-33 антитіла, антитіла проти ІЛ-4Р α миші або їх комбінації. Антитіло проти ІЛ-4Р α миші, що використовується в цьому дослідженні, позначається M1M1875N і містить пару амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR з SEQ ID NO: 335/336. Вказане анти-ІЛ-33 антитіло, що використовується в цьому дослідженні, позначається H4H9675P і містить пару амінокислотних послідовностей HCVR/LCVR з SEQ ID NO: 274/282.

ІЛ-33 HumIn мишам інтраназально вводили або 50 мкг екстракту кліщів домашнього пилу (HDM, Greer, №XPB70D3A2.5), розведеного в 20 мкл 1X фізіологічного розчину (PBS), або 20 мкл 1X PBS 3 дні на тиждень протягом 15 тижнів. Другій контрольній групі ІЛ-33 HumIn мишей вводили 50 мкг екстракту HDM, розведеного в 20 мкл 1X PBS 3 дні на тиждень протягом 11 тижнів, для оцінки тяжкості захворювання на момент початку лікування антитілами. Чотирьом групам мишей, яким робили стимуляцію HDM, вводили підшкірно 25 мг/кг анти-ІЛ-33 антитіла H4H9675P, антитіла проти ІЛ-4Р α миші M1M1875N, комбінації обох антитіл, або антитіла ізотипного контролю, починаючи з 11 тижня від початку стимуляції HDM і потім двічі на тиждень до закінчення стимуляції HDM (4 тижні лікування антитілами). На 108-й день дослідження всі миші були забиті, а їхні легені були зібрані. Експериментальне дозування і протокол лікування для груп мишей показано в Таблиці 4.

Таблиця 4

Експериментальне дозування і протокол лікування для груп мишей

Група	Миша	Інтраназальна стимуляція	Тривалість інтраназальної стимуляції	Антитіло
1	Миші ІЛ-33 HumIn	1X PBS	15 тижнів	Немає
2	Миші ІЛ-33 HumIn	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	11 тижнів	Немає
3	Миші ІЛ-33 HumIn	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	15 тижнів	Немає
4	Миші ІЛ-33 HumIn	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	15 тижнів	Антитіло ізотипного контролю
5	Миші ІЛ-33 HumIn	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	15 тижнів	Анти-ІЛ-33 антитіло (H4H9675P)
6	Миші ІЛ-33 HumIn	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	15 тижнів	Анти-ІЛ-4Р α антитіло (M1M1875N)
7	Миші ІЛ-33 HumIn	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	15 тижнів	Анти-ІЛ-33 (H4H9675P) антитіло + Анти-ІЛ-4Р α (M1M1875N) антитіло

Відбір легень для аналізу цитокінів:

Підвищені рівні ключових медіаторів в легенях, такі як прототипні цитокіни типу 2 ІЛ-4, ІЛ-5 і ІЛ-13, а також цитокіни, більш характерні для імунних відповідей типу 1, такі як ІЛ-1 β або ФНП α , беруть участь у розвитку захворювань легень людини (Gandhi, (2016) Nat Rev Drug Discov Jan;15(1):35-50.; Barnes, (2008), Nat Rev Immunol, Mar;8(3):183-92. В цьому дослідженні були виміряні рівні цих запальних цитокінів у легенях.

Після знекровлення верхню і середню частки правої легені від кожної миші видаляли і поміщали в пробірки, що містили розчин реагенту для екстракції тканинного протеїну (1X T-PER реагент; Pierce, №78510), доповненого 1X сумішшю інгібіторів протеаз Halt (Thermo Scientific, №87786). Всі наступні кроки проводили на льоду. Об'єм T-PER реагента (містить суміш інгібіторів протеаз) регулювали для кожного зразка так, щоб він відповідав співвідношенню тканини до T-PER 1: 7 (маса/об'єм). Зразки легень механічно руйнували за допомогою TissueLyser II (Qiagen №85300). Отримані лізати центрифугували для осадження дебрису. Супернатанти, що містять розчинні протеїнові екстракти, переносили на свіжі пробірки і зберігали при 4 °C до подальшого аналізу.

Загальний вміст протеїну в екстрактах протеїнів легені вимірювали за допомогою аналізу Бредфорда. Для аналізу 10 мкл зразків розведених екстрактів розкапували в 96-лункові планшети в дуплікатах і змішували з 200 мкл 1X реагенту для забарвлення (Biorad, №500-0006). Серійні розведення бичачого сироваткового альбуміну (BSA; Sigma, №A7979), починаючи з 700 мкг/мл в реактиві 1X T-Peg, використовували в якості стандарту для визначення концентрації білка в екстрактах. Після 5-хвилинної інкубації за кімнатної температури вимірювали поглинання при 595 нм на планшетному рідері Molecular Devices SpectraMax M5. Аналіз даних для визначення загального вмісту екстрагованого протеїна легень на основі стандарту BSA, проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism™.

Концентрації цитокінів у екстрактах протеїну легень вимірювали, використовуючи Proinflammatory Panel 1 (миша) мультиплексного набору для імунологічного аналізу (MesoScale Discovery, №K15048G-2) і звичайного 6-плексного набору Multi-Spot® для імунологічного аналізу (MesoScale Discovery, №K152A41-4), відповідно до інструкцій виробника. Коротко, 50мкл/лунку калібраторів і зразків (розведених у Розчиннику 41) додавали на планшети, попередньо покриті антитілами для захоплення і інкубували за кімнатної температури при зтрушуванні на 700 об/хв протягом 2 годин. Потім планшети промивали 3 рази 1X PBS, що містив 0,05 % (w/v) Tween-20, з наступним додаванням 25 мкл розчину для виявлення антитіл, розведеного в Розчиннику 45. Після 2-годинної інкубації за кімнатної температури при перемішуванні вказаний планшет промивали 3 рази і додавали 150мкл 2X буфера для зчитування в кожну лунку. Електрохімілюмінесценція була негайно зчитана на приладі MSD Spector®. Аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism.

Кожна концентрація цитокінів в екстрактах загального протеїну легень від всіх мишей у кожній групі була нормалізована на загальний вміст протеїна екстрактів, виміряного за допомогою аналізу Бредфорда, і виражена для кожної групи як середнє значення пг цитокіну на мг загального протеїна легень (пг/мг), $\pm$ SD), як показано в Таблиці 5.

Аналіз цитокінів легень:

Як показано в таблиці 5, рівень цитокінів і хемокінів ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-1 β і MCP-1, вивільнених в легенях мишей ІЛ-33 HumIn, які отримують HDM протягом 15 тижнів, з або без лікування антитілом ізотипного контролю були значно вищими, ніж у мишей ІЛ-33 HumIn, яким вводили тільки 1X PBS. Аналогічно, спостерігалася тенденція до посилення вивільнення цитокінів ІЛ-13 і ФНП α в легенях мишей ІЛ-33 HumIn, які отримували HDM протягом 15 тижнів. Навпаки, спостерігалася значне зниження рівнів ІЛ-6, ІЛ-13 і MCP-1 в легенях мишей ІЛ-33 HumIn, яким вводили комбінацію анти-ІЛ-33 і антитіл проти ІЛ-4Р α миші протягом останніх чотирьох тижнів хронічної стимуляції HDM порівняно з мишами ІЛ-33 HumIn, яким вводили HDM з антитілом ізотипного контролю протягом цього періоду часу. Відзначалася тенденція до зниження легеневих рівнів ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-1 β і ФНП α у мишей ІЛ-33 HumIn, які отримували комбінацію анти-ІЛ-33 та антитіл проти ІЛ-4Р α миші протягом останніх чотирьох тижнів хронічної стимуляції HDM порівняно з мишами ІЛ-33 HumIn, яким вводили HDM з антитілом ізотипного контролю протягом цього періоду часу. Впливи на цитокіни легень, що спостерігалися при комбінації анти-ІЛ-33 та антитіл проти ІЛ-4Р α миші, були більшими, ніж терапія окремими антитілами.

Таблиця 5

Концентрація цитокіну в протеїнових екстрактах легень

Експериментальна група	Середнє значення [ІЛ-4] у протеїнових екстрактах легень (пг/мг протеїна легень) ($\pm$ SD)	Середнє значення [ІЛ-5] у протеїнових екстрактах легень (пг/мг протеїна легень) ($\pm$ SD)	Середнє значення [ІЛ-13] у протеїнових екстрактах легень (пг/мг протеїна легень) ($\pm$ SD)	Середнє значення [ІЛ-6] у протеїнових екстрактах легень (пг/мг протеїна легень) ($\pm$ SD)	Середнє значення [ІЛ-1 β] у протеїнових екстрактах легень (пг/мг протеїна легень) ($\pm$ SD)	Середнє значення [ФНП α] у протеїнових екстрактах легень (пг/мг протеїна легень) ($\pm$ SD)	Середнє значення [MCP-1] у протеїнових екстрактах легень (пг/мг протеїна легень) ($\pm$ SD)
1. Введення 1X PBS (n=5)	0.13 ($\pm$ 0.17)	0.80 ($\pm$ 1.41)	н/в	4.75 ($\pm$ 3.39)	1.97 ($\pm$ 1.67)	2.86 ($\pm$ 1.01)	4.12 ($\pm$ 1.12)
2. Стимуляція HDM 11 тижнів (n=4)	5.71 ($\pm$ 3.76)*	7.31 ($\pm$ 3.67)	0.20 ($\pm$ 0.03)	293.1 ($\pm$ 139.3)*	181.8 ($\pm$ 131.0)*	17.39 ($\pm$ 8.90)	43.06 ($\pm$ 24.21)
3. Стимуляція HDM 15 тижнів (n=4)	2.70 ($\pm$ 1.71)	5.13 ($\pm$ 3.20)	0.19 ($\pm$ 0.03)	308.3 ($\pm$ 390.1)	51.79 ($\pm$ 16.97)	15.38 ($\pm$ 8.11)	105.6 ($\pm$ 106.5)*
4. Стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло ізотипного контролю (n=4)	5.46 ($\pm$ 3.38)**	7.00 ($\pm$ 4.50)*	0.22 ($\pm$ 0.02)	395.0 ($\pm$ 270.1)**	162.3 ($\pm$ 166.5)**	19.57 ($\pm$ 14.81)	141.7 ($\pm$ 126.3)**
5. Стимуляція HDM 15 тижнів + анти-ІЛ-33 антитіло (n=5)	1.15 ($\pm$ 1.38)	1.93 ($\pm$ 1.90)	0.20 ($\pm$ 0.02)	136.8 ($\pm$ 164.1)	122.9 ($\pm$ 194.1)	17.05 ($\pm$ 4.48)*	16.64 ($\pm$ 6.40)
6. Стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло проти ІЛ-4Р α миші (n=5)	2,88 ($\pm$ 2,43)	13,13 ($\pm$ 12,81)**	0.16 ($\pm$ 0.03)	18,24 ($\pm$ 12,43)	26,73 ($\pm$ 20,94)	7,85 ($\pm$ 4,89)	11,63 ($\pm$ 8,69)
7. Стимуляція HDM 15 тижнів + анти-ІЛ-33 + антитіла проти ІЛ-4Р α миші (n=5)	0,47 ($\pm$ 0,13)	0,73 ($\pm$ 0,37)	0,10 ($\pm$ 0,05)††	7,46 ($\pm$ 2,52)†	3,722 ($\pm$ 1,59)	3,07 ($\pm$ 1,34)	4,62 ($\pm$ 1,27)††

Примітка: Вказана статистична значущість, визначена за допомогою Крускала-Уолліса однофакторного ANOVA з тестом множинного порівняння Данна за отриманими результатами (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, порівняно з групами 1: миші ІЛ33 HumIn, ведення фізіологічного розчину; † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$, порівняно з групою 4: миші ІЛ33 HumIn, стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло ізотипного контролю). н/в: Не визначено.

Відбір легень для аналізу експресії генів

- Після знекровлення, додаткову частку правої легені від кожної миші видаляли, поміщали в пробірки, що містять 400 мкл RNA Later (Ambion, № AM7020) і зберігали при -20°C до обробки. Тканини гомогенізували в TRIzol і використовували хлороформ для розділу фаз. Водорозчинну фазу, що містить загальну РНК, очищали, використовуючи MagMAX™ -96 для мікроматричного набору для виділення загальної РНК (Ambion від Life Technologies, № AM1839) відповідно до специфікацій виробника. Геномну ДНК видаляли за допомогою MagMAX™ Turbo™ DNase буферу і TURBO-DNase з набору MagMAX, наведеного вище. мРНК (до 2,5 мкг) була обернено транскрибована в кДНК за допомогою SuperScript® VILO™ Master Mix (Invitrogen від Life Technologies, № 11755500). кДНК розводили до 2 нг/Л і 10 нг кДНК ампліфікували за допомогою TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems від Life Technologies, № 4369542) і відповідні зразки (Life Technologies; B2m миші: Mm00437762_m1; ІЛ4 миші: Mm00445259_m1; ІЛ5 миші: Mm00439646_m1; ІЛ13 миші: Mm00434204_m1; ІЛ9 миші: Mm00434305_m1; ІЛ6 миші: Mm00446190_m1; Ccl2 миші: Mm00441242_m1; Ccl11 миші: Mm00441238_m1; Ccl24 миші:

Mm00444701_m1; Tnf миші: Mm00443258_m1; Tgfb1 миші: Mm01178820_m1; IL1rl1 миші: Mm00516117_m1; IL13ra2 миші: Mm00515166_m1; Col15a1 миші: Mm00456584_m1; Col24a1 миші: Mm01323744_m1;) використовуючи секвенатор ABI 7900HT (Applied Biosystems). B2m використовували в якості генів внутрішнього контролю для нормалізації будь-яких відмінностей вхідних даних кДНК. Еталоною групою, що використовувалась для нормалізації всіх зразків, було середнє значення для зразків групи 1 ("введення 1X PBS"). Експресію кожного гена нормалізували по експресії B2m в межах однієї проби і виражали відносно його нормалізованої експресії в референтній групі (середнє $\pm$ SD), як показано в таблиці 6.

Аналіз експресії генів легені

Як показано в таблиці 6, вказаний рівень експресії цитокінів, хемокінів і генів колагену IL4, IL13, IL6, Ccl2, Tgfb1, IL13ra2 і Col24a1 у легенях IL-33 мишей HumIn, які отримували HDM протягом 15 тижнів, з або без терапії антитілом ізотипного контролю були значно підвищені порівняно з IL-33 мишей HumIn, яким вводили тільки 1X PBS. Аналогічно, була тенденція до збільшення експресії генів IL5, IL9, Ccl11, Ccl24, Tnf, IL1rl1 і Col15a1 в легенях мишей IL-33 HumIn, які отримували HDM протягом 15 тижнів.

Навпаки, було значне зниження рівнів експресії IL6, Ccl2, Ccl11 і Ccl24 у легенях мишей IL-33 HumIn, яким вводили комбінацію анти-IL-33 і антитіл проти IL-4P α миші протягом останніх чотирьох тижнів хронічної стимуляції HDM порівняно з мишами IL-33 HumIn, яким вводили HDM з антитілом ізотипного контролю протягом цього періоду часу. Була тенденція до зниження рівнів експресії IL4, IL5, IL13, IL9, Tnf, Tgfb1, IL1rl1, IL13ra2, Col15a1 і Col24a1 у мишей, які отримували комбінацію анти-IL-33 і антитіл проти IL-4P α миші протягом останніх чотирьох тижнів хронічної стимуляції HDM порівняно з мишами IL-33 HumIn, яким вводили HDM з антитілом ізотипного контролю протягом цього періоду часу. Вказані ефекти на цитокіни легень, що спостерігалися при комбінації анти-IL-33 та антитіл проти IL-4P α миші, були більшими, ніж при терапії окремими антитілами окремо.

Таблиця 6

Експресія гена (TaqMan) в легенях миші

Експериментальна група	Середня відносна експресія IL4 в легені ($\pm$ SD)	Середня відносна експресія IL5 в легені ($\pm$ SD)	Середня відносна експресія IL13 в легені ($\pm$ SD)	Середня відносна експресія IL9 в легені ($\pm$ SD)	Середня відносна експресія IL6 в легені ($\pm$ SD)	Середня відносна експресія Ccl2 в легені ($\pm$ SD)	Середня відносна експресія Ccl11 в легені ($\pm$ SD)	Середня відносна експресія Ccl24 в легені ($\pm$ SD)
1. Введення 1X PBS (n=5)	1.03 ($\pm$ 0.28)	1.54 ($\pm$ 1.61)	4.51 ($\pm$ 7.59)	15.91 ($\pm$ 34.81)	1.25 ($\pm$ 1.09)	1.20 ($\pm$ 0.93)	1.24 ($\pm$ 1.07)	1.05 ($\pm$ 0.33)
2. Стимуляція HDM 11 тижнів (n=4)	12.78 ($\pm$ 8.45)*	7.13 ($\pm$ 3.49)	114.1 ($\pm$ 68.3)*	38.66 ($\pm$ 30.04)	9.12 ($\pm$ 1.65)	18.86 ($\pm$ 8.40)	13.36 ($\pm$ 5.05)	15.44 ($\pm$ 12.02)
3. Стимуляція HDM 15 тижнів (n=4)	6.27 ($\pm$ 3.39)	4.20 ($\pm$ 1.51)	58.05 ($\pm$ 31.61)	30.63 ($\pm$ 20.54)	8.92 ($\pm$ 4.55)	22.61 ($\pm$ 13.37)*	8.65 ($\pm$ 3.20)	4.58 ($\pm$ 1.91)
4. Стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло ізотипного контролю (n=4)	10.98 ($\pm$ 5.46)*	5.50 ($\pm$ 3.16)	92.51 ($\pm$ 75.96)*	19.51 ($\pm$ 10.29)	13.80 ($\pm$ 6.98)**	24.53 ($\pm$ 9.13)**	12.14 ($\pm$ 7.82)	12.41 ($\pm$ 8.73)
5. Стимуляція HDM 15 тижнів + анти-IL-33 антитіло (n=5)	2.80 ($\pm$ 3.11)	1.74 ($\pm$ 1.11)	12.91 ($\pm$ 12.93)	0.00 ($\pm$ 0.00)	3.87 ($\pm$ 3.00)	5.20 ($\pm$ 2.44)	6.21 ($\pm$ 3.55)	1.45 ($\pm$ 2.09)
6. Стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло проти IL-4P α миші (n=5)	1.87 ($\pm$ 1.03)	7.98 ($\pm$ 6.52)	69.56 ($\pm$ 66.86)*	63.50 ($\pm$ 92.04)	2.77 ($\pm$ 1.39)	2.97 ($\pm$ 1.86)	1.00 ($\pm$ 0.18)	0.44 ($\pm$ 0.34)

Таблиця 6

Експресія гена (TaqMan) в легенях миші

Експериментальна група	Середня відносна експресія ІЛ4 в легені (± SD)	Середня відносна експресія ІЛ5 в легені (± SD)	Середня відносна експресія ІЛ13 в легені (± SD)	Середня відносна експресія ІЛ9 в легені (± SD)	Середня відносна експресія ІЛ6 в легені (± SD)	Середня відносна експресія Ccl2 в легені (± SD)	Середня відносна експресія Ccl11 в легені (± SD)	Середня відносна експресія Ccl24 в легені (± SD)
7. Стимуляція HDM 15 тижнів + анти-ІЛ-33 + антитіла проти ІЛ-4Р α миші (n=5)	1.37 (±0.35)	1.56 (±0.97)	9.34 (±3.10)	0.57 (±1.27)	1.04 (±0.31) ^{††}	1.08 (±0.24) ^{†† §}	0.72 (±0.28) [†]	0.15 (±0.10) ^{††}

Таблиця 6

Продовження: Експресія гена (TaqMan) в легенях миші

Експериментальна група	Середня відносна експресія Tnf в легені (± SD)	Середня відносна експресія Tgfb1 в легені (±SD)	Середня відносна експресія ІЛ11r1 в легені (± SD)	Середня відносна експресія ІЛ13ra2 в легені (± SD)	Середня відносна експресія Col15a1 в легені (± SD)	Середня відносна експресія Col24a1 в легені (± SD)
1. Введення 1X PBS (n=5)	1.02 (±0.24)	1.00 (±0.11)	1.11 (±0.58)	1.59 (±1.96)	1.00 (±0.10)	1.02 (±0.16)
2. Стимуляція HDM 11 тижнів (n=4)	1.45 (±0.41)	1.40 (±0.27)	3.03 (±0.88)*	48.43 (±34.21)	2.75 (±0.96)	24.55 (±7.97)**
3. Стимуляція HDM 15 тижнів (n=4)	1.58 (±0.43)	1.32 (±0.33)	2.53 (±0.79)*	32.07 (±13.45)	3.00 (±1.22)	17.25 (±5.29)*
4. Стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло ізотипного контролю (n=4)	1.59 (±0.78)	1.37 (±0.12)*	3.45 (±1.48)*	52.02 (±40.63)	3.80 (±0.96)*	23.58 (±6.18)***
5. Стимуляція HDM 15 тижнів + анти-ІЛ-33 антитіло (n=5)	1.38 (±0.27)	1.22 (±0.24)	0.99 (±0.47)	13.54 (±12.25)	1.64 (±0.30)	10.58 (±5.42)
6. Стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло проти ІЛ-4Р α миші (n=5)	1.00 (±0.25)	1.13 (±0.20)	3.38 (±1.97)	1.89 (±0.59)	1.24 (±0.28)	7.08 (±4.56)
7. Стимуляція HDM 15 тижнів + анти-ІЛ-33 + антитіла проти ІЛ-4Р α миші (n=5)	0.68 (±0.08) [§]	1.09 (±0.12)	1.12 (±0.57)	1.89 (±0.27)	0.74 (±0.21) ^{†† §}	1.76 (±0.15) [†]

Примітка: вказана статистична значущість, визначена за Крускала-Уолліса однофакторним ANOVA з тестом множинного порівняння Данна за отриманими результатами (* = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,01 порівняно з групами 1: Миші ІЛ33 HumIn, введення фізіологічного розчину; §p < 0,05, §§p < 0,01, порівняно з групою 3: миші ІЛ33 HumIn, стимуляція HDM 15 тижнів; †p < 0,05, ††p < 0,01, порівняно з групою 4: мишей ІЛ33 HumIn, стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло ізотипного контролю;).

Відбір легень для аналізу легеневого клітинного інфільтрату

Легенева інфільтрація імунними клітинами спостерігається при багатьох запальних

захворюваннях дихальних шляхів, включаючи астму і ХОЗЛ. Нейтрофільне запалення легень було пов'язане з більш низькою функцією легень і важким ремоделюванням тканин у хворих на астму (Wenzel) et al..., (2012), *Nat Med* 18 (5): 716-725) та з підвищеним легенеvim ураженням у хворих на ХОЗЛ (Meijer, et al., (2013), *Expert Rev. Clin. Immunol.* 9(11):1055-1068). Еозинофільне запалення легень є ознакою запалення типу 2, яке зазвичай спостерігається при atopічних захворюваннях (Jacobsen, et al..., (2014), *Clin. Exp., Allergy*, 44(9):1119-1136). У людей високі співвідношення CD4/CD8 спостерігаються у пацієнтів з гранулематозними захворюваннями легень та іншими хронічними запальними станами (Costabel, et al., (1997), *Eur. Respir. J.* 10(12):2699-2700; Guo, et.al., (2011), *Ann. Clin. Biochem*, 48(Pt4):344-351). Проточна цитометрія була використана в цьому дослідженні для визначення рівня клітинної інфільтрації в легенях мишей, яким вводили HDM.

Після знекровлення нижню частку правої легені від кожної миші видаляли, нарізали кубиками розміром приблизно від 2 до 3 мм, а потім поміщали в пробірку, що містила розчин ДНКази 20 мкг/мл (Roche, № 10104159001) та 0,7 У/мл Liberase TH (Roche, № 05401151001), розведеного в збалансованому сольовому розчині Хенка (HBSS) (Gibco, № 14025), який інкубували на водяній бані при 37° С протягом 20 хвилин і перемішували кожні 5 хвилин. Вказану реакцію зупиняли додаванням етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA, Gibco, № 15575) в кінцевій концентрації 10 мМ. Кожну легеню потім дисоціювали з використанням дисциатора gentleMACS® (MILtenyi Biotec, № 130-095-937), після чого фільтрували через фільтр 70 мкм і центрифугували. Отриманий легенеvim осад ресуспендували в 1 мл 1X буфера для лізису еритроцитів (Sigma, № R7757) для видалення еритроцитів. Після інкубації протягом 3 хвилин за кімнатної температури додавали 3 мл 1X DMEM для деактивації буфера для лізису еритроцитів. Потім суспензії клітин центрифугували, і отримані осаді клітин ресуспендували в 5 мл буфера MACS (autoMACS Running Buffer; MILtenyi Biotec, № 130-091-221). Вказані ресуспендовані зразки фільтрували через фільтр 70 мкм і 1×10^6 клітин на лунку висівали в 96-лунковий планшет з V-подібним дном. Клітини потім центрифугували і осаді промивали в 1X PBS. Після другого центрифугування клітинні осаді ресуспендували в 100 мкл фіксуючого розчину LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain (Life Technologies, № L23105), розведеного 1:500 в 1X PBS для визначення життєздатності клітин і інкубували протягом 20 хвилин за кімнатної температури в захищеному від світла місці. Після однократного промивання в 1X PBS, клітини інкубували в розчині буфера MACS, що містив 10 мкг/мл очищеного блокуючого антитіла щура проти Fc CD16/CD32 миші, (клон: 2.4G2; BD Biosciences, № 553142) протягом 10 хвилин за 4 °С. Потім вказані клітини інкубували у відповідній 2х суміші антитіл (описаній в Таблиці 7), розведеної в буфері MACS, протягом 30 хвилин за 4 °С, в захищеному від світла місці. Після інкубації з антитілами вказані клітини двічі промивали в буфері MACS, ресуспендували в BD CytoFix (BD Biosciences, № 554655) і потім інкубували протягом 15 хвилин за 4° С, у захищеному від світла місці. Потім вказані клітини промивали, ресуспендували в буфері MACS, а потім переносили в пробірку BD FACS (BD Biosciences, № 352235) для аналізу клітинних інфільтратів методом протокової цитометрії.

CD4 і CD8 Т-клітини були визначені як живі клітини, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻ і живі, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁻, CD8⁺ відповідно. Активовані CD4 Т-клітини були визначені як живі клітини, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻ і CD69⁺. Активовані CD8 Т-клітини були визначені як живі клітини, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁻, CD8⁺ і CD69⁺. Активовані В-клітини були визначені як живі клітини, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁻, CD19⁺ і CD69⁺. ST2+CD4⁺ Т-клітини були визначені як живі клітини, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, ST2⁺ і CD4⁺. Еозинофіли були визначені як живі, CD45⁺, GR1⁻, CD11c^{Lo}, SiglecF^{Hi}. Альвеолярні макрофаги були визначені як живі, CD45⁺, GR1⁻, CD11c^{Hi}, SiglecF^{Hi}. Дані для активованих клітин виражали як частоту активованих клітин (CD69⁺) у межах материнської популяції (CD4, $\pm$ SD). Дані для ST2+CD4⁺ Т-клітини виражали як частоту Т-клітин (визначену, як живі клітини, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺ та CD19⁻). Дані для Еозинофілів та Альвеолярних макрофагів виражали як частоту живих клітин. Співвідношення CD4/CD8 Т-клітин розраховували як відношення частоти CD4 Т до частоти CD8 Т-клітин у популяції живих клітин. Всі дані наведені в Таблиці 8.

Таблиця 7

Антитіла, що використовуються для аналізу методом протокової цитометрії

Антитіло	Флуорохром	Виробник	Номер за каталогом	Кінцеве розведення
CD45.2	PerCP-Cy5.5	eBioscience	45-0454	1/800
Siglec-F	BV 421	BD	562681	1/200
F4/80	APC	eBioscience	17-4801-82	1/200
Ly6G	BUV395	BD	563978	1/200
Ly6C	PE-Cy7	BD	560593	1/100
CD11c	PE	eBioscience	12-0114-82	1/200
CD11b	FITC	eBioscience	53-0112-82	1/200
CD19	BV650	BD	562701	1/400
CD3	PE-Cy7	BD	552774	1/200
CD4	BV421	BioLegend	100438	1/200
CD8	BUV 395	BD	563786	1/400
NKp46 (CD335)	FITC	eBioscience	11-3351	1/800
CD69	PE	eBioscience	12-0691	1/200
CD25	BV510	BioLegend	102042	1/200
ST2	APC	BioLegend	145306	1/200

Аналіз легеневого клітинного інфільтрату:

- 5 Як показано в таблиці 8, частота еозинофілів, активованих В-клітин, активованих клітин CD8, ST2+CD4+ Т-клітин і співвідношення CD4/CD8 Т-клітин у легенях ІЛ-33 HumIn мишей, які отримували HDM протягом 15 тижнів, з або без терапії антитілом ізотипного контролю була значно вищою, ніж у мишей ІЛ-33 HumIn, яким вводили тільки 1X PBS. Аналогічно, спостерігалася тенденція до збільшення частоти активованих CD4 Т-клітин у легенях ІЛ-33 HumIn мишей, які отримували HDM протягом 15 тижнів. Відзначалася тенденція до зниження частоти альвеолярних макрофагів, виявлених протоковою цитометрією в легенях мишей ІЛ-33 HumIn, які отримували HDM протягом 15 тижнів, за відсутності або наявності лікування антитілом ізотипного контролю. Вказана частота альвеолярних макрофагів була значно підвищеною в легенях мишей ІЛ-33 HumIn, які отримували комбінацію анти-ІЛ-33 і антитіл проти ІЛ-4Р α миші протягом останніх чотирьох тижнів хронічної стимуляції HDM порівняно з ІЛ 33 HumIn мишами, яким вводили HDM з антитілом ізотипного контролю протягом цього періоду часу. Аналогічно, спостерігалася тенденція до зниження частоти еозинофілів, активованих CD4 і CD8 Т-клітин, активованих В-клітин, ST2+CD4+ Т-клітин, а також відношення CD4/CD8 Т-клітин у легенях мишей, які отримували комбінацію анти-ІЛ- 33 і антитіла проти ІЛ-4Р α миші протягом останніх чотирьох тижнів хронічної стимуляції HDM порівняно з мишами ІЛ-33 HumIn, яким вводили HDM з антитілом ізотипного контролю протягом цього періоду часу. Вплив на частоту еозинофілів, альвеолярних макрофагів, активованих CD8 Т-клітин, ST2+CD4+ Т-клітин і співвідношення CD4/CD8 в легенях, що спостерігалось для комбінації анти-ІЛ-33 і антитіл проти ІЛ-4Р α миші, демонструє тенденцію до більшої ефективності, ніж терапія певними антитілами окремо.

25

Таблиця 8

Частота легеневого інфільтрату клітин, визначена методом протокової цитометрії

Експериментальна група	Середня частота еозино-філів у вказаній живій популяції ($\pm$ SD)	Середня частота альвеолярних макрофагів у вказаній живій популяції ($\pm$ SD)	Середнє відношення CD4/CD8 Т-клітин ($\pm$ SD)	Середня частота активованих клітин у популяції CD4 Т-клітин ($\pm$ SD)	Середня частота активованих клітин у популяції CD8 Т-клітин ($\pm$ SD)	Середня частота активованих клітин у популяції В Т-клітин ($\pm$ SD)	Середня частота клітин ST2+CD4+ у популяції Т-клітин ($\pm$ SD)
1. Введення 1X PBS (n=5)	1.45 (± 0.92)	5.05 (± 1.64)	3.00 (± 1.48)	13.12 (± 9.89)	3.26 (± 1.64)	0.39 (± 1.17)	3.25 (± 4.15)
2. Стимуляція HDM 11 тижнів (n=4)	17.08 (± 3.94)*	2.34 (± 0.93)	6.42 (± 2.71)	49.95 (± 8.76)	9.58 (± 7.44)	4.67 (± 1.47)**	32.60 (± 12.23)
3. Стимуляція HDM 15 тижнів (n=4)	15.40 (± 3.99)*	4.92 (± 1.55)	6.95 (± 0.71)**	58.53 (± 5.76)	15.68 (± 3.03)*	3.70 (± 1.44)*	37.33 (± 8.98)*
4. Стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло ізотипного контролю (n=4)	15.00 (± 3.35)*	2.33 (± 1.60)	7.49 (± 1.28)*	57.75 (± 7.64)	14.59 (± 3.82)	3.90 (± 1.48)*	37.96 (± 16.71)*
5. Стимуляція HDM 15 тижнів + анти-ІЛ-33 антитіло (n=5)	8.51 (± 7.52)	7.44 (± 4.18)	4.03 (± 1.28)	48.22 (± 5.66)	13.86 (± 5.21)	1.72 (± 0.72)	19.24 (± 5.72)
6. Стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло проти ІЛ-4Р α миші (n=5)	12.30 (± 7.83)	9.93 (± 5.18)	5.56 (± 2.22)	53.42 (± 6.52)	13.11 (± 6.26)	2.14 (± 1.23)	35.01 (± 9.83)*
7. Стимуляція HDM 15 тижнів + анти-ІЛ-33 + антитіла проти ІЛ-4Р α миші (n=5)	3.78 (± 1.60)	14.64 (± 3.86) [†]	2.96 (± 0.93)	42.52 (± 9.79)	7.90 (± 1.30)	1.74 (± 0.91)	11.78 (± 3.73)

Примітка: Вказана статистична значущість, визначена за допомогою Крускала-Уолліса однофакторного ANOVA з тестом множинного порівняння Данна за отриманими результатами (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, порівняно з групами 1: миші ІЛ33 HumIn, ведення фізіологічного розчину; [†] $p < 0,05$, порівняно з групою 4: миші ІЛ33 HumIn, стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло ізотипного контролю).

Відбір легень для кількісного аналізу гістопатології:

- Запальна картина, що спостерігається в цій моделі, супроводжується поширеними і серйозними структурними змінами в легенях, підданих експозиції до HDM, з ознаками метаболізації келихоподібних клітин, збільшення відкладення субепітеліального колагену і значної консолидації легень. Ці патології є відомими ознаками запальних респіраторних захворювань людини, які сприяють зниженню функції легень і гіперреактивності дихальних шляхів (James, (2007) Eur Respir J., Jul; 30 (1): 134-55; Jeong, (2007) Radiographics May-Jun; 27 (3): 617-37).
- Після знекровлення ліві легені видаляли і поміщали на чашки, що містять 3 мл розчину 4 % (w/v) параформальдегіду (Boston Bioproducts, № BM-155) в 1X PBS і зберігали за кімнатної температури протягом 3 днів. Потім зразки легень висушували промокуванням фільтрувальним папером і переносили в пробірки, що містили 70 % етанолу, для гістологічного аналізу. Зразки були відправлені до Histoserv, Inc (Germantown, MD) для заливки парафіном, секціонування та фарбування Шифф-йодною кислотою (PAS) або Гематоксиліном і Еозином (H&E).

Кількісне визначення метаболізації келихоподібних клітин:

Метаплазія келихоподібних клітин і гіперсекреція слизу є ознаками багатьох легневих

захворювань, включаючи астму, хронічне обструктивне захворювання легень і кістозного фіброзу (Boucherat, (20).13) *Exp Lung Res.* 2013 May-Jun;39(4-5):207-16). Надмірне виробництво слизу призводить до обструкції дихальних шляхів і впливає на деякі важливі наслідки, такі як функція легень, якість життя, пов'язана зі здоров'ям, загострення, госпіталізація і смертність людей (Ramos, FL, та ін., (2014), *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, Jan. 24; 9:139-150). PAS-позитивні келихоподібні клітини і загальні епітеліальні клітини підраховували в міліметровій довжині первинного бронха. Метаплазія келихоподібних клітин виражається як частота PAS-позитивних клітин в міліметрі бронхіального епітелію (% , $\pm$ SD), як показано в Таблиці 9.

Кількісна оцінка легеневої консолидації:

"Консолидація легень" визначається як накопичення твердого або рідкого матеріалу в альвеолярному просторі. Консолидація легень є складною кінцевою точкою, яка, ймовірно, відображає поєднання клітинного інфільтрату, гіперплазії та продукування слизу, що використовується тут як вимірювання загальної патології. Відносну частку площі легень, зайнятої кристалічними тілами, кількісно визначали на Movat пентахром забарвлених залитих парафіном зрізах легень з використанням програмного забезпечення ImageJ (NIH, Bethesda, MD). Використовуючи функцію аналізу частинок, вимірювали загальну площу легень у вказаному зрізі, а також консолидовану площу у вказаному зрізі. Частка консолидованої ділянки легень задається співвідношенням обох вимірювань, як показано в Таблиці 9.

Кількісне визначення субепітеліального фіброзу

"Субепітеліальний фіброз" визначається як надлишок відкладення інтерстиціального колагену під легневим епітелієм (Redington, et.al., (1997), *Thorax*, April; 52(4):310-312). Як повідомлялося, підвищений субепітеліальний фіброз специфічно пов'язаний з астмою у людей (Boulet, et.al.,(1997) *Chest*, July; 112(1):45-52; James, AL and Wenzel, S., (2007), *Eur Respir J*, July, 30(1):134-155). В цій моделі субепітеліальний фіброз вимірювали на Masson трихром забарвлених залитих парафіном зрізах з використанням програмного забезпечення HaLo (Indica Labs, NM). За допомогою інструменту "Товщина шару" вказана товщина колагенового шару під бронхіальним епітелієм записувалася багаторазово, з інтервалами приблизно 30 мкм, в межах міліметру первинного бронха. Субепітеліальний фіброз виражається як середня товщина колагенового шару під епітелієм (мкм, $\pm$ SD), як показано в Таблиці 9.

Аналіз гістопатології легень:

Як показано в таблиці 9, була тенденція до збільшення метаплазії келихоподібних клітин в легенях мишей ІЛ-33 HumIn, які отримували HDM протягом 15 тижнів, з або без терапії антитілом ізотипного контролю порівняно з мишами ІЛ-33 HumIn, яким вводили тільки 1X PBS. Аналогічно, було значне збільшення консолидації легень, так само як і в субепітеліальній товщині колагену, у мишей ІЛ-33 HumIn, які отримували HDM протягом 15 тижнів.

На противагу цьому, була тенденція до зниження метаплазії келихоподібних клітин і товщини субепітеліального колагену і значного зниження консолидації легень у мишей ІЛ-33 HumIn, які отримували комбінацію анти-ІЛ-33 і антитіла проти ІЛ-4Р α миші протягом останніх чотирьох тижнів хронічної стимуляції HDM порівняно з мишами ІЛ-33 HumIn, яким вводили HDM з антитілом ізотипного контролю протягом цього періоду часу. Вказані впливи на метаплазію келихоподібних клітин, консолидацію легень і товщину субепітеліального колагену, що спостерігалися для комбінації анти-ІЛ-33 і антитіла проти ІЛ-4Р α миші, показали тенденцію до більшої ефективності, ніж терапія тільки окремими антитілами.

Таблиця 9

Кількісне визначення гістопатології в легенях миші

Експериментальна група	Середня метаплазія келихоподібних клітин (% PAS-позитивних клітин) ($\pm$ SD)	Середня консолідація легень (% $\pm$ SD)	Середня товщина субепітеліального колагена (мкм) ($\pm$ SD)
1. Введення 1X PBS (n=5)	32.94 ($\pm$ 43.61)	6.97 ($\pm$ 3.72)	25.90 ($\pm$ 4.00)
2. Стимуляція HDM 11 тижнів (n=4)	59.98 ($\pm$ 39.01)	70.70 ($\pm$ 12.94)	81.76 ($\pm$ 25.37)*
3. Стимуляція HDM 15 тижнів (n=4)	92.15 ($\pm$ 10.16)	83.21 ($\pm$ 3.65)**	82.12 ($\pm$ 23.04)*
4. Стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло ізотипного контролю (n=4)	81.60 ($\pm$ 17.56)	84.16 ($\pm$ 5.85)**	63.11 ($\pm$ 11.87)
5. Стимуляція HDM 15 тижнів + анти-ІЛ-33 антитіло (n=5)	39.22 ($\pm$ 18.93)	58.82 ($\pm$ 18.26)	70.99 ($\pm$ 23.85)
6. Стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло проти ІЛ-4Р α миші (n=5)	79.82 ($\pm$ 25.02)	57.79 ($\pm$ 18.72)	57.62 ($\pm$ 15.34)
7. Стимуляція HDM 15 тижнів + анти-ІЛ-33 + антитіла проти ІЛ-4Р α миші (n=5)	19.69 ($\pm$ 8.80)	35.01 ($\pm$ 20.68)	48.19 ($\pm$ 18.58)

Примітка: Вказана статистична значущість, визначена за допомогою Крускала-Уолліса однофакторного ANOVA з тестом множинного порівняння Данна за отриманими результатами (** = $p < 0,01$, порівняно з групами 1: миші ІЛ33 HumIn, введення фізіологічного розчину).

Збір сироваток для вимірювання ІgЕ та рівнів HDM-специфічних ІgG1:

Для визначення загальної концентрації ІgЕ в зразках сироватки для кожної миші був використаний набір сендвіч ELISA OPTeia (BD Biosciences, №555248) згідно з інструкціями виробника. Зразки сироватки розводили і інкубували з анти-ІgЕ захоплюючим антитілом, нанесеним на 96-лункові планшети. Сумарний ІgЕ був виявлений біотинільованим вторинним антитілом проти мишачого ІgЕ. Очищені ІgЕ миші, мічені пероксидазою хрому (HRP), використовували в якості стандарту. Хромаген 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (TMB) (набір реагента субстрату BD OPTeia, BD, №555214) використовували для вимірювання активності HRP. Потім додавали стоп-розчин 1 М сірчаної кислоти і вимірювали поглинання при 450 нм на пристрої для зчитування планшетів Molecular Devices SpectraMax M5. Аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення Prism™. Вказані середні значення рівнів циркулюючого ІgЕ в сироватці для кожної експериментальної групи виражені як нг/мл ($\pm$ SD), як показано в Таблиці 10.

Для визначення рівнів HDM-специфічних ІgG1 у зразках сироватки від кожної миші використовували ELISA. Планшети з покриттям HDM (Greer, №XPB70D3A2.5) інкубували з серійно розведеними зразками сироватки мишей з подальшою інкубацією з кон'югованим антитілом щура ІgG1-HRP проти антитіл миші (BD Biosciences, №559626). Всі зразки проявляли з розчином TMB і аналізували, як описано вище. Відносні рівні циркулюючого ІgG1 у сироватці були представлені у вигляді одиниць титру (одиниці титру розраховували, помноживши виміряне значення OD на коефіцієнт розведення, необхідний для досягнення значення OD450, яке було б більше ніж у два рази, ніж фоновий рівень). Вказані середні рівні циркулюючих HDM-специфічних ІgG1 у сироватці для кожної піддослідної групи виражені як титр $\times 10^6$ ($\pm$ SD), як показано в Таблиці 10.

Аналіз рівнів циркуляції ІgЕ і HDM-специфічних ІgG1

Як показано в таблиці 10, було значне збільшення рівнів циркулюючих ІgЕ в сироватці мишей ІЛ-33 HumIn, які отримували HDM протягом 15 тижнів, з або без лікування антитілом ізотипом контролю у мишей ІЛ-33 HumIn, яким вводили тільки 1X PBS. Аналогічно, спостерігалася тенденція до підвищеного рівня циркулюючого HDM-специфічного ІgG1 в

сироватці мишей ІЛ-33 HumIn, які отримували HDM протягом 15 тижнів. Навпаки, було значне зниження рівнів циркулюючих IgE і тенденція до зниження рівнів циркулюючих HDM-специфічних IgG1 в сироватці мишей ІЛ-33 HumIn, яким вводили комбінацію анти-ІЛ-33 і антитіл проти ІЛ-4Р α мишей протягом останніх чотирьох тижнів хронічної стимуляції HDM порівняно з мишами ІЛ-33 HumIn, яким вводили HDM з антитілом ізотипного контролю.

Таблиця 10

Рівні циркулюючих IgE і HDM-специфічних IgG1 в сироватці миші.

Експериментальна група	Середні рівні циркулюючих IgE (мкг/мл) ($\pm$ SD)	Середні рівні циркулюючих HDG-специфічних IgG1 (титр $\times 10^6$) ($\pm$ SD)
1. Введення 1X PBS (n=5)	2.16 ($\pm$ 2.02)	н/в
2. Стимуляція HDM 11 тижнів (n=4)	50.16 ($\pm$ 8.35)	1.18 ($\pm$ 0.15)
3. Стимуляція HDM 15 тижнів (n=4)	131.38 ($\pm$ 106.84)*	1.88 ($\pm$ 0.81)
4. Стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло ізотипного контролю (n=4)	193.07 ($\pm$ 78.96)***	1.62 ($\pm$ 0.62)
5. Стимуляція HDM 15 тижнів + анти-ІЛ-33 антитіло (n=5)	45.74 ($\pm$ 45.74)	1.76 ($\pm$ 0.98)
6. Стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло проти ІЛ-4Р α миші (n=5)	11.12 ($\pm$ 8.65)	0.99 ($\pm$ 0.56)
7. Стимуляція HDM 15 тижнів + анти-ІЛ-33 + антитіла проти ІЛ-4Р α миші (n=5)	6.45 ($\pm$ 5.79) [†]	0.75 ($\pm$ 0.30)

Примітка: Вказана статистична значущість, визначена за допомогою Крускала-Уолліса однофакторного ANOVA з тестом множинного порівняння Данна за отриманими результатами (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ порівняно з групами 1: миші ІЛ33 HumIn, ведення фізіологічного розчину; [†] $p < 0,05$, порівняно з групою 4: миші ІЛ33 HumIn, стимуляція HDM 15 тижнів + антитіло ізотипного контролю). н/в: Не визначено.

Комбіноване лікування H4N9675P і анти-mIL-4Р α , ініційоване в умовах важкого, змішаного запалення, покращує всі виміряні запальні параметри, зменшуючи більшість до початкових рівнів. Додатково, адитивні ефекти спостерігаються на деяких з найбільш тяжких наслідків, включаючи сукупну макропатологію легень, метаболізм келихоподібних клітин, клітинну інфільтрацію легень і рівні цитокінів. Таким чином, блокування обох шляхів одночасно має потенційну можливість впливати на множинні медіатори запалення в умовах важкого змішаного запалення і тканинної патології і нормалізувати численні параметри до початкового рівня.

Приклад 5: Картування епітопа H4N9675P, що зв'язується з ІЛ33 за допомогою водень-дейтерієвого обміну

Для того щоб визначити епітопи ІЛ33 людини, які розпізнаються анти-ІЛ33 антитілом, H4N9675P, були проведені дослідження водень-дейтерієвого (H/D) обміну для антитіла, зв'язаного в комплексі з ІЛ33 людини. Для експериментів використовували рекомбінантний ІЛ33 людини, експресований з С-кінцевою міткою гексагістидину (SEQ ID NO: 356). Загальний опис методу H/D обміну викладено в Ehring et al. (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259 and Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A. Експерименти з H/D обміну проводили на інтегрованій платформі Waters HDX/MS, що складається з Leaptec HDX PAL системи для мічення дейтерієм, Waters Acquity M-Class (допоміжний розчинник) для розщеплення та навантаження зразка, Waters Acquity M-Class (μ Binary допоміжний розчинник) для градієнта аналітичної колонки, і Synapt G2-Si мас-спектрометр для вимірювання маси пепсинових гідролізатів пептиду.

Розчин для мічення готували в 10 мМ буфері PBS в D₂O при pD 7,0 (еквівалент pH 6,6). Для маркування дейтерію 3,8 мкл hIL33-MMH (96 пмоль/мкл) або hIL33-MMH, попередньо змішаного з антитілом в молярному співвідношенні 1: 1, інкубували з 56,2 мкл D₂O розчину для мічення різні проміжки часу (2 хв, 10 хв і недейтерований контроль = 0 сек). Дейтерування припиняли

шляхом перенесення 50 мкл зразка на 50 мкл попередньо охолодженого 0,2 М ТСЕР, 6 М хлористого гуанідину в 100 мМ фосфатному буфері при pH 2,5 (буфер гасіння) і змішаний зразок інкубували при 1,0 °C протягом двох хвилин. Зразок після гасіння вводили в Waters HDX Manager для онлайн-розщеплення пепсином/протеазою XIII в реальному часі. Розщеплені

пептиди вловлювали на попередню колонку ACQUITY UPLC BEH C18 1.7-мкм, 2.1 × 5 мм VanGuard при 0 °C і елювали на ACQUITY UPLC BEH C18 1.7-мкм, 1.0 × 50 мм з використанням 9-хвилинного розділення в градієнті 5 % -40 % В (рухома фаза А: 0,1 % мурашина кислота у воді, рухома фаза В: 0,1 % мурашина кислота в ацетонітрилі). Мас-спектрометр встановлювали на напругу конуса 37 В, час сканування 0,5 с і діапазон маса/заряд 50-1700 Th.

Для ідентифікації пептидів з hIL33-MMH, LC-MS^E дані з недейтерованого зразка обробляли і шукали по базі даних, включаючи людський IL33, пепсин і їх рандомізовані послідовності за допомогою програмного забезпечення Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Вказані ідентифіковані пептиди імпортували в програмне забезпечення DynamX і фільтрували за двома критеріями: 1) мінімальна кількість продуктів на амінокислоту: 0,3 і 2) поріг файлу реплікації: 3. Після цього програмне забезпечення DynamX автоматично визначало поглинання дейтерію кожним пептидом на основі часу утримання та високої точності маси (<10 ppm) в декількох часових точках з 3 повторами в кожній часовій точці.

Використовуючи колонку пепсин/протеаза XIII в режимі реального часу, з'єднану з MS^E збором даних, загалом 68 пептидів з hIL33-MMH були ідентифіковані у відсутності або присутності H4N9675P, що становить 95 % охоплення послідовностей. Одинадцять пептидів мали значно знижене поглинання дейтерування (значення дельти центроїда > 0,4 дальтон з р-значеннями <0,05) при зв'язуванні з H4N9675P і наведені в Таблиці 11. Зафіксована пептидна маса відповідає середньому значенню маси центроїда MH⁺ з трьох повторів. Ці пептиди, що відповідають амінокислотам 1-12 і 50-94 з SEQ ID NO: 349), мали більш низьку швидкість дейтерування при зв'язуванні H4N9675P. Ці ідентифіковані залишки також відповідають залишкам 112-123 і 161-205 IL-33 людини, як визначено за допомогою запису Uniprot O95760 (IL33_HUMAN; див. також SEQ ID NO: 348). Ці дані підтверджують, що амінокислотні залишки 112-123 і 161-205 SEQ ID NO: 348, або амінокислотні залишки 1-12 і 50-94 SEQ ID NO: 349 визначають, принаймні частково, зв'язуючу ділянку в IL- 33 для антитіла H4N9675P.

Таблиця 11

Пептиди IL33 людини зі значним зниженням дейтерування при зв'язуванні з H4N9675P

Номери залишків на основі SEQ ID NO: 349	2 хв. дейтерування			10 хв. дейтерування		
	IL33 Центроїд MH ⁺	IL33+H4N9675P Центроїд MH ⁺	Δ	IL33 Центроїд MH ⁺	IL33+H4N9675P Центроїд MH ⁺	Δ
1-9	893.43±0.06	891.89±0.02	-1.54	893.60±0.03	892.00±0.08	-1.60
1-10	1023.15±0.06	1021.53±0.05	-1.62	1023.31±0.01	1021.69±0.03	-1.63
1-11	1186.18±0.06	1184.39±0.13	-1.80	1186.43±0.02	1184.61±0.03	-1.82
1-12	1300.27±0.07	1297.88±0.04	-2.39	1300.60±0.03	1298.65±0.01	-1.95
50-61	1458.12±0.06	1456.36±0.00	-1.75	1458.27±0.08	1456.34±0.01	-1.93
52-67	1791.16±0.12	1789.89±0.25	-1.27	1791.20±0.02	1790.27±0.02	-0.93
52-72	2353.80±0.12	2351.27±0.05	-2.53	2353.89±0.03	2351.95±0.10	-1.94
53-70	1945.19±0.10	1944.26±0.07	-0.93	1945.25±0.02	1944.84±0.03	-0.41
53-72	2189.95±0.13	2188.03±0.03	-1.92	2190.02±0.02	2188.58±0.04	-1.44
71-81	1253.89±0.07	1253.08±0.18	-0.81	1254.07±0.02	1253.52±0.16	-0.55
71-94	2815.35±0.05	2814.48±0.00	-0.87	2816.06±0.12	2815.10±0.12	-0.96

Приклад 6: Вплив антитіла IL-33 (REGN3500) та антитіла проти IL-4Р (дупілумаб), окремо або в комбінації, в 19-тижневій моделі індукованого алергеном запалення легень з використанням IL-33-, IL-4- та IL- 4Ральфа-гуманізованих мишей

Вказаний вплив тільки антитіла IL-33 окремо, тільки антитіла проти IL-4Р окремо, або комбінації обох антитіл спочатку тестували в прикладі 4 вище, використовуючи мишей, які були гомозиготними по експресії IL-33 людини замість IL- 33 мишей (миші IL-33 HumIn; див. Публікації патентів США №№ 2015/0320021 і 2015/0320022). Повністю людське анти-IL-33 антитіло (REGN3500) і анти-мишаче IL-4Рα антитіло або комбінацію обох порівнювали в цій

моделі і результати описані в Прикладі 4.

Оскільки ні вказане анти-ІЛ-33 антитіло людини (REGN3500), ні анти-ІЛ-4Р антитіло людини (дупілумаб) не зв'язують відповідні їм цільові білки миші, були створені генетично модифіковані миші, у яких ІЛ-33, ІЛ-4 миші, і ектодомени ІЛ-4Р α були замінені відповідними послідовностями людини (ІЛ4^{ra^{hu/hu}} ІЛ4^{hu/hu} ІЛ33^{hu/hu}). Лінія мишей ІЛ4^{ra^{hu/hu}} ІЛ4^{hu/hu} ІЛ33^{hu/hu} була підтверджена як інструмент для дослідження ефекту введення REGN3500 і дупілумабу з використанням 4-тижневої моделі індукованого експозицією до HDM легеневого запалення. У цій моделі миші ІЛ4^{ra^{hu/hu}} ІЛ4^{hu/hu} ІЛ33^{hu/hu}, піддані стимуляції HDM, демонстрували імунні відповіді, подібні до відповідей мишей дикого типу, що оцінювали по еозинофільній інфільтрації легень.

Дослідження, описане нижче, було проведено, щоб визначити, чи може одночасна блокада шляхів ІЛ-33 і ІЛ-4/ІЛ-13 мати більший вплив на запалення легень, ніж блокування будь-якого шляху окремо. У цьому дослідженні ІЛ4^{ra^{hu/hu}} ІЛ4^{hu/hu} ІЛ33^{hu/hu} мишей інтраназально (IN) піддавали експозиції до HDM або фізіологічного розчину протягом 19 тижнів. Контрольну групу ІЛ4^{ra^{hu/hu}} ІЛ4^{hu/hu} ІЛ33^{hu/hu} мишей забивали після 11 тижнів стимуляції HDM для оцінки тяжкості захворювання на початку лікування антитілами. Миші, яким вводили HDM протягом 19 тижнів або не отримували терапії антитілами, або отримували підшкірні (SC) ін'єкції антитіл двічі на тиждень від 12-го тижня до 19-го тижня експозиції до HDM загалом протягом 8 тижнів і 16 доз. Наступні антитіла вводили в кінцевій дозі протеїну 11 мг/кг: (а) 11 мг/кг антитіла ізотипного контролю, (b) 1 мг/кг REGN3500+10 мг/кг антитіла ізотипного контролю (с) 10 мг/кг дупілумабу + 1 мг/кг антитіла ізотипного контролю, або (d) 1 мг/кг REGN3500+10 мг/кг дупілумабу. Ефект терапії REGN3500 і дупілумабом окремо або в комбінації, на мишей, підданих експозиції до HDM, оцінювали за такими патологічними маркерами запалення дихальних шляхів:

- макропатологія (відносна вага легень)

- Інфільтрація легеневої тканини клітинами запалення 1 типу (нейтрофіли, кількісно визначені за рівнем протеїна нейтрофільного маркера мієлопероксидази легень [MPO]) і запальних клітин типу 2 (загальна і активована [CD11c^{Hi}]еозинофіли і ST2⁺CD4⁺ Т-клітини, кількісно визначені методом протокової цитометрії

- рівні запального протеїна цитокину легень (ІЛ-4 людини і ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-1β, ФНП α , IFN γ , GRO α , і MCP-1 мишей, кількісно визначені за допомогою імуноаналізу)

- Рівні циркулюючого системного маркера запалення, протеїна сироваткового амілоїду А [SAA] (визначали кількісно з допомогою імуноаналізу)

Матеріали та методи

Тест-система

Миші гуманізовані по ектодомени ІЛ-33-, ІЛ-4 і ІЛ-4Р α

Ні REGN3500, ні дупілумаб не зв'язують ІЛ-33 миші або ІЛ- 4Р α миші відповідно. Отже, для того, щоб протестувати REGN3500 і дупілумаб паралельно і в комбінації, були створені генетично модифіковані миші, в яких ІЛ-33, ІЛ-4 миші і ектодомени ІЛ-4Р α були замінені на відповідні послідовності людини (ІЛ4^{ra^{hu/hu}} ІЛ4^{hu/hu} ІЛ33^{hu/hu}). Ця потрібна гуманізована лінія мишей була створена з використанням технології VelociGene® в Regeneron Pharmaceuticals (Valenzuela, DM, et al. Nat Biotechnol. (2003), Jun;21(6):652–9, Poueymirou, WT, et al. Nat Biotechnol. (2007) Jan; 25 (1): 91–9) шляхом схрещування раніше охарактеризованої лінії мишей ІЛ-4/ІЛ-4Р α ІЛ4^{ra^{hu/hu}} ІЛ4^{hu/hu} з раніше охарактеризованою ІЛ-33-гуманізованою лінією ІЛ33^{hu/hu}.

Модель запалення легень у мишей

У моделі запалення легень у мишей використовується повторна інтраназальна (IN) експозиція до екстракту HDM, який служить джерелом алергену кліща домашнього пилу (Johnson et al.; American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine; (2004) Feb 1;169 (3):378-85), і є суттєвою причиною домашньої алергії у людей (Calderon, et al., (2015), Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? J Allergy Clin Immunol. 2015 Jul;136 (1):38–48). Як повідомляється, хронічна експозиція до HDM викликає серйозне запалення легень, що призводить до значного легеневого інфільтрату клітин, експресії цитокінів і ремоделювання. Зокрема, було продемонстровано, що у мишей, які хронічно піддавалися експозиції до HDM, виявляють запалення легень змішаного фенотипу типу 1/типу 2, таких як інфільтрація тканин запальними клітинами типу 1 і 2 (нейтрофіли і еозинофіли, відповідно), підвищений сироватковий ІgЕ, підвищений сироватковий HDM-специфічний ІgG1, а також індукція запальних цитокінів типу 2, таких як ІЛ-5 і ІЛ-13 (Johnson, et al. (2004), American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine; Feb 1;169 (3):378-85; Johnson, et al. (2011). PloS ONE. Jan 20;6 (1):e16175; Llop-Guevara, et al., (2008), PloS ONE, Jun 11;3(6):e2426.

Схема досліджу

Модель індукованого чотиритижневою експозицією до HDM запалення легень

Самки мишей генотипів, вказаних в Таблиці 12, були рандомізовані на 2 групи кожна на

генотип. Фізіологічний розчин (20 мкл) або 50 мкг HDM, розведений в 20 мкл фізіологічного розчину, вводили IN 3 рази на тиждень протягом 4 тижнів. Всі миші мали змішаний фенотип C57BL/6NTac/129S6SvEvTac. Мишей забивали через 4 дні після останньої експозиції, збирали легені і визначали інфільтрацію легень еозинофілами.

5

Таблиця 12

Експериментальний протокол для 4-тижневої моделі HDM

Група	Генотип	N	ЕкспозиціяРеагент	Тривалість Експозиція (тижні)
A	Дикий тип	3	20 мкл фізіологічного розчину	4
B	Дикий тип	5	50 мкг HDM	4
C	ІЛ33 ^{hu/hu}	5	20 мкл фізіологічного розчину	4
D	ІЛ33 ^{hu/hu}	5	50 мкг HDM	4
E	ІЛ4ra ^{hu/hu}	5	20 мкл фізіологічного розчину	4
F	ІЛ4ra ^{hu/hu}	5	50 мкг HDM	4
G	ІЛ4ra ^{hu/hu} ІЛ4 ^{hu/hu}	5	20 мкл фізіологічного розчину	4
H	ІЛ4ra ^{hu/hu} ІЛ4 ^{hu/hu}	5	50 мкг HDM	4
I	ІЛ4ra ^{hu/hu} ІЛ4 ^{hu/hu} ІЛ33 ^{hu/hu}	4	20 мкл фізіологічного розчину	4
J	ІЛ4ra ^{hu/hu} ІЛ4 ^{hu/hu} ІЛ33 ^{hu/hu}	5	50 мкг HDM	4

Дикий тип = C57BL/6NTac/129S6SvEvTac

Модель індукованого 19-тижневою експозицією до HDM запалення легень

ІЛ4ra^{hu/hu} ІЛ4^{hu/hu} ІЛ33^{hu/hu} миші, використані в цьому дослідженні, мали змішаний фон C57BL/6NTac (72 %)/129S6SvEvTac (28 %); Самки мишей були рандомізовані в 7 окремих груп. Експозиція до HDM та терапія або контрольний протокол дозування для кожної групи мишей показані в Таблиця 13

10

Фізіологічний розчин (20 мкл) або 50 мкг HDM, розведений в 20 мкл фізіологічного розчину, вводили IN 3 рази на тиждень протягом 19 тижнів. Контрольну групу ІЛ4ra^{hu/hu} ІЛ4^{hu/hu} ІЛ33^{hu/hu} мишей забивали після 11 тижнів експозиції до HDM для оцінки тяжкості захворювання на початку лікування антитілами. Миші, які піддавалися експозиції до HDM протягом дев'ятнадцять тижнів, або не отримували терапії антитілами, або отримували підшкірні ін'єкції (SC) два рази на тиждень від 12-го тижня до 19-го тижня експозиції до HDM загалом 16 доз антитіл, як зазначено в Таблиці 13. Коротко, наступні антитіла вводили в кінцевій дозі протейну 11 мг/кг: 11 мг/кг антитіла ізотипного контролю (група D), 1 мг/кг REGN3500+10 мг/кг антитіла ізотипного контролю (група E), 10 мг/кг дупіумабу + 1 мг/кг антитіла ізотипного контролю (група F), або 1 мг/кг REGN3500+10 мг/кг дупіумабу (група G). Для цілей цього документа групи подвійної терапії антитілами (групи D-G) будуть ідентифіковані тільки за допомогою терапевтичного антитіла (REGN3500 та/або дупіумаб). На 134-у добу дослідження, через 4 дні після останньої IN експозиції та ін'єкції антитіл, всіх мишей забивали, кров збирали за допомогою серцевої пункції, і легені збирали для аналізу.

15

20

25

Експериментальний протокол для 19-тижневої моделі HDM

Група	N	Реагент експозиції	Тривалість експозиції (тижні)	Введення антитіла	Доза антитіла (мг/кг)
A	5	20 мкл фізіологічного розчину	19	Нічого	Нічого
B	9	50 мкг HDM	11	Нічого	Нічого
C	9	50 мкг HDM	19	Нічого	Нічого
D	9	50 мкг HDM	19	IgG4 ^P Контроль	11
E	7	50 мкг HDM	19	REGN3500+IgG4 ^P Контроль	1+10
F	8	50 мкг HDM	19	дупілумаб+ IgG4 ^P Контроль	10+1
G	8	50 мкг HDM	19	REGN3500 + дупілумаб	1+10

IgG4^P Контроль = антитіло ізотип-відповідне контролю, REGN1945

Розведення мишей

Протягом усього періоду кожного експерименту тварини залишалися у приміщенні для утримання тварин Regeneron за стандартних умов і акліматизувалися протягом щонайменше 7 днів до їхнього відбору на дослідження. Всі експерименти на тваринах проводили у відповідності з вказівками Комітету по утриманню та використанню лабораторних тварин в Regeneron.

Спеціалізовані процедури

Вимірювання відносної маси легень

Вимірювання кінцевої маси тіла реєстрували перед забиттям. Після знекровлення ліву легень з кожної миші видаляли і поміщали в пробірку, що містить розчин 4 % параформальдегіду. Сиру масу лівої легень від кожної миші реєстрували за шкалою Mettler Toledo New Classic MS. Для визначення питомої ваги легень відношення сирої маси легень (в мг) до маси тіла (в г) обчислювали шляхом ділення сирої маси легень на масу тіла.

Аналіз клітинних інфільтратів легень

Після знекровлення, нижня частка правої легень з кожної миші була вилучена, поміщена в пробірку, що містила розчин 20 мкг/мл DNase I і 0,7 U/мл Liberase TH, розведений у збалансованому сольовому розчині Хенка (HBSS), і розрізана на шматки розміром приблизно від 2 до 3 мм. Пробірки, що містили нарізані на шматки частки легень, потім інкубували на водяній бані з температурою 37° C протягом 20 хвилин. Вказану реакцію зупиняли додаванням етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA, Gibco, № 15575) в кінцевій концентрації 10 mM. Потім зразки переносили в пробірки gentleMACS C. Потім додавали 2 мл буфера autoMACS і далі зразки дисоціювали з утворенням суспензій окремих клітин, використовуючи gentleMACS™ дисоціатор (Miltenyi Biotec). Потім вказані пробірки центрифугували і отриманий осад ресуспендували в 4 мл 1x буфера для лізису еритроцитів, щоб лізувати еритроцити. Після інкубації протягом 3 хвилин за кімнатної температури додавали 2,5 об'єми 1X DPBS для деактивації вказаного буфера для лізису еритроцитів. Потім вказані суспензії клітин центрифугували, і отримані осад клітин повторно ресуспендували в 1 мл DPBS. Вказані ресуспендовані зразки фільтрували через чашоподібний фільтр 50 мкм filcon і переносили в планшет з лунками об'ємом на 2 мл. Вказаний планшет центрифугували протягом 4 хв при 400 g і кожен зразок ресуспендували в 1 мл DPBS. Приблизно 1.5×10^6 клітини на лунку висівали в 96-лунковий планшет з U-подібним дном. Потім клітини центрифугували і осад клітин ресуспендували в 100 мкл LIVE/DEAD фіксуючого барвника мертвих клітин, розведеного 1: 500 в 1X DPBS для визначення життєздатності клітин. Клітини інкубували з барвником для визначення життєздатності протягом 15 хвилин за кімнатної температури у захищеному від світла місці. Після одного відмивання в 1X DPBS, клітини інкубували з очищеним блокуючим антитілом щура проти Fc CD16/CD32 миші, розведеним 1:50 в 50 мкл буфера autoMACS протягом 15 хвилин за 4 °C. Потім клітини інкубували у відповідній суміші 2x антитіл, розведених в буфері Brilliant Stain (описано в Таблиці 14) протягом 30 хвилин за 4 °C у захищеному від світла місці. Після інкубації з антитілами вказані клітини двічі промивали в буфері autoMACS, ресуспендували в BD CytoFix, розведеному 1: 4 в 1X DPBS, і потім інкубували протягом 15 хвилин за 4 °C, у захищеному від світла місці. Потім вказані клітини промивали і

ресуспендували в буфері autoMACS. Потім клітинні суспензії фільтрували в новий планшет з дном U-форми через фільтрувальний планшет AcroPrep Advance 96 30-40 мкм. Дані зразків були отримані на аналізаторі клітин LSR Fortessa X-20 з використанням додатку HTS (BD Biosciences). Аналіз даних проводили за допомогою програми FlowJo X Software (Tree Star, OR) і статистичний аналіз проводили за допомогою GraphPad Prism™ (GraphPad Software, CA).

Стратегія гейтування для еозинофілів (загальних і активованих)

Еозинофіли були визначені як інтактні, поодинокі, живі клітини (низький сигнал барвника життєздатності LIVE/DEAD), CD45⁺, F4/80⁺, Ly6G⁻, SiglecF⁺. Дані для еозинофілів були виражені як частота живих клітин. В популяції еозинофілів активовані еозинофіли були визначені як інтактні, поодинокі, живі, CD45⁺, F4/80⁺, Ly6G⁻, SiglecF⁺, CD11c^{Hi} і виражені як частота від загальних еозинофілів.

Стратегія гейтування для ST2⁺CD4⁺ Т-клітин

ST2⁺CD4⁺ Т-клітини були визначені як інтактні, окремі, живі, CD45⁺, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻, ST2⁺. Дані для ST2⁺CD4⁺ Т-клітин були виражені як частота CD4⁺ Т-клітин (інтактні, поодинокі, живі, CD45⁺, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻).

Таблиця 14

Антитіла, що використовуються для аналізу протокової цитометрії

Антитіло	Флуорохром	Виробник	Номер по каталогу	Номер лоту	Кінцеве розведення
Суміш 1:	Загальні і Активовані Еозинофіли				
CD45	Alexa Fluor 700	BioLegend	103128	B191240/B211311	1/200
Siglec-F	BV421	BD	562681	4234913/6007723	1/200
F4/80	PE	BD	565410	5168713/5257914	1/500
Ly6G	BUV395	BD	563978	5156800/7103737	1/200
CD11c	PerCP-Cy5.5	BD	560584	5148566/7074758	1/200
Суміш 2:	ST2 ⁺ CD4 ⁺ Т Клітини				
CD45	Alexa Fluor 700	BioLegend	103128	B211311	1/200
CD19	BUV737	BD	564296	6315651	1/200
ST2	PerCP-eFluor710	eBioscience	H6-9335-82	E17254-105	1/200
CD3	PE-Cy7	BD	552774	7074769	1/200
CD8	BUV395	BD	563786	6245983	1/200
CD4	BV786	BD	563331	7075503	1/200

Визначення рівнів протеїна легень

Після знекровлення верхню і середню частки правої легені з кожної миші видаляли, зважували і поміщали в пробірки, що містили розчин екстракційного реагенту тканинного білка (T-PER), доповненого сумішшю інгібіторів протеази. Для досягнення кінцевого співвідношення 1:8 (w/v) ваги тканини легені до об'єму T-PER, додавали по 8 мкл розчину T-PER (містить суміш інгібіторів протеаз) на мг тканини. Зразки легень механічно гомогенізували за допомогою TissueLyser II. Отримані лізати центрифугували для осадження дебрису. Супернатанти, що містять розчинні протеїнові екстракти, переносили у свіжі пробірки і зберігали при 4 °C до подальшого аналізу. Цитокіни і концентрації MPO були виражені як загальна кількість протеїну на досліджувану частку (нг/легеневу частку і мкг/легеневу частку відповідно).

Мультифакторний імуноаналіз цитокінів

Концентрації цитокінів миші (ІЛ-5, ІЛ-13, ІЛ-6, ІЛ-1β, ІЛ-12p70, ФНП α , IFN γ , GRO α і MCP-1) в протеїнових екстрактах легень були виміряні з використанням набору для мультифакторного імунологічного аналізу (Custom mouse 10-Plex, MSD), згідно до інструкцій виробника. Коротко, зразки гомогенату легень розбавляли і інкубували на планшетах з попередньо нанесеними антитілами для захоплення. Калибраторні протеїни, надані виробником, використовувалися як стандарти. Цитокіни у вказаних гомогенатах детектували за допомогою мічених детектуючих антитіл, інкубованих з Read Buffer. Електрохемілюмінесценцію відразу зчитували на приладі MSD Sceptor®. Аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. Найнижча концентрація стандарту в межах лінійного діапазону кожного аналізу була визначена як нижня межа кількісного аналізу (LLOQ) для відповідного цитокіну. Значення LLOQ для окремих тестованих цитокінів були наступними: IFN γ = 0,2 пг/мл, ІЛ-1β = 1,6 пг/мл, ІЛ-5=0,2 пг/мл, ІЛ-6=1,4 пг/мл, ІЛ-12p70=125,8 пг/мл, ІЛ-13=24,4 пг/мл, GRO α : 0,5 пг/мл, MCP-1=9,8 пг/мл,

ФНП α = 2,4 пг/мл.

ELISA ІЛ-4 людини

Концентрації ІЛ-4 людини в протеїнових екстрактах легень вимірювали за допомогою набору для сендвіч-ELISA згідно з інструкціями виробника (Quantikine ELISA для ІЛ-4 людини, R&D Systems). Коротко, гомогенати легень розбавляли і інкубували на 96-лункових планшетах, попередньо покритих антитілом для захоплення антитіл проти ІЛ-4 людини. Очищений ІЛ-4 людини використовували в якості стандарту. Захоплений ІЛ-4 людини був виявлений з використанням HRP-кон'югованого антитіла для детекції проти ІЛ-4 людини. Активність HRP виявляли за допомогою хромагена 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (TMB). Потім додавали стоп-розчин і оптичну густину на 450 нм (OD₄₅₀) вимірювали на пристрої для зчитування планшетів Molecular Devices SpectraMax M5. Аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. Найнижчу концентрацію стандарту в межах лінійного діапазону аналізу визначали як LLOQ=31,25 пг/мл.

ELISA MPO

Концентрації MPO в протеїнових екстрактах легень вимірювали за допомогою набору для сендвіч ELISA згідно інструкцій до виробника (набір ELISA для MPO миші, Hycult Biotech). Коротко, гомогенати легень розбавляли і інкубували на 96-лункових планшетах, попередньо покритих антитілом для захоплення MPO. Очищену MPO миші використовували в якості стандарту. Захоплену MPO детектували з використанням детектуючого біотинільованого антитіла проти MPO миші. Очищений HRP-кон'югований стрептавидин використовували для виявлення біотинільованого антитіла проти MPO миші. Активність HRP виявляли за допомогою хромагена 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (TMB). Потім додавали стоп-розчин і оптичну густину при 450 нм (OD₄₅₀) вимірювали на пристрої для зчитування планшетів Molecular Devices SpectraMax M5. Аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. Найнижчу концентрацію стандарту в межах лінійного діапазону аналізу визначали як LLOQ=156.3 пг/мл.

Збір сироваток

Цільну кров збирали в пробірки Microtainer шляхом серцевої пункції в кінці дослідження. Крові давали утворити згусток, залишаючи її без зрушування за кімнатної температури протягом щонайменше 30 хвилин. Згущену кров і клітини осаджували центрифугуванням при 18000 g протягом 10 хвилин за 4 °C. Отриманий надосад, позначений як сироватка, переносили в чисті поліпропіленові планшети і використовували для визначення рівня циркулюючих антитіл, як описано нижче.

Визначення рівнів SAA в сироватці за допомогою ELISA

Загальні концентрації SAA у вказаних зразках сироватки кожної миші визначали з використанням комерційного імунологічного аналізу (Quantikine ELISA, R&D Systems) згідно з інструкціями виробника. Коротко, зразки сироватки розводили і інкубували на 96-лункових планшетах, попередньо покритих моноклональними антитілами для захоплення SAA миші. Рекombінантний SAA миші використовували в якості стандарту. Захоплений SAA детектували з використанням HRP-кон'югованого поліклонального детектуючого антитіла проти SAA миші. Активність HRP виявляли за допомогою колориметричного субстрату HRP TMB. Потім додавали стоп-розчин розведеної соляної кислоти і OD₄₅₀ вимірювали на пристрої для зчитування планшетів Molecular Devices SpectraMax M5. Концентрацію циркулюючого SAA в сироватці крові для кожного зразка визначали як нг/мл і відображали на графіку у вигляді мкг/мл. Аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. Найнижчу концентрацію стандарту в межах лінійного діапазону вказаного аналізу визначали як LLOQ=31,2 пг/мл.

Визначення рівня IgE сироватки за допомогою ELISA

Загальні концентрації IgE у зразках сироватки для кожної миші визначали з використанням колориметричного набору сендвіч ELISA OPTeIA відповідно до інструкцій виробника. Коротко, зразки сироватки розводили і інкубували на 96-лункових планшетах, попередньо покритих моноклональними антитілами для захоплення IgE. Очищені IgE миші використовували в якості стандарту. Захоплені IgE детектували з використанням детектуючого біотинільованого антитіла проти IgE миші. Очищений HRP-кон'югований стрептавидин використовували для детекції біотинільованого антитіла проти IgE миші. Активність HRP виявляли за допомогою TMB. Потім додавали 2N стоп-розчин розведеної соляної кислоти і OD₄₅₀ вимірювали на пристрої для зчитування планшетів Molecular Devices SpectraMax M5. Концентрація циркулюючого IgE в сироватці для кожного зразка була виражена у мкг/мл. Аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. Найнижчу концентрацію стандарту в межах лінійного діапазону вказаного аналізу визначали як LLOQ=78,15 пг/мл.

Визначення рівнів HDM-специфічних IgG1 сироватки за допомогою ELISA

Для визначення рівнів HDM-специфічних IgG1 у зразках сироватки було розроблено колориметричний аналіз ELISA. На планшети сорбували HDM в концентрації 4 мкг/мл у натрій-фосфатному буфері (PBS) протягом ночі за 4 °C, промивали, блокували розчином 0,5 % BSA в PBS протягом 1 години за кімнатної температури і інкубували з серійно розведеними зразками сироватки миші. Через 1 годину за кімнатної температури планшети промивали і антитіла IgG1, захоплені на планшети, детектували шляхом інкубації з HRP-кон'югованим антитілом щура проти IgG1 миші протягом 1 години за кімнатної температури. Активність HRP детектували за допомогою TMB. Потім додавали 2N стоп-розчин розведеної соляної кислоти і OD₄₅₀ вимірювали на пристрої для зчитування планшетів Molecular Devices SpectraMax M5. Відносні рівні IgG1 в сироватці були представлені у вигляді одиниць титру. Одиниці титру обчислювали шляхом множення вимірюваної OD₄₅₀ на коефіцієнт розведення, необхідний для досягнення OD₄₅₀, який був би більше ніж у 2 рази, ніж фонове значення OD₄₅₀. Аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. Найнижчий коефіцієнт розведення, який використовується в цьому аналізі, визначали як LLOQ=100.

Визначення рівнів мішень-специфічних IgG4 антитіл людини методом ELISA

Концентрація антитіла людини (REGN3500, дупіумаб, або IgG4^P ізотипного контролю) у зразках сироватки для кожної миші визначали з використанням колориметричного сендвіч-ELISA, розробленого для детекції антитіл IgG4 людини. Лунки для мікротитрування покривали антигеном, специфічним для вимірюваного антитіла людини, тобто ІЛ-33 людини (REGN3931) для захоплення REGN3500, ІЛ-4Р α людини (REGN560) для захоплення REGN668, Natural Fel d 1 для захоплення REGN1945, при концентрації 2 мкг/мл в PBS протягом ночі за 4 °C. Лунки промивали чотири рази 0,05 % Tween 20 в DPBS, блокували розчином 5 % BSA в DPBS протягом 3 годин за кімнатної температури і інкубували з серійно розведеними зразками сироватки миші або серійно розведеними калібрувальними стандартами. Очищені антитіла (REGN3500, REGN668 і IgG4^P контрольне антитіло) використовували в якості стандартів для калібрування і кількісного визначення відповідних концентрацій антитіл в сироватці. Через 1 годину за кімнатної температури планшети 7 разів промивали, і IgG4 людини, захоплений на планшети, детектували з використанням біотинільованого моноклонального антитіла миші, специфічного до IgG4 людини з наступною інкубацією з Poly HRP, кон'югованою зі стрептавідином. Активність HRP детектували за допомогою субстрату TMB згідно з інструкціями виробника. Через 10 хвилин вимірювали абсорбцію на 450 нм з використанням мультимодального пристрою для зчитування планшетів Molecular Devices SpectraMax. Найнижчу концентрацію стандарту (REGN3500, REGN668 або IgG4^P контрольне антитіло), використовувану для калібрування (0,002 мкг/мл), визначали як LLOQ цього аналізу. Аналіз даних проводили за допомогою GraphPad Prism™ (GraphPad Software, CA). Концентрацію антитіл людини в сироватці для кожного зразка виражали у мкг/мл.

Статистичний аналіз

Статистичні аналізи проводили з використанням GraphPad Prism версії 7.0 (GraphPad Software, CA).

Статистичний аналіз даних з характеристик ІЛ-33-, ІЛ-4 і ІЛ-4Р α-гуманізованих мишей у 4-тижневій моделі експозиції до HDM

Результати інтерпретували двофакторним дисперсійним аналізом (ANOVA), з наступним тестом Тьюкі для множинного порівняння за отриманими результатами. Відмінності вважалися статистично значущими при $p \leq 0,05$.

Статистичний аналіз даних від терапії REGN3500/дупіумабом у моделі легеневого запалення, індукованого 19-тижневою експозицією до HDM

Нормальність даних оцінювали за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Якщо дані пройшли тест на нормальність, а стандартні відхилення різних груп статистично не відрізнялися один від одного за оцінкою за тестом Брауна-Форсайта, результати інтерпретувалися методом однофакторного ANOVA з тестом Тьюкі для множинного порівняння за отриманими результатами. Якщо дані не пройшли тест на нормальність, або стандартні відхилення суттєво відрізнялись, результати інтерпретували з використанням тесту Крускала-Уолліса з ретроспективним тестом Данна для множинних порівнянь. Відмінності вважалися статистично значущими при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Характеристика мишей, гуманізованих по ІЛ-33-, ІЛ-4 і ІЛ-4Р α-ектодомену

Дикий тип, ІЛ33^{hu/hu} і ІЛ4га^{hu/hu} одиночно гуманізованих, ІЛ4га^{hu/hu} ІЛ4^{hu/hu} подвійно гуманізованих, і ІЛ4га^{hu/hu} ІЛ4^{hu/hu}ІЛ33^{hu/hu} -потрійно гуманізованих мишей піддавали ІН фізіологічному розчину або HDM 3 рази на тиждень протягом 4 тижнів. Мишей забивали через 4

дні після останньої експозиції, і легені збирали для оцінки інфільтрації легень активованими еозинофілами, ідентифікованими за високою експресією CD11c. Індивідуальні дані миші та статистичний аналіз наведено на Фіг. 2. Потрібно гуманізовані ІЛ4^{hu/hu} ІЛ4^{hu/hu} ІЛ33^{hu/hu} миші показали стійку відповідь на HDM, аналогічно до мишей дикого типу, про що свідчить значне збільшення частоти активованих еозинофілів в легеневій тканині після 4 тижнів експозиції до HDM. Миші ІЛ4^{hu/hu} ІЛ4^{hu/hu} ІЛ33^{hu/hu} і миші дикого типу також демонстрували подібну частоту активованого еозинофілу в легеневій тканині за відсутності експозиції до HDM (контрольні миші, яким вводили фізіологічний розчин). Не було виявлено статистично значущих відмінностей при порівнянні HDM-експонованих мишей дикого типу з HDM-експонованими мишами з будь-якої з перевірених ліній гуманізованих мишей, за винятком ІЛ4^{hu/hu} одиночно гуманізованих мишей. Відсутність статистично значущого індукованого експозицією до HDM збільшення відсотка активованої еозинофільної інфільтрації легень в ІЛ4^{hu/hu} мишей, ймовірно, обумовлена тим, що ІЛ-4 миші не бере участь у сигналінгу через рецептор ІЛ-4Р α людини. Показано, що ІЛ-33 людини, з іншого боку, бере участь у сигналінгу через рецепторний комплекс (REGN3500-MX-16069) миші. Крім того, не спостерігалось статистично значущих відмінностей, у порівнянні дикого типу мишей, яким вводили фізіологічний розчин з мишами від будь-якої з перевірених ліній гуманізованих мишей, яким вводили фізіологічний розчин. Ці дані підтверджують придатність вказаних ІЛ4^{hu/hu} ІЛ4^{hu/hu} ІЛ33^{hu/hu} ліній мишей для використання в якості моделі індукованого HDM-експозицією запалення легень у мишей.

Вплив терапії REGN3500 і Дупілумабом у мишей з 19-тижневою експозицією HDM

Мишам ІЛ4^{hu/hu} ІЛ4^{hu/hu} ІЛ33^{hu/hu} IN вводили фізіологічний розчин або HDM 3 рази на тиждень протягом 11 або 19 тижнів. Чотири групи мишей, піддані 19-тижневій експозиції до HDM отримували двічі на тиждень SC-ін'єкції антитіл з 12-го тижня до 19-го тижня; всі інші групи не отримували терапії (нічого, світло-сірі квадрати). Антитіла вводили окремо або в комбінації в кінцевих дозах протеїна 11 мг/кг наступним чином: 11 мг/кг антитіло ізотипного контролю, 1 мг/кг REGN3500+10 мг/кг антитіло ізотипного контролю, 10 мг/кг дупілумабу + 1 мг/кг антитіла ізотипного контролю, або 1 мг/кг REGN3500+10 мг/кг дупілумабу. Одна когорта мишей була забита після 11 тижнів експозиції для визначення запального профілю на початку терапії антитілами (група 11-тижневої експозиції). Інші 4 когорти були забиті на 134 день (групи 19-тижневої експозиції), через чотири дні після останньої експозиції та ін'єкції антитіл. Цільну кров збирали шляхом серцевої пункції для виділення сироватки і легені відбирали для подальшого аналізу. Всі групи склалися з мишей однієї лінії (ІЛ4^{hu/hu} ІЛ4^{hu/hu} ІЛ33^{hu/hu}) якщо не вказано інше.

Аналіз макропатології легень

Відносна вага легень була значно збільшеною у мишей, підданих 19-тижневій експозиції до HDM, у порівнянні з контрольними мишами, яким вводили фізіологічний розчин, Фіг. 3. Це, ймовірно, пояснюється підвищеною клітинною інфільтрацією, відкладенням колагену, гіпертрофією м'язів і виробництвом слизу. У мишей, підданих експозиції до HDM, комбіноване введення REGN3500 і дупілумабу значно блокувало індуковане експозицією до HDM збільшення відносної ваги легень порівняно з мишами, яким вводили антитіло ізотипного контролю (Фіг.3). Тенденція до зниження відносної ваги легень спостерігалася також у мишей, підданих експозиції до HDM, яким вводили дозовано тільки REGN3500.

Аналіз легеневих інфільтратів клітин

Через чотири дні після останньої ін'єкції антитіла легені миші були зібрані і нижня частка правої легені була дисоційована на суспензію окремих клітин для проточного цитометричного аналізу еозинофілів. Еозинофіли визначали як інтактні, поодинокі, живі, CD45⁺, F4/80⁺, Ly6G⁻, SiglecF⁺ і активовані еозинофіли далі визначали як CD11c^{Hi}. Інфільтрація легень активованими еозинофілами повідомлялася як частота (%) загальних еозинофілів легень у (A) і загальна еозинофільна інфільтрація легень повідомлялась як частота (%) загальних еозинофілів легень серед живих (інтактних, поодиноких, живих) клітин. У порівнянні з контрольними мишами, яким вводили фізіологічний розчин, експозиція до HDM протягом 19 тижнів значно підвищила легеневу інфільтрацію клітинами, що оцінювали протоковою цитометрією для виявлення загальних і активованих еозинофілів легень (Фіг.4A і 4B) і ST2⁺CD4⁺ Т-клітин легень (ST2⁺CD4⁺ Т-клітини були визначені як інтактні, поодинокі, живі, CD45⁺, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻, ST2⁺ і повідомлялись як частота CD4⁺ Т-клітин.) (Фіг. 5), або методом імуноаналізу для виявлення рівнів протеїна MPO в легенях в якості маркера нейтрофілів (рівні протеїну MPO були виміряні методом імуноферментного аналізу. Рівні протеїна MPO легень виражені як кількість протеїна MPO (мкг) на частку легені.) (Фіг. 6).

Комбіноване введення REGN3500 і дупілумабу мишам з 19-тижневою експозицією до HDM, але не будь-якого з цих антитіл окремо, значно знижувало рівень інфільтрації легень

активованими еозинофілами порівняно з введенням антитіла ізотипного контролю. Примітно, що рівні інфільтрації легень активованими еозинофілами у мишей, яким вводили REGN3500, і дупілумаб в комбінації, також були значно знижені порівняно з рівнями, індукованими 11-тижневою експозицією до HDM, що відповідає початку лікування Фіг.4А. Хоча введення кожного з антитіл окремо не призводило до значних ефектів, тенденція до зниження легеневої інфільтрації активованими еозинофілами спостерігалася у мишей, яким вводили дупілумаб. Миші, піддані експозиції до HDM, яким вводили REGN3500 і дупілумаб в комбінації, також показали тенденцію до зниження індукованої HDM легеневої інфільтрації за загальними еозинофілами (Фіг. 4В).

У мишей, підданих 19-тижневій експозиції до HDM, яким вводили REGN3500 окремо або в комбінації з дупілумабом, рівні інфільтрації легень ST2⁺CD4⁺ Т-клітинами були значно знижені порівняно з рівнями у мишей, яким вводили ізотипний контроль, і порівняно з рівнями, індукованими 11-тижневою експозицією до HDM на початку лікування (Фіг. 5). Аналогічне блокування інфільтрації (середні частоти в межах 1.02-кратного значення) спостерігалася для REGN3500 окремо і в комбінації з дупілумабом, що вказує на те, що ця патологія в основному обумовлена ІЛ-33.

Подібно до еозинофільної інфільтрації, комбіноване введення REGN3500 і дупілумабу показало більш сильний ефект на блокування нейтрофільної інфільтрації легень, ніж будь-яке з цих антитіл окремо. Індуковане експозицією до HDM підвищення рівня протеїну мієлопероксидази (МПО) легень, маркера нейтрофільної інфільтрації, істотно блокувалося комбінованим введенням REGN3500 і дупілумабу порівняно з ізотипним контролем (Фіг. 6). У той час як введення кожного антитіла окремо не призводило до значних ефектів, тенденція до зниження рівнів протеїна МПО легень спостерігалася у мишей, яким вводили REGN3500.

Аналіз рівня цитокінів в тканинах легень

Вплив експозиції до HDM і терапії антитілами на рівні протеїнів легень (загальний протеїн на частку) оцінювали для цитокінів миші ІЛ-5, ІЛ-13, ІЛ-6, ІЛ-1β, ІЛ-12p70, ФНП α , IFN γ , GRO α , і MCP-1 і для цитокіну hIL-4 людини.

Легені (верхні і середні долі правої легені) збирали, а рівні протеїнів зазначених цитокінів миші вимірювали мультиплексним імуноаналізом. Рівні протеїнів ІЛ-4 людини (hIL-4) виявляли за допомогою комерційно доступного набору ELISA. Рівні протеїнів ІЛ-5 (Фіг. 7А) і ІЛ-6 (Фіг. 7В) вимірювали мультиплексним імуноаналізом. Рівні протеїнів цитокінів легеневої тканини розраховували як кількість протеїна (pg) на легеневу частку. Теплову карту фальшивих кольорів (не показану тут) генерували для позначення відносних цитокінів, що змінюються від світло-жовтого до темно-синього. Шкала відносних рівнів цитокінів легень була створена шляхом визначення найнижчого і найвищого зареєстрованого середнього рівня протеїна легень для кожного окремого цитокіну як 0 % (світло-жовтий) і 100 % (темно-синій) відповідно. Відносні рівні протеїна цитокінів легень (%) були позначені числами і кольором на тепловій карті. Статистичну значущість визначали за допомогою однофакторного ANOVA Крускала-Уолліса з тестом множинного порівняння Данна за отриманими результатами.

Результат для ІЛ-12p70 був нижче нижньої межі кількісного визначення для всіх груп і, отже, тут не повідомляється.

Вісім цитокінів (hIL-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-13, ІЛ-1β, ФНП α , GRO α і MCP-1) показали значне підвищення рівнів протеїна легень у відповідь на 19-тижневу експозицію до HDM порівняно з контрольними мишами, яким вводили фізіологічний розчин. Тільки IFN γ не показував значного збільшення рівнів протеїна легень у відповідь на 19-тижневу експозицію до HDM порівняно з контрольованими мишами, яким вводили фізіологічний розчин, а також на рівні IFN γ не впливало терапевтичне введення антитіл, у порівнянні з мишами, підданими 19-тижневій експозиції до HDM, яким вводили антитіло ізотипного контролю. Індуковані експозицією до HDM підвищені рівні протеїна цитокінів легень (hIL-4, ІЛ-6, ФНП α , GRO α , і MCP-1) були істотно заблоковані комбінованим введенням REGN3500 і дупілумаба, але не введенням будь-якого з цих антитіл окремо, порівняно з мишами, яким вводили антитіло ізотипного контролю.

Інші 2 чутливі до експозиції до HDM цитокіни (ІЛ-5 і ІЛ-1β) показали тенденцію до блокування шляхом комбінованої терапії REGN3500 і дупілумабом, з 83 % і 78 % зниженням рівнів протеїна легень відповідно, у порівнянні з мишами, яким вводили антитіла ізотипного контролю (Фіг.7А і 7В). Введення індивідуальних антитіл призводило до менш виражених тенденцій у зниженні рівнів ІЛ-5 і ІЛ-1β.

Аналіз SAA, системного маркера запалення

Через чотири дні після останньої експозиції і ін'єкції антитіла цільну кров збирали серцевою пункцією і виділяли сироватку. Рівні циркулюючого протеїна SAA вимірювали, використовуючи комерційно доступний набір ELISA. Рівні циркулюючого протеїна SAA виражені як кількість

протеїна SAA (мкг) на мл сироватки. Рівні циркулюючого протеїна системного маркера запалення SAA були значно збільшені у мишей, підданих 19-тижневій експозиції до HDM, у порівнянні з контрольованими мишами, яким вводили фізіологічний розчин (Фіг. 8).

Індуковані експозицією до HDM підвищення рівнів циркулюючих SAA у мишей, яким вводили REGN3500 окремо або в комбінації з дупілумабом (Фіг. 8), були значно меншими, тоді як тенденція до зниження рівнів циркулюючого SAA спостерігалася у мишей, яким вводили тільки дупілумаб.

Кількісна оцінка гуморальних алергічних відповідей після експозиції до HDM

Через чотири дні після останньої експозиції і ін'єкції антитіла цільну кров збирали серцевою пункцією і виділяли сироватку. Рівні циркулюючого протеїна IgE вимірювали, використовуючи комерційно доступний набір ELISA. Рівні циркулюючого протеїна IgE виражені як кількість протеїна IgE (мкг) на мл сироватки.

Гуморальні алергічні відповіді були викликані експозицією до HDM, що оцінювалось за рівнями циркулюючих IgE (Фіг. 9) і HDM-специфічних IgG1 (Таблиця 15) в кінці дослідження (день 134).

Рівні циркулюючого протеїна IgE були значно збільшені у мишей, підданих 19-тижневій експозиції до HDM, у порівнянні з контрольними мишами, яким вводили фізіологічний розчин (Фіг. 9). Середні титри для циркулюючих HDM-специфічних IgG1 зростали від $1,14E+02$ у контрольних мишей, яким вводили фізіологічний розчин, до рівнів від $1,37E+06$ до $2,43E+06$ у мишей, яких піддавали експозиції до HDM протягом 19 тижнів (Таблиця 15). Не було виявлено статистично значущого ефекту REGN3500, дупілумабу або комбінованої терапії для будь-якої з цих кінцевих точок, але тенденція до зниження рівня IgE в сироватці спостерігалася у мишей, яким вводили комбінацію REGN3500 і дупілумаб.

Таблиця 15

Зведена інформація про концентрації HDM-специфічного IgG1 сироватки

HDM-специфічний IgG1 у сироватці (титр)	Фізіологічний розчин 19 тижнів	HDM 11 тижнів	HDM 19 тижнів				
			Без антитіл	IgG4 ^P	REGN3500 + IgG4 ^P	Дупілумаб + IgG4 ^P	REGN3500 + дупілумаб
Середнє значення	$1.14E+02$	$2.19E+06$	$2.43E+06$	$2.14E+06$	$1.47E+06$	$1.37E+06$	$1.21E+06$
SD	$6.15E+01$	$1.07E+06$	$9.81E+05$	$5.60E+05$	$1.17E+06$	$5.79E+05$	$5.29E+05$

Кількісне визначення концентрації антитіл людини в сироватці

Концентрацію сироваткового антитіла IgG4 людини^P (IgG4^P ізотипний контроль, REGN3500 і дупілумаб) визначали в кінці дослідження (день 134), через чотири дні після останнього введення антитіла методом ELISA за допомогою мішені-специфічного анти-IgG4. Середні концентрації антитіл IgG4 людини приведені в Таблиці 16.

Таблиця 16

Рівні антитіл людини в сироватці в кінці дослідження

	Рівні антитіл сироватки, середнє значення $\pm$ SD (мкг/мл)						
	19-тижнів фізіологічний розчин	11-тижнів HDM	19-тижнів HDM	19-тижнів HDM IgG4 ^P (11 мкг/кг)	19-тижнів HDM REGN3500 (1 мкг/кг) + IgG4 ^P (10 мкг/кг)	19-тижнів HDM дупілум аб (10 мкг/кг) + IgG4 ^P (1 мкг/кг)	19-тижнів HDM REGN3500 (1 мкг/кг) + Дупілумаб (10 мкг/кг)
REGN3500	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	n/t	11.4 ± 10.1	n/t	12.7 ± 8.8
Дупілумаб	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	n/t	n/t	8.0 ± 13.5	48.9 ± 27.9
IgG4 ^P	0.0 ± 0.0^a	<LLOQ	<LLOQ	54.5 ± 63.9	88.6 ± 76.0	0.1 ± 0.1	n/t

^a Одна миша в цій групі мала рівні сироваткових IgG4^P > LLOQ, тому тут зазначається округлене значення

СУТЬ ВИНАХОДУ

У порівнянні з контрольними мишами, яким вводили тільки фізіологічний розчин, миші, які піддавалися експозиції до HDM протягом 19 тижнів, продемонстрували значне збільшення у всіх, крім одного (рівні IFN γ легень) з 14 вимірних патологічних маркерів запалення, за відсутності терапії або після введення IgG4^P антитіла ізотипного контролю.

Комбіноване введення REGN3500 і дупілумабу значно блокувало 10/13 досліджуваних кінцевих точок, залежних від експозиції до HDM, порівняно з антитілом ізотипного контролю (відносна вага легень, легенева інфільтрація активованими еозинофілами, нейтрофіли [MPO рівні] і ST2⁺CD4⁺ Т-клітини, рівні протеїна цитокінів hIL-4, IL-6, ФНП α , GRO α , і MCP-1 легень, і сироваткові рівні SAA). Більше того, рівні інфільтрації легень активованими еозинофілами і ST2⁺CD4⁺ Т-клітинами достовірно знижувалися до рівнів, менших за ті, які спостерігалися у мишей, підданих 11-тижневій експозиції до HDM, що відповідає початку лікування антитілами. Застосування тільки дупілумаба не значно блокувало будь-яку з 13 досліджуваних кінцевих точок, чутливих до експозиції до HDM, в той час як введення тільки REGN3500 значно блокувало 2 кінцеві точки: ST2⁺CD4⁺ Т-клітинну інфільтрацію легень і рівні циркулюючого SAA. Для цих двох кінцевих точок блокада, опосередкована тільки REGN3500, була подібна до блокади, опосередкованої REGN3500 у комбінації з дупілумабом, що свідчить про те, що ці патологічні маркери в основному обумовлені дією IL-33.

Комбіноване введення REGN3500 і дупілумабу показало тенденцію до блокування індукованих експозицією до HDM відповідей для інших 3-х HDM-чутливих кінцевих точок без досягнення статистичної значущості (легенева інфільтрація еозинофілами [загальна], рівень протеїна цитокінів IL-5 і IL-1 β легень, і рівні сироваткового протеїна IgE). Для цих маркерів, індивідуальна терапія антитілами з REGN3500 або дупілумабом в цілому призводила до більш слабого зниження, ніж комбінована терапія.

Всі групи терапій антитілами були пов'язані з детектованими рівнями для цільових специфічних людських антитіл IgG4 в сироватці в кінці дослідження. У мишей, які отримували два рази на тиждень протягом 8 тижнів або терапевтичне антитіло окремо, або в комбінації, середні концентрації REGN3500 в сироватці становили відповідно 11,4 $\pm$ 10,1 і 12,7 $\pm$ 8,8 мкг/мл, а середні сироваткові концентрації дупілумаба 8,0 $\pm$ 13,5 і 48,9 $\pm$ 27,9 мкг/мл, відповідно, наприкінці дослідження.

На закінчення, комбінована терапія з REGN3500 і дупілумабом в моделі легеневого запалення, спричиненого 19-тижневою експозицією до HDM, з використанням мишей IL4^{ra}^{hu/hu} IL33^{hu/hu}, призводила до більш вираженого поліпшення майже всіх тестованих патологій легень і маркерів запалення порівняно з терапією будь-яким з цих антитіл окремо.

ВИСНОВОК

Комбінована терапія з REGN3500 і дупілумабом в моделі легеневого запалення, спричиненого 19-тижневою експозицією до HDM з використанням мишей IL4^{ra}^{hu/hu} IL33^{hu/hu} призводила до більш вираженого поліпшення майже всіх досліджуваних патологій легень і маркерів запалення порівняно з терапією з будь-яким з цих антитіл окремо.

Приклад 7: Оцінка SAR440340/REGN3500, або дупілумаба, при застосуванні окремо і при застосуванні в якості комбінованої терапії у пацієнтів з помірною і тяжкою формою ХОЗЛ

Структура дослідження

Це дослідження є рандомізованим, подвійним сліпим, плацебо-контрольованим, паралельно-груповим, 24-тижневим дослідженням для експериментальної перевірки концепції оцінки ефективності, безпеки та переносимості моноклональних антитіл проти IL-33 (SAR440340/REGN3500), моноклональних антитіл проти IL-4R (дупілумаб, також відомий як DUPIXENT®), коли будь-які з них використовують окремо, або при використанні в комбінації у пацієнтів з середньо-важким хронічним обструктивним захворюванням легень (ХОЗЛ).

У дослідженні візьме участь загалом вісімсот тридцять два суб'єкти. Вказане дослідження складатиметься з чотирьох груп пацієнтів, однією групою будуть пацієнти, яким вводять підшкірно (SC) тільки моноклональне антитіло проти IL-33 (SAR440340/REGN3500); другою групою будуть пацієнти, яким вводять підшкірно тільки моноклональне антитіло проти IL-4R (дупілумаб); третьою групою будуть пацієнти, яким будуть вводити як SAR440340/REGN3500, так і дупілумаб підшкірно; і четвертою групою буде плацебо.

Пацієнти в 1 групі отримуватимуть 2 SC ін'єкції SAR440340/REGN3500 кожні 2 тижні протягом 24 тижнів і сумісне введення плацебо дупілумаба як 1 SC ін'єкцію кожні 2 тижні протягом 24 тижнів; пацієнти групи 2 отримуватимуть 1 SC ін'єкцію дупілумабу кожні 2 тижні протягом 24 тижнів і сумісне введення плацебо SAR440340/REGN3500 як 2 ін'єкції SC кожні 2 тижні протягом 24 тижнів; пацієнти в групі 3 отримуватимуть 2 SC ін'єкції SAR440340/REGN3500 кожні 2 тижні протягом 24 тижнів і сумісне введення дупілумабу в 1 SC ін'єкції кожні 2 тижні протягом 24

тижнів; пацієнти в групі 4 отримуватимуть відповідні плацебо для SAR440340/REGN3500 і дупілумабу введенням шляхом 2 і 1 SC ін'єкції, відповідно, кожні 2 тижні протягом 24 тижнів.

Цілі дослідження

Головна мета цього дослідження є визначити і порівняти ефекти антитіла проти ІЛ-33 (SAR440340/REGN3500), моноклонального антитіла проти рецептора ІЛ-4 (дупілумаб), та одночасного введення обох антитіл в порівнянні з плацебо у пацієнтів з хронічним обструктивним захворюванням легень (ХОЗЛ), яких лікували інгеляційним кортикостероїдом (ICS), та β2-адренергічним агоністом тривалої дії (LABA) та/або мускариновим антагоністом тривалої дії (LAMA) в якості фонові терапії (подвійна або потрійна терапія), на покращення дихальної функції, що оцінюється по форсованому об'єму після бронходилататора за 1 секунду (FEV1), протягом 24 тижнів...

Вторинні цілі полягають в оцінці ефектів SAR440340/REGN3500, дупілумабу та одночасного введення обох, кожен у порівнянні з плацебо, на частоту загострення ХОЗЛ від середнього до важкого ступеня (AECOPD) протягом 24 тижнів лікування.

Іншою вторинною метою є оцінка ефектів SAR440340/REGN3500, дупілумабу та сумісного введення обох, кожен у порівнянні з плацебо, на: FEV1 до застосування бронхолітичного засобу протягом 24 тижнів; Тривалість від початкового рівня до першої помірної або важкої події AECOPD протягом 24 тижнів; Оцінка клінічних симптомів ХОЗЛ; Безпека та переносимість.

Критерії включення

Критерії включення для вказаного дослідження наступні: (1) Пацієнти з помірним до важкого хронічним обструктивним захворюванням легень (ХОЗЛ) (після застосування бронхолітичного засобу об'єм форсованого видиху за одну секунду (FEV1), форсована життєва ємність (FVC) <70 % і після застосування бронхолітичного засобу FEV1 % прогнозований 80 %, але ≥30 %); (2) Пацієнти з оціночним тестом на ХОЗЛ (CAT) з балом ≥ 10 при скринінговому візиті 1 та візиті 2/Рандомізація; (3) Пацієнти з підтвердженими в анамнезі ознаками і симптомами хронічного бронхіту (хронічний продуктивний кашель протягом 3 місяців на рік до скринінгу пацієнта, у якого інші причини хронічного кашлю (наприклад, гастроєзофагеальний рефлюкс, хронічний риносинусит, бронхоектаз) були виключені. (4) Пацієнти з задокументованими в анамнезі ≥ 2 помірних загострень або ≥1 важким загостренням протягом року до скринінгу; (5) Пацієнти, які отримували стандартну терапію протягом 3 місяців до візиту 2/рандомізації та на стабільній дозі протягом щонайменше 1 місяця до скринінгового візиту 1, включаючи або: подвійну терапію: β-агоністом (LABA) тривалої дії + мускариновим антагоністом (LAMA) тривалої дії або інгеляційним кортикостероїдом (ICS) + LABA або ICS+LABA; або потрійну терапію: ICS+LABA+LAMA; (6) Підписана письмова інформована угода; та (7) Курці зараз або в минулому з історією куріння ≥10 упаковок/рік.

Критерії виключення

Критерії виключення для вказаного дослідження такі: (1) Вік ≤40 років або > 75 років; (2) Пацієнти з індексом маси тіла (ІМТ) <16; (3) Пацієнти з ХОЗЛ, діагностованим протягом 6 місяців до рандомізації; (4) Поточний діагноз астми відповідно до керівних принципів Глобальної ініціативи з астми (GINA); (5) Серйозне захворювання легень інше, ніж ХОЗЛ (наприклад, фіброз легень, саркоїдоз, інтерстиціальна хвороба легень, легенева гіпертензія, бронхоектазія, еозинофільний гранулематоз з поліангітом, значне апное під час сну при двохрівневому позитивному тиску в дихальних шляхах тощо) або інше діагностоване легенево або системне захворювання з підвищеним відносним вмістом периферичних еозинофілів; (6) Діагностований дефіцит α-1 анти-трипсину; (7) Прогресуюче ХОЗЛ з хронічною необхідністю (> 15 годин на добу) кисневої підтримки; (8) Пацієнт з помірним або тяжким гострим загостренням ХОЗЛ протягом 4 тижнів до скринінгу; (9) Пацієнт, який переніс інфекцію верхніх або нижніх дихальних шляхів протягом 4 тижнів до скринінгу/візиту 1 або протягом періоду скринінгу; (10) Планова пневмонектомія або операція по зменшенню обсягу легень в анамнезі; (11) Пацієнти з анамнезом системної реакції гіперчутливості на біологічний препарат.

Приклад 8. Оцінка SAR440340/REGN3500, або дупілумабу, при застосуванні окремо та при застосуванні в якості комбінованої терапії у пацієнтів з помірною та тяжкою формою астми

План дослідження

Це дослідження - рандомізоване, подвійне сліпе, плацебо-контрольоване, паралельно-групове, 12-тижневе дослідження (PoC) для перевірки гіпотези для оцінки ефективності, безпеки та переносимості SAR440340/REGN3500, дупілумабу (також відомого як DUPIXENT®), і сумісного введення SAR440340 і дупілумабу у пацієнтів з середньо-важкою астмою, яка не достатньо добре контролюється за допомогою інгеляційного кортикостероїду (ICS) плюс β2-адренергічного агоніста (LABA) тривалої дії.

У цьому дослідженні візьмуть участь понад 100 суб'єктів. Вказане дослідження

складатиметься з чотирьох груп пацієнтів, однією групою будуть пацієнти, яким вводять підшкірно (SC) тільки моноклональне антитіло проти ІЛ-33 (SAR440340/REGN3500); другою групою будуть пацієнти, яким вводять підшкірно тільки моноклональне антитіло проти ІЛ-4Р (дупілумаб); третьою групою будуть пацієнти, яким будуть вводити як SAR440340/REGN3500, так і дупілумаб підшкірно; і четвертою групою буде плацебо.

Пацієнти в групі 1 отримуватимуть SAR440340/REGN3500 введенням 2 підшкірних (SC) ін'єкцій кожні 2 тижні протягом 12 тижнів і сумісне введення плацебо дупілумабу шляхом 1 SC ін'єкції кожні 2 тижні протягом 12 тижнів; пацієнти в групі 2 отримуватимуть дупілумаб введенням 1 SC ін'єкції кожні 2 тижні протягом 12 тижнів і сумісне введення SAR440340/REGN3500 плацебо шляхом 2 ін'єкцій SC кожні 2 тижні протягом 12 тижнів; пацієнти в групі 3 отримуватимуть SAR440340/REGN3500 введенням 2 ін'єкцій SC кожні 2 тижні протягом 12 тижнів, і сумісне введення дупілумабу, шляхом 1 SC ін'єкції кожні 2 тижні протягом 12 тижнів; пацієнти в групі 4 отримуватимуть сумісне введення відповідних плацебо для SAR440340/REGN3500 і дупілумабу, введенням 2 і 1 ін'єкцій SC, відповідно, кожні 2 тижні протягом 12 тижнів.

Цілі дослідження

Первинною метою дослідження є оцінка ефектів SAR440340/REGN3500 з або без дупілумабу, порівняно з плацебо, на зниження частоти випадків подій "втрати контролю астми" (LOAC).

Другорядні цілі дослідження оцінити ефекти SAR440340/REGN3500 і сумісного введення SAR440340/REGN3500 і дупілумабу, порівняно з плацебо, на об'єм форсованого видиху за 1 секунду (FEV1); оцінити ефекти сумісного застосування SAR440340/REGN3500 і дупілумаба, порівняно з SAR440340/REGN3500 і порівняно з дупілумабом на FEV1; оцінити ефекти конкурентного введення SAR440340/REGN3500 і дупілумаба порівняно з SAR440340/REGN3500 окремо на зниження LOAC; і оцінити безпеку і переносимість SAR440340/REGN3500 окремо і при сумісному застосуванні з дупілумабом.

Критерії включення

Критерії включення для вказаного дослідження наступні: (1) Дорослі пацієнти (від 18 років і старше) з терапевтичним діагнозом лікаря "астма" протягом принаймні 12 місяців на основі рекомендацій Глобальної ініціативи з астми (GINA) 2016, у яких астма частково контролюється або не контролюється на комбінованій терапії ICS/LABA за наступними критеріями: існуюче лікування середньо- та високодозовими інгаляційними кортикостероїдами (ICS) (≥ 250 мкг флутиказону пропіонату двічі на день (BID) або еквівалентною добовою дозою ICS максимально 2000 мкг/день флутиказону пропіонату або клінічно співставно) у комбінації з бета -агоністом тривалої дії (LABA) в якості вторинного препарату базової терапії протягом щонайменше 3 місяців зі стабільною дозою ≥ 1 місяць до візиту 1; (2) Об'єм форсованого видиху до застосування бронхолітичного засобу за одну секунду (FEV1) ≥ 50 %, але ≤ 85 % прогнозованої норми при візиті 2/початковий рівень; (3) Оборотність принаймні 12 % і 200 мл FEV1 після введення 2-4 затижок (200-400 мкг) альбутеролу/сальбутамолу або левальбутеролу/левосальбутамолу під час скринінгу (до 3 можливостей під час одного візиту дозволено з максимумом 12 затижок препарату, що полегшує дихання при його переносимості пацієнтом); задокументована історія 20 % варіабельності FEV1 до застосування бронхолітичного засобу при порівнянні 2 прийнятих спірометричних оцінок протягом 6 місяців до візиту 1/скринінгу, або позитивна гіперреактивність дихальних шляхів до метахоліну протягом 12 місяців до візиту 1/Скринінгу вважається прийнятною для виконання цього критерію включення; (4) Перенесена протягом 1 року до візиту 1 принаймні один раз, будь-яка з наступних подій: терапія системним стероїдом (перорально або парентерально) з погіршенням астми, або госпіталізація або екстрена медична допомога через погіршення астми; (5) Підписана письмова інформована згода.

Критерії виключення

Критерії виключення для вказаного дослідження наступні: (1) Пацієнти < 18 років або > 70 років (тобто досягли віку 71 року при візиті скринінгу); (2) Пацієнти з індексом маси тіла (ІМТ) < 16 ; (3) Хронічне захворювання легень (наприклад, хронічне обструктивне захворювання легень [ХОЗЛ] або ідіопатичний фіброз легень [ІПФ]), які можуть погіршити функцію легень; (4) Астма, що загрожувала життю в анамнезі (тобто тяжке загострення, що вимагає інтубації); (5) Коморбідне захворювання, яке може заважати оцінці ІМР; (6) Пацієнти з будь-якими з наступних подій протягом 4 тижнів до їх скринінгового візиту 1: пульс-терапія з 1 або більше системними (пероральними та/або парентеральними) стероїдами через погіршення астми, або госпіталізація або невідкладна медична допомога через погіршення астми; (7) Бали, набрані по Опитуванню для оцінки контролю астми, версії з 5 питаннями (ACQ-5), 1,25 або 3,0 при

V2/рандомізація. Під час періоду скринінгу прийнятний ACQ-5 до ≤ 4 ; (8) Антиімуноглобулін Е (IgE) терапія (наприклад, омалізумаб [Xolair®]) протягом 130 днів до візиту 1 або будь-яка інша біологічна терапія (включаючи анти-IL5 mAb) або системним імунодепресантом (наприклад, метотрексат) для лікування запального захворювання або аутоімунного захворювання (наприклад, ревматоїдний артрит, запальне захворювання кишечника, первинний біліарний цироз, системний червоний вовчак, розсіяний склероз тощо) та інші захворювання протягом 2 місяців або 5 періодів напіврозпаду до візиту 1, в залежності від того, що більше; (9) Пацієнти з системною реакцією гіперчутливості на біологічний препарат в анамнезі; (10) Пацієнти в процесі або на початку бронхіальної термoplastики протягом 2 років до візиту 1 або планують розпочати терапію протягом періоду скринінгу або рандомізованого періоду терапії; (11) Курець на цей період часу або такий, хто припинив куріння протягом 6 місяців до візиту 1; (12) Курець у минулому з історією куріння > 10 пачок на рік.

Перелік послідовностей

15 <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
 Jamie Orengo
 Jeanne Allinne
 Andrew Murphy
 20 George Yancopoulos

<120> СПОСОБИ ЛІКУВАННЯ ЗАПАЛЬНИХ СТАНІВ

<130> 10142WO01

25 <150> 62/428634
 <151> 2016-12-01

30 <150> 62/473738
 <151> 2017-03-30

<150> 62/567318
 <151> 2017-10-03

35 <160> 356

<170> FastSEQ для Windows версія 4.0

40 <210> 1
 <211> 366
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

45 <220>
 <223> Штучна

<400> 1
 cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggct cctgagactc 60
 50 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatggca tgcattgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagaaa taaatactat 180
 acagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat 240
 ctgcaaatgg acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagagg 300
 tatatcagca gctattatgg ggggttcgac ccctggggcc agggagccct ggtcaccgtc 360
 55 tcctca 366

<210> 2
 <211> 122
 <212> БІЛОК
 60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 24
 25 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

30 <400> 3
 ggattcacct tcagtagtta tggc 24

<210> 4
 35 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 40 <223> Штучна

<400> 4
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

45 <210> 5
 <211> 24
 <212> ДНК
 50 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

55 <400> 5
 atatggtatg atggaagaaa taaa 24

<210> 6
 <211> 8
 60 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

<400> 6
5 Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys
1 5

<210> 7
10 <211> 45
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
15 <223> Штучна

<400> 7
gcgagagaga ggtatatcag cagctattat ggggggttcg acccc 45

<210> 8
20 <211> 15
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
25 <223> Штучна

<400> 8
30 Ala Arg Glu Arg Tyr Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 9
35 <211> 321
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
40 <223> Штучна

<400> 9
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggattag agttggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggctct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
45 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatacagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccattcac tttcggccct 300
gggaccsaaac tggatatcaa g 321

<210> 10
50 <211> 107
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
55 <223> Штучна

<400> 10
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
60 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
5 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 Ala Asn Ser Phe Pro Phe
85 90 95
10 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
100 105

15 <210> 11
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

20 <220>
<223> Штучна

<400> 11
caggggtatta gtagttgg 18

25 <210> 12
<211> 6
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

30 <220>
<223> Штучна

<400> 12
Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5
35

40 <210> 13
<211> 9
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

45 <400> 13
gctgcatcc 9

50 <210> 14
<211> 3
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

55 <400> 14
Ala Ala Ser
1

60 <210> 15

```

<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

5  <220>
    <223> Штучна

    <400> 15
саасaggcta асagttttccc attcact
10
    <210> 16
    <211> 9
    <212> БІЛОК
    <213> Штучна послідовність
15
    <220>
    <223> Штучна

    <400> 16
20  Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr
    1          5

    <210> 17
25  <211> 357
    <212> ДНК
    <213> Штучна послідовність

    <220>
30  <223> Штучна

    <400> 17
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagac ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagc agctatgccа tgagctgggt ccgccaggct 120
35  ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attagtggta gtggaagtag cacagactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatt tccagagaca attccaggga caccgtgcat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaacgttc 300
tactacttct acggttttga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctcctca 357

40  <210> 18
    <211> 119
    <212> БІЛОК
    <213> Штучна послідовність

45  <220>
    <223> Штучна

    <400> 18
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
50  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
55  Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asp Thr Leu His
65  65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
60  85          90          95
Ala Lys Thr Phe Tyr Tyr Phe Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly

```

		100		105		110
	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser					
	115					
5	<210> 19					
	<211> 24					
	<212> ДНК					
	<213> Штучна послідовність					
10	<220>					
	<223> Штучна					
	<400> 19					
15	ggattcacct tcagcagcta tgcc					24
	<210> 20					
	<211> 8					
	<212> БІЛОК					
20	<213> Штучна послідовність					
	<220>					
	<223> Штучна					
25	<400> 20					
	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala					
	1 5					
30	<210> 21					
	<211> 24					
	<212> ДНК					
	<213> Штучна послідовність					
35	<220>					
	<223> Штучна					
	<400> 21					
40	attagtggta gtggaagtag caca					24
	<210> 22					
	<211> 8					
	<212> БІЛОК					
	<213> Штучна послідовність					
45	<220>					
	<223> Штучна					
	<400> 22					
50	Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr					
	1 5					
	<210> 23					
55	<211> 36					
	<212> ДНК					
	<213> Штучна послідовність					
	<220>					
60	<223> Штучна					

<400> 23
gcgaaaacgt tctactactt ctacggtttg gacgtc 36

<210> 24
5 <211> 12
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
10 <223> Штучна

<400> 24
Ala Lys Thr Phe Tyr Tyr Phe Tyr Gly Leu Asp Val
1 5 10

15 <210> 25
<211> 321
<212> ДНК
20 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

25 <400> 25
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctttaagaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtca gggcattagc aattatttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagtcc ctaaggctcct aatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagtt ttactctca ccatcagcag cctgcagact 240
30 gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tatagcagtg cccattcac tttcggcct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 26
<211> 107
35 <212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

40 <400> 26
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Arg
1 5 10 15
45 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 Val 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 Val Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Phe
85 90 95
55 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 27
60 <211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

	<220>	
	<223> Штучна	
5	<400> 27 cagggcatta gcaattat	18
	<210> 28	
	<211> 6	
	<212> БІЛОК	
10	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Штучна	
15	<400> 28 Gln Gly Ile Ser Asn Tyr 1 5	
20	<210> 29	
	<211> 9	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
25	<220>	
	<223> Штучна	
30	<400> 29 gctgcatcc	9
	<210> 30	
	<211> 3	
	<212> БІЛОК	
	<213> Штучна послідовність	
35	<220>	
	<223> Штучна	
40	<400> 30 Ala Ala Ser 1	
45	<210> 31	
	<211> 27	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
50	<220>	
	<223> Штучна	
	<400> 31 caaaagtata gcagtgtccc attcact	27
55	<210> 32	
	<211> 9	
	<212> БІЛОК	
	<213> Штучна послідовність	
60	<220>	
	<223> Штучна	

<400> 32
Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Phe Thr
1 5

5
<210> 33
<211> 351
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

10
<220>
<223> Штучна

<400> 33
15 caggtgcttc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggccac agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggatc cactttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg atcaacccta acaatgggtg cacaaactat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accaggga cgtccatcag cacagcctac 240
atggaattga gcaggctgag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagagttg 300
20 cgggtataact ggaagtcctg gggccaggga accctgggtca ccgtctcctc a 351

<210> 34
<211> 117
<212> БІЛОК
25 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

30 <400> 34
Gln Val Leu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Thr Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
35 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
40 65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Leu Arg Tyr Asn Trp Lys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
45 Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
50 <211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
55 <223> Штучна

<400> 35
ggatccactt tcaccggcta ctat 24

60 <210> 36
<211> 8

<212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 5 <223> Штучна

 <400> 36
 Gly Ser Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
 1 5
 10

 <210> 37
 <211> 24
 <212> ДНК
 15 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна

 20 <400> 37
 atcaacccta acaatggtgg caca 24

 <210> 38
 <211> 8
 25 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна
 30
 <400> 38
 Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr
 1 5
 35
 <210> 39
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 40
 <220>
 <223> Штучна

 <400> 39
 45 gcgagagagt tgcggtataa ctggaagtcc 30

 <210> 40
 <211> 10
 <212> БІЛОК
 50 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна

 55 <400> 40
 Ala Arg Glu Leu Arg Tyr Asn Trp Lys Ser
 1 5 10

 60 <210> 41
 <211> 324

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
5 <223> Штучна

<400> 41
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagtcacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttggc aggccctact tagcctggta ccaacagata 120
10 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tgacatccca 180
gacaggttca gtggcaatgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag tagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatgata attcccctta tacttttggc 300
caggggacca ggctggagat caaaa 324

15 <210> 42
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

20 <220>
<223> Штучна

<400> 42
25 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Arg Pro
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
30 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Asn Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Ser Pro
35 85 90 95
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

40 <210> 43
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

45 <220>
<223> Штучна

<400> 43
cagagtgttg gcagggccta c 21

50 <210> 44
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

55 <220>
<223> Штучна

<400> 44
60 Gln Ser Val Gly Arg Pro Tyr
1 5

```

5  <210> 45
    <211> 9
    <212> ДНК
    <213> Штучна послідовність

    <220>
    <223> Штучна

10  <400> 45
    ggtgcatcc 9

    <210> 46
    <211> 3
    <212> БІЛОК
15  <213> Штучна послідовність

    <220>
    <223> Штучна

20  <400> 46
    Gly Ala Ser
    1

25  <210> 47
    <211> 27
    <212> ДНК
    <213> Штучна послідовність

30  <220>
    <223> Штучна

    <400> 47
35  cagcagtatg ataattcccc ttatact 27

    <210> 48
    <211> 9
    <212> БІЛОК
    <213> Штучна послідовність
40

    <220>
    <223> Штучна

    <400> 48
45  Gln Gln Tyr Asp Asn Ser Pro Tyr Thr
    1 5

    <210> 49
50  <211> 366
    <212> ДНК
    <213> Штучна послідовність

    <220>
55  <223> Штучна

    <400> 49
    gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacaac ctgggggggtc cctgagactc 60
    tcctgtgcag cctctggatt cacctttaga agctttgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
60  ccaggggaagg ggctggaatt ggtctcagat ctcaggacta gtggtggtag tacatactac 180
    gcagactccg tgaagggccg gctcaccatc tccagagaca attccaagaa cgcgtgtat 240

```

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagccac 300
tatagcacca gctggttcgg gggctttgac tactggggcc aggggaaccct ggtcactgtc 360
tcctca 366

5 <210> 50
<211> 122
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Штучна

<400> 50
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
15 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ser Asp Leu Arg Thr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Leu 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
25 85 90 95
Ala Lys Ser His Tyr Ser Thr Ser Trp Phe Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

30
<210> 51
<211> 24
<212> ДНК
35 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

40 <400> 51
ggattcacct ttagaagctt tgcc 24

<210> 52
<211> 8
45 <212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

50
<400> 52
Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Ala
1 5

55
<210> 53
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

60
<220>

<223> Штучна
 <400> 53
 5 ctcaggacta gtggtggtag taca 24
 <210> 54
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 10
 <220>
 <223> Штучна
 <400> 54
 15 Leu Arg Thr Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 55
 20 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 25 <223> Штучна
 <400> 55
 gcgaaaagcc actatagcac cagctgggtc gggggctttg actac 45
 30 <210> 56
 <211> 15
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 35 <220>
 <223> Штучна
 <400> 56
 40 Ala Lys Ser His Tyr Ser Thr Ser Trp Phe Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 57
 <211> 321
 45 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 50
 <400> 57
 gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgctt ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggcgagtca gggtttttag agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 55 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcaccaa cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321
 <210> 58
 60 <211> 107
 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 5
 <400> 58
 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 Arg Ala Ser Gln Gly Phe Ser Ser Trp
 10 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 Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 15 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 20 100 105
 <210> 59
 <211> 18
 25 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 30
 <400> 59
 caggggtttta gcagctgg 18
 <210> 60
 35 <211> 6
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 40 <223> Штучна
 <400> 60
 Gln Gly Phe Ser Ser Trp
 1 5
 45
 <210> 61
 <211> 9
 <212> ДНК
 50 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 55 <400> 61
 gctgcatcc 9
 <210> 62
 <211> 3
 60 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

<400> 62
5 Ala Ala Ser
1

<210> 63
10 <211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
15 <223> Штучна

<400> 63
саасaggcta асаgtttccc tctcact 27

<210> 64
20 <211> 9
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
25 <223> Штучна

<400> 64
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
30 1 5

<210> 65
35 <211> 366
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
40 <223> Штучна

<400> 65
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacgttttagc agctatgtca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaagt attagtggta atgggtgtag cacaaactac 180
45 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240
ctggaaatga асagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatcactg 300
ggaactacca cgactttttt ggggtttgac tattggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366

<210> 66
50 <211> 122
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
55 <223> Штучна

<400> 66
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
60 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

		20		25		30										
	Val	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35		40		45										
5	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Asn	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	Phe
	65					70					75				80	
	Leu	Glu	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
10	Ala	Lys	Ser	Leu	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Phe	Leu	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp
				100					105					110		
	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
			115					120								
15																
	<210> 67															
	<211> 24															
	<212> ДНК															
	<213> Штучна послідовність															
20																
	<220>															
	<223> Штучна															
	<400> 67															
25	ggattcacgt ttagcagcta tgtc															24
	<210> 68															
	<211> 8															
	<212> БІЛОК															
30	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
	<223> Штучна															
35	<400> 68															
	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Val								
	1					5										
40																
	<210> 69															
	<211> 24															
	<212> ДНК															
	<213> Штучна послідовність															
45																
	<220>															
	<223> Штучна															
	<400> 69															
50	attagtggta atggtggtag caca															24
	<210> 70															
	<211> 8															
	<212> БІЛОК															
	<213> Штучна послідовність															
55																
	<220>															
	<223> Штучна															
	<400> 70															
60	Ile	Ser	Gly	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr								
	1				5											

<210> 71
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> Штучна
 <400> 71
 10 gcgaaatcac tgggaactac caccgactttt ttgggggttg actat 45
 <210> 72
 <211> 15
 <212> БІЛОК
 15 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 20 <400> 72
 Ala Lys Ser Leu Gly Thr Thr Thr Thr Phe Leu Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 25 <210> 73
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 30 <220>
 <223> Штучна
 <400> 73
 35 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggcgagtca gggattagc agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacatat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321
 40 <210> 74
 <211> 107
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> Штучна
 <400> 74
 50 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 Arg Ala Ser Gln Gly 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
 55 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 60 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
 85 90 95

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

5 <210> 75
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Штучна

<400> 75
caggggtatta gcagctgg

18

15 <210> 76
<211> 6
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

20 <220>
<223> Штучна

<400> 76
25 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 77
30 <211> 9
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
35 <223> Штучна

<400> 77
gctgcatcc

9

40 <210> 78
<211> 3
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

45 <220>
<223> Штучна

<400> 78
Ala Ala Ser

50 1

<210> 79
<211> 27
55 <212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
60 <223> Штучна

<400> 79

caacaggcta acagtttccc tctcact

27

<210> 80

<211> 9

5 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

10

<400> 80

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr

1

5

15

<210> 81

<211> 363

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

20

<220>

<223> Штучна

<400> 81

25 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttattact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtt gattgggtat atttattaca gtgggagcac caattataac 180
ccctccctca agatcgagt caccatatct gtagacacgt ccaagaacca cttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtatat actgtgagag atcccgat 300
30 accagtagtt ggtacggttc ttttgatatc tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
tca 363

<210> 82

<211> 121

35 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

40

<400> 82

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

60

<210> 83

<211> 24

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 5 <223> Штучна

 <400> 83
 ggtggctcca tcagtagtta ttac 24

 10 <210> 84
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 15 <220>
 <223> Штучна

 <400> 84
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr
 20 1 5

 <210> 85
 <211> 21
 25 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна
 30
 <400> 85
 atttattaca gtgggagcac c 21

 <210> 86
 35 <211> 7
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 40 <223> Штучна

 <400> 86
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
 1 5
 45
 <210> 87
 <211> 45
 <212> ДНК
 50 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна

 55 <400> 87
 gcgagatccc agtataccag tagttggtac gggtcttttg atatc 45

 <210> 88
 <211> 15
 60 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

5 <400> 88
Ala Arg Ser Gln Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Ser Phe Asp Ile
1 5 10 15

10 <210> 89
<211> 321
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

15 <220>
<223> Штучна

<400> 89
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
20 atcacttgtc gggcgagtca gggtagtagc acctggtag cctgggttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tacaagggtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggccagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

25 <210> 90
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

30 <220>
<223> Штучна

<400> 90
35 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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Thr Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Pro Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
45 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

50 <210> 91
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

55 <220>
<223> Штучна

<400> 91
60 cagggtatta gcacctgg 18

<210> 92
 <211> 6
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> Штучна
 <400> 92
 10 Gln Gly Ile Ser Thr Trp
 1 5
 <210> 93
 15 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 20 <223> Штучна
 <400> 93
 gctgcatcc 9
 25 <210> 94
 <211> 3
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 30 <220>
 <223> Штучна
 <400> 94
 Ala Ala Ser
 35 1
 <210> 95
 <211> 27
 40 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 45 <400> 95
 caacaggcta acagtttccc gtggacg 27
 <210> 96
 50 <211> 9
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 55 <223> Штучна
 <400> 96
 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp Thr
 1 5
 60

<210> 97
 <211> 366
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> Штучна
 <400> 97
 10 caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cctctgggta cacctttaac agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagctccc acaatggtaa cagtcactat 180
 gtacagaagt tccagggcag agtctccatg accacagaca catccacgag tacagcctac 240
 atggaactga ggagccttag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagacactcg 300
 15 tataccacca gctggtacgg gggttttgac tattggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366
 <210> 98
 <211> 122
 20 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 25
 <400> 98
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Ser His Asn Gly Asn Ser His Tyr Val Gln Lys Phe
 50 55 60
 35 Gln Gly Arg Val Ser Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
 40 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 99
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 50
 <220>
 <223> Штучна
 <400> 99
 ggttacacct ttaacagcta tgggt 24
 55
 <210> 100
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 60
 <220>

<223> Штучна
 <400> 100
 Gly Tyr Thr Phe Asn Ser Tyr Gly
 5 1 5
 <210> 101
 <211> 24
 10 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 15 <400> 101
 atcagctccc acaatggtaa cagt 24
 <210> 102
 20 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 25 <223> Штучна
 <400> 102
 Ile Ser Ser His Asn Gly Asn Ser
 1 5
 30 <210> 103
 <211> 45
 <212> ДНК
 35 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 40 <400> 103
 gcgagacact cgtataccac cagctggtac ggggggttttg actat 45
 <210> 104
 <211> 15
 45 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 50 <400> 104
 Ala Arg His Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 55 <210> 105
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 60 <220>

<223> Штучна

<400> 105

5 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggtttttag agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctcagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggtcagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

10

<210> 106

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

15

<220>

<223> Штучна

<400> 106

20 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 Arg Ala Ser Gln Gly Phe Ser Ser Trp
20 25 30
25 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln 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 Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
30 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

35

<210> 107

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

40

<220>

<223> Штучна

<400> 107

45 cagggtttta gcagctgg 18

<210> 108

<211> 6

<212> БІЛОК

50 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

55

<400> 108

Gln Gly Phe Ser Ser Trp
1 5

60

<210> 109

<211> 9

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 5 <223> Штучна

 <400> 109
 gctgcatcc 9

 10 <210> 110
 <211> 3
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 15 <220>
 <223> Штучна

 <400> 110
 Ala Ala Ser
 20 1

 <210> 111
 <211> 27
 25 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна
 30
 <400> 111
 caacaggcta acagtttccc tctcact 27

 <210> 112
 35 <211> 9
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 40 <223> Штучна

 <400> 112
 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5
 45

 <210> 113
 <211> 366
 <212> ДНК
 50 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна

 55 <400> 113
 gaggtgcagc tgggtggagtc cggggggaggc ttggttcagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggaat caccttgagc agctatggca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gactggagtg ggtcgcaccc atttttggtg gtggtggtgg ccctactactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatg tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 60 ttgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attattgtgc gaaagatcga 300
 tacagtggga gctactacgg aggttttgac tactggggcc ggggaaccct gggtcaccgtc 360

tcctca

366

<210> 114
 <211> 122
 5 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна
 10
 <400> 114
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Leu Ser Ser Tyr
 15 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Phe Gly Ser Gly Gly Gly Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 20 Lys Gly Arg Phe Thr Met 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
 25 Ala Lys Asp Arg Tyr Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30 <210> 115
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

35 <220>
 <223> Штучна

<400> 115
 40 ggaatcacct tgagcagcta tggc

24

<210> 116
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

45 <220>
 <223> Штучна

<400> 116
 50 Gly Ile Thr Leu Ser Ser Tyr Gly
 1 5

55 <210> 117
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

60 <220>
 <223> Штучна

<400> 117
atttttggta gtggtggtgg ccca 24

5 <210> 118
<211> 8
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Штучна

15 <400> 118
Ile Phe Gly Ser Gly Gly Gly Pro
1 5

20 <210> 119
<211> 45
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

25 <220>
<223> Штучна

30 <400> 119
gcgaagatc gatacagtgg gagctactac ggaggttttg actac 45

35 <210> 120
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

40 <220>
<223> Штучна

45 <400> 120
Ala Lys Asp Arg Tyr Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10 15

50 <210> 121
<211> 321
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

55 <220>
<223> Штучна

60 <400> 121
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggattacc agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctacactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaacctgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaacattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctcctac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

60 <210> 122
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

<400> 122

5 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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Thr Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Thr Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Thr 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
 15 Glu His Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

20
 <210> 123
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

25
 <220>
 <223> Штучна

<400> 123

30 cagggtatta ccagctgg 18

<210> 124
 <211> 6
 <212> БІЛОК
 35 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

40 <400> 124
 Gln Gly Ile Thr Ser Trp
 1 5

45 <210> 125
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

50 <220>
 <223> Штучна

<400> 125

55 gctgcatcc 9

<210> 126
 <211> 3
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

60 <220>

```

<223> Штучна

<400> 126
Ala Ala Ser
5      1

<210> 127
<211> 27
10    <212> ДНК
      <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна
15

<400> 127
саасaggcta асagtttccc tcctact                27

<210> 128
20    <211> 9
      <212> БІЛОК
      <213> Штучна послідовність

<220>
25    <223> Штучна

<400> 128
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
30      1              5

<210> 129
<211> 366
<212> ДНК
35    <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

40    <400> 129
      gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctaagactc 60
      tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agttatgcct tgacctgggt ccgccaggct 120
      ccagggaagg ggctggagtg ggtctctttt attagtggta gtggtggtag gccattctac 180
      gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa catgctgtat 240
45    ctgcaaatga асagcctgag агccgaggac acggccatat attactgtgc gaagtcacctg 300
      tataccacca gctggtacgg ggggttcgac tcctggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
      tcctca                                           366

<210> 130
50    <211> 122
      <212> БІЛОК
      <213> Штучна послідовність

<220>
55    <223> Штучна

<400> 130
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
60      1              5              10              15
      Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
           20              25              30

```

	Ala	Leu	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
	Ser	Phe	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Arg	Pro	Phe	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		50			55			60									
5	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Met	Leu	Tyr	
	65				70			75							80		
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	
				85				90						95			
10	Ala	Lys	Ser	Leu	Tyr	Thr	Thr	Ser	Trp	Tyr	Gly	Gly	Phe	Asp	Ser	Trp	
				100				105						110			
	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115					120									
15	<210> 131																
	<211> 24																
	<212> ДНК																
	<213> Штучна послідовність																
20	<220>																
	<223> Штучна																
	<400> 131																
	ggattcacct ttagcagtta tgcc																24
25	<210> 132																
	<211> 8																
	<212> БІЛОК																
	<213> Штучна послідовність																
30	<220>																
	<223> Штучна																
	<400> 132																
35	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala									
	1					5											
	<210> 133																
40	<211> 24																
	<212> ДНК																
	<213> Штучна послідовність																
	<220>																
45	<223> Штучна																
	<400> 133																
	attagtggta gtggtggtag gccca																24
50	<210> 134																
	<211> 8																
	<212> БІЛОК																
	<213> Штучна послідовність																
55	<220>																
	<223> Штучна																
	<400> 134																
60	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Arg	Pro									
	1				5												

<210> 135
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> Штучна
 <400> 135
 10 gcgaagtcctt tgtataccac cagctggtag ggggggttcg actcc 45
 <210> 136
 <211> 15
 <212> БІЛОК
 15 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 20 <400> 136
 Ala Lys Ser Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ser
 1 5 10 15
 25 <210> 137
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 30 <220>
 <223> Штучна
 <400> 137
 35 gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggcgagtca ggggtgctgc agctggtag cctggtagat gcagaaacca 120
 gggaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ttgtcaacag tctaacagtt tccctttcac tctcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321
 40 <210> 138
 <211> 107
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> Штучна
 <400> 138
 50 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 Arg Ala Ser Gln Gly Val Val Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 55 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
 60 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Phe Pro Phe
 85 90 95

Thr Leu Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

5 <210> 139
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Штучна

<400> 139
caggggtgtcg tcagctgg

18

15 <210> 140
<211> 6
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

20 <220>
<223> Штучна

<400> 140
25 Gln Gly Val Val Ser Trp
1 5

30 <210> 141
<211> 9
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

35 <220>
<223> Штучна

<400> 141
gctgcatcc

9

40 <210> 142
<211> 3
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

45 <220>
<223> Штучна

<400> 142
Ala Ala Ser

50 1

55 <210> 143
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

60 <220>
<223> Штучна

<400> 143

caacagtcta acagtttccc tttc

24

<210> 144

<211> 8

5 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

10

<400> 144

Gln Gln Ser Asn Ser Phe Pro Phe

1

5

15

<210> 145

<211> 366

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

20

<220>

<223> Штучна

<400> 145

25 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggccactata tgtactggat gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaactat 180
gcacagaagt ttcaggacag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagggaga 300
30 tatggcagta gctggtacgg ggggtttgag tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366

<210> 146

<211> 122

35 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

40

<400> 146

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

60

<210> 147

<211> 24

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 5 <223> Штучна

 <400> 147
 ggatacacct tcaccggcca ctat 24

 10 <210> 148
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 15 <220>
 <223> Штучна

 <400> 148
 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly His Tyr
 20 1 5

 <210> 149
 <211> 24
 25 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна
 30
 <400> 149
 atcaacccta acagtgggtgg caca 24

 <210> 150
 35 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 40 <223> Штучна

 <400> 150
 Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
 45 1 5

 <210> 151
 <211> 45
 <212> ДНК
 50 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна

 55 <400> 151
 gcgagaggga gatatggcag tagctggtac ggggggtttg agtac 45

 <210> 152
 <211> 15
 60 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

<400> 152
 5 Ala Arg Gly Arg Tyr Gly Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Glu Tyr
 1 5 10 15

<210> 153
 10 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 15 <223> Штучна

<400> 153
 gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttgaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggattacc agctggtag cctggatca gcagaaacca 120
 20 gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcagccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacggat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagacttta caacttacta ttgtcaacag gcttacagtc tccctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 154
 <211> 107
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 30 <223> Штучна

<400> 154
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 35 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Thr Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 40 Tyr Ala Ala Ala 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 Thr Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Ser Leu Pro Leu
 45 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 155
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 55 <223> Штучна

<400> 155
 cagggtatta ccagctgg 18

60 <210> 156

<211> 6
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> Штучна
 <400> 156
 Gln Gly Ile Thr Ser Trp
 10 1 5
 <210> 157
 <211> 9
 15 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 20 <400> 157
 gctgcagcc 9
 <210> 158
 <211> 3
 25 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 30 <400> 158
 Ala Ala Ala
 1
 35 <210> 159
 <211> 27
 <212> ДНК
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 45 <400> 159
 caacaggctt acagtctccc tctcast 27
 <210> 160
 <211> 9
 50 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 55 <400> 160
 Gln Gln Ala Tyr Ser Leu Pro Leu Thr
 1 5
 60 <210> 161

<211> 366
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <223> Штучна

<400> 161
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 10 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggct tgcactgggt ccgccagtct 120
 ccaggcaagg ggctggaatg ggtggcactt atatcatatg acggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag acctgaggac acggctggat atttctgtgc gaaatcccta 300
 tatacaacca gctggtacgg gggctttgac tattggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 15 tcctca 366

<210> 162
 <211> 122
 <212> БІЛОК
 20 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

25 <400> 162
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 30 Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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
 35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Gly Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 40 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 163
 45 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 50 <223> Штучна

<400> 163
 ggattcacct tcagtagcta tggc 24

55 <210> 164
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

60 <220>
 <223> Штучна

<400> 164
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5
 5
 <210> 165
 <211> 24
 <212> ДНК
 10 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 15 <400> 165
 atatcatatg acggaagtaa taaa 24
 <210> 166
 <211> 8
 20 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 25 <400> 166
 Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5
 30 <210> 167
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 35 <220>
 <223> Штучна
 <400> 167
 40 gcgaaatccc tatatacaac cagctggtac gggggctttg actat 45
 <210> 168
 <211> 15
 <212> БІЛОК
 45 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 50 <400> 168
 Ala Lys Ser Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 55 <210> 169
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 60 <220>
 <223> Штучна

<400> 169
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgctc gggcgagtc ggggtattaga agctggtag cctggatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcgtccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
5 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctccac tttcggcct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 170
10 <211> 107
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
15 <223> Штучна

<400> 170
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
20 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45
25 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 Ala Asn Ser Phe Pro Pro
85 90 95
30 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 171
35 <211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
40 <223> Штучна

<400> 171
cagggtatta gaagctgg 18

45 <210> 172
<211> 6
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

50 <220>
<223> Штучна

<400> 172
Gln Gly Ile Arg Ser Trp
55 1 5

<210> 173
60 <211> 9
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

<220>
<223> Штучна

5  <400> 173
    gctgcgtcc 9

    <210> 174
    <211> 3
10  <212> БІЛОК
    <213> Штучна послідовність

    <220>
    <223> Штучна
15  <400> 174
    Ala Ala Ser
        1

20  <210> 175
    <211> 27
    <212> ДНК
    <213> Штучна послідовність
25  <220>
    <223> Штучна

    <400> 175
30  caacaggcta acagtttccc tcccaact 27

    <210> 176
    <211> 9
    <212> БІЛОК
35  <213> Штучна послідовність

    <220>
    <223> Штучна

40  <400> 176
    Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
        1             5

45  <210> 177
    <211> 366
    <212> ДНК
    <213> Штучна послідовність

50  <220>
    <223> Штучна

    <400> 177
55  gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
    tcctgtgcag cctctggggt cacccttcagc aactatgcc a tgacctgggt ccgccaggct 120
    ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaact atcagtggtc gtggtgataa cacatactac 180
    gcagactccg tgcagggccg gttcaccatc tccagaggcc attccaagaa cacgctgtat 240
    ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaacctacg 300
    tatagcagaa gctggtacgg tgcttttgat ttctggggcc aagggaacaat ggtcaccgctc 360
60  tcttca 366

```

<210> 178
 <211> 122
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> Штучна
 <400> 178
 10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 15 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly His Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Pro Thr Tyr Ser Arg Ser Trp Tyr Gly Ala Phe Asp Phe Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 25 115 120
 <210> 179
 <211> 24
 30 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 35
 <400> 179
 gggttcacct tcagcaacta tgcc 24
 <210> 180
 40 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 45 <223> Штучна
 <400> 180
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
 1 5
 50
 <210> 181
 <211> 24
 <212> ДНК
 55 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 60
 <400> 181
 atcagtggca gtggtgataa caca 24

<210> 182
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> Штучна
 <400> 182
 10 Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr
 1 5
 <210> 183
 15 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 20 <223> Штучна
 <400> 183
 gcgaaccta cgtatagcag aagctggtac ggtgcttttg atttc 45
 25 <210> 184
 <211> 15
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 30 <220>
 <223> Штучна
 <400> 184
 35 Ala Lys Pro Thr Tyr Ser Arg Ser Trp Tyr Gly Ala Phe Asp Phe
 1 5 10 15
 <210> 185
 40 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 45 <223> Штучна
 <400> 185
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggattagc agctggtag cctggatatca gcagaaaccg 120
 gggaaagccc ctcaactcct gatctatgct gcatccagat tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 50 aggttctggg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacaatt tcccattcac ttctgggcct 300
 gggaccsaag tggatatcaa a 321
 <210> 186
 55 <211> 107
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 60 <223> Штучна

<400> 186
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 5 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Trp Gly
 50 55 60
 10 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 Ala Asn Asn Phe Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 15 100 105

<210> 187
 <211> 18
 20 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна
 25

<400> 187
 cagggtatta gcagctgg 18

<210> 188
 30 <211> 6
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 35 <223> Штучна

<400> 188
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

40

<210> 189
 <211> 9
 <212> ДНК
 45 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

50 <400> 189
 gctgcatcc 9

<210> 190
 <211> 3
 55 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна
 60

<400> 190

Ala Ala Ser
1

5 <210> 191
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Штучна

<400> 191
саасaggcta асаатттccc attcact 27

15 <210> 192
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

20 <220>
<223> Штучна

<400> 192

25 Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 193
30 <211> 366
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
35 <223> Штучна

<400> 193
caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agttatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
40 cctggacaag gccttgagtg gatgggatgg atccgcgctt acaatgggta cacaaactat 180
gcacagaagt ttcagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgaa caccgcctac 240
atggagctga ggaccctgaa ttctgacgat acggccggtt attactgtgc gagagatcga 300
tatagtggga gcttcacgg taactttgac tactggggcc agggaaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366

45 <210> 194
<211> 122
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

50 <220>
<223> Штучна

<400> 194

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

	50		55		60	
	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr					
	65		70		75	80
5	Met Glu Leu Arg Thr Leu Asn Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
		85		90		95
	Ala Arg Asp Arg Tyr Ser Gly Ser Phe His Gly Asn Phe Asp Tyr Trp					
		100		105		110
	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
		115		120		
10						
	<210> 195					
	<211> 24					
	<212> ДНК					
15	<213> Штучна послідовність					
	<220>					
	<223> Штучна					
20	<400> 195					
	ggttacacct ttaccagtta tggt					24
	<210> 196					
	<211> 8					
25	<212> БІЛОК					
	<213> Штучна послідовність					
	<220>					
	<223> Штучна					
30	<400> 196					
	Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly					
	1 5					
35	<210> 197					
	<211> 24					
	<212> ДНК					
	<213> Штучна послідовність					
40	<220>					
	<223> Штучна					
	<400> 197					
45	atccgcgctt acaatggta caca					24
	<210> 198					
	<211> 8					
	<212> БІЛОК					
50	<213> Штучна послідовність					
	<220>					
	<223> Штучна					
55	<400> 198					
	Ile Arg Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr					
	1 5					
60	<210> 199					
	<211> 45					

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
5 <223> Штучна

<400> 199
gcgagagatc gatatagtgg gagcttccac ggtaactttg actac 45

10 <210> 200
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

15 <220>
<223> Штучна

<400> 200
Ala Arg Asp Arg Tyr Ser Gly Ser Phe His Gly Asn Phe Asp Tyr
20 1 5 10 15

<210> 201
<211> 321
25 <212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

30 <400> 201
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcgt ctgtaggaga cagagtgacc 60
atcacttgctc gggcgagtca gggatatttc agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggtcct aatctatgct gcatccaatt tggaaagtgg ggtcccatca 180
35 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt taccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 202
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
45 <223> Штучна

<400> 202
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
50 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Phe Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
55 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 Ala Asn Ser Leu Pro Leu
85 90 95
60 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

	<210> 203	
	<211> 18	
	<212> ДНК	
5	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Штучна	
10	<400> 203 cagggtattt tcagctgg	18
	<210> 204	
	<211> 6	
	<212> БІЛОК	
15	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Штучна	
20	<400> 204 Gln Gly Ile Phe Ser Trp 1 5	
25	<210> 205	
	<211> 9	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
30	<220>	
	<223> Штучна	
35	<400> 205 gctgcatcc	9
	<210> 206	
	<211> 3	
	<212> БІЛОК	
40	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Штучна	
45	<400> 206 Ala Ala Ser 1	
50	<210> 207	
	<211> 27	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
55	<223> Штучна	
	<400> 207 caacaggcta acagtttacc gctcact	27
60	<210> 208	
	<211> 9	

<212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 5 <223> Штучна

<400> 208
 Gln Gln Ala Asn Ser Leu Pro Leu Thr
 1 5

10

<210> 209
 <211> 366
 <212> ДНК
 15 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

20 <400> 209
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtccagc ctgggggggct cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctattcta tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg gactggaata tgtttcaact attaataata atggggatac cacatattat 180
 gcagactctg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
 25 cttcaactgg gcagcctgag acctgaggac atggctgtgt attactgtgc gagacagacg 300
 tataccagca gctggtacgg ggggttcgac tcctggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 210
 30 <211> 122
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 35 <223> Штучна

<400> 210
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Asn Asn Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 45 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 Leu Gly Ser Leu Arg Pro Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 50 Ala Arg Gln Thr Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

55

<210> 211
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

60 <220>

<223> Штучна

 <400> 211
 ggattcacct tcagtaccta ttct 24
 5
 <210> 212
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 10
 <220>
 <223> Штучна

 <400> 212
 15 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ser
 1 5

 <210> 213
 20 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 25 <223> Штучна

 <400> 213
 attaataata atggggatac caca 24
 30 <210> 214
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 35 <220>
 <223> Штучна

 <400> 214
 40 Ile Asn Asn Asn Gly Asp Thr Thr
 1 5

 <210> 215
 <211> 45
 45 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна
 50
 <400> 215
 gsgagacaga cgtataccag cagctggtag ggggggttcg actcc 45

 <210> 216
 55 <211> 15
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 60 <223> Штучна

<400> 216
Ala Arg Gln Thr Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ser
1 5 10 15

5
<210> 217
<211> 321
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

10
<220>
<223> Штучна

<400> 217
15 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggcga cagagtcacc 60
atcacttgctc gggcgagtca ggggtattacc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccaatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcaccag cctgcagcct 240
gaggattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtc tcccattcac ttctggccct 300
20 gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 218
<211> 107
<212> БІЛОК
25 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

30 <400> 218
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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Thr Ser Trp
20 25 30
35 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Asn 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 Thr Ser Leu Gln Pro
40 65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Leu Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

45
<210> 219
<211> 18
<212> ДНК
50 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

55 <400> 219
cagggtatta ccagctgg 18

<210> 220
<211> 6
60 <212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна
 5 <400> 220
 Gln Gly Ile Thr Ser Trp
 1 5
 10 <210> 221
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 15 <220>
 <223> Штучна
 <400> 221
 gctgcatcc 9
 20 <210> 222
 <211> 3
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Штучна
 <400> 222
 30 Ala Ala Ser
 1
 <210> 223
 35 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 40 <223> Штучна
 <400> 223
 caacaggcta acagtctccc attcact 27
 45 <210> 224
 <211> 9
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 50 <220>
 <223> Штучна
 <400> 224
 Gln Gln Ala Asn Ser Leu Pro Phe Thr
 55 1 5
 <210> 225
 <211> 366
 60 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

5 <400> 225
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacccttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtggcag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa ctcgctgtat 240
 10 ctgcaattga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaagacgctg 300
 tatactacca gctggtacgg gggcttcag cactggggcc agggcaccct ggtcactgtc 360
 tcctca 366

<210> 226
 15 <211> 122
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 20 <223> Штучна

<400> 226
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu 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
 30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Ala Lys Thr Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

40 <210> 227
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

45 <220>
 <223> Штучна

<400> 227
 50 ggattcaccc ttagcagcta tgcc 24

<210> 228
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 55 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

60 <400> 228
 Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr Ala

```

1                               5

5  <210> 229
   <211> 24
   <212> ДНК
   <213> Штучна послідовність

   <220>
10  <223> Штучна

   <400> 229
   attagtggta gtggtggcag caca 24

15  <210> 230
   <211> 8
   <212> БІЛОК
   <213> Штучна послідовність

20  <220>
   <223> Штучна

   <400> 230
   Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
25  1                               5

   <210> 231
   <211> 45
30  <212> ДНК
   <213> Штучна послідовність

   <220>
   <223> Штучна
35

   <400> 231
   gcgaagacgc tgtatactac cagctggtac gggggcttcc agcac 45

   <210> 232
   <211> 15
   <212> БІЛОК
   <213> Штучна послідовність

   <220>
45  <223> Штучна

   <400> 232
   Ala Lys Thr Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His
   1                               5                               10                               15
50

   <210> 233
   <211> 321
   <212> ДНК
55  <213> Штучна послідовність

   <220>
   <223> Штучна

60  <400> 233
   gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctataggaga cagagtcacc 60

```

atcacttgtc gggcgagtca gggaatcagc agttgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagtcc ctaagctcct gatctatgct gcgtcctctt tgcaaagtgg gttcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtag cctgcagccc 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag actcacagtt tcccgtggac ggtcggccaa 300
 5 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 234
 <211> 107
 <212> БІЛОК
 10 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

15 <400> 234
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 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 Ser Leu Gln Ser Gly Phe 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
 25 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr His Ser Phe Pro Trp
 85 90 95
 Thr Val Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

30

<210> 235
 <211> 18
 <212> ДНК
 35 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

40 <400> 235
 cagggaatca gcagttgg 18

<210> 236
 <211> 6
 45 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

50 <400> 236
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

55 <210> 237
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

60 <220>

<223> Штучна
 <400> 237
 gctgctcc 9
 5
 <210> 238
 <211> 3
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 10
 <220>
 <223> Штучна
 <400> 238
 15 Ala Ala Ser
 1
 <210> 239
 20 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 25 <223> Штучна
 <400> 239
 caacagactc acagtttccc gtgg 24
 30 <210> 240
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 35 <220>
 <223> Штучна
 <400> 240
 Gln Gln Thr His Ser Phe Pro Trp
 40 1 5
 <210> 241
 <211> 366
 45 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 50
 <400> 241
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacccttagg agctatttca tgacctgggt ccgccagggt 120
 ccagggaagg ggctggaggg ggtctcagct attagtggca ttagtggtgg cacatactac 180
 55 acagactccg ttaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gagaacggtg 300
 tatagtagta gttactacgg gggcttcag cactggggcc agggcaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366
 60 <210> 242
 <211> 122

<212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 5 <223> Штучна

 <400> 242
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Phe Met Thr Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ile Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 20 Ala Arg Thr Val Tyr Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln His Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 25
 <210> 243
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 30
 <220>
 <223> Штучна

 <400> 243
 35 ggattcaccc ttaggagcta tttc 24

 <210> 244
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 40 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна

 45 <400> 244
 Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr Phe
 1 5

 50 <210> 245
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 55 <220>
 <223> Штучна

 <400> 245
 attagtggca ttagtggtgg caca 24
 60
 <210> 246

<211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> Штучна
 <400> 246
 Ile Ser Gly Ile Ser Gly Gly Thr
 10 1 5
 <210> 247
 <211> 45
 15 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 20 <400> 247
 gcgagaacgg tgtatagtag tagttactac gggggcttcc agcac 45
 <210> 248
 25 <211> 15
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 30 <223> Штучна
 <400> 248
 Ala Arg Thr Val Tyr Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln His
 1 5 10 15
 35 <210> 249
 <211> 321
 <212> ДНК
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 45 <400> 249
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgtat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggattagc agttggtag cctggtagtca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgtt gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 50 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag actaacagtt tccctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321
 <210> 250
 <211> 107
 55 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 60 <400> 250

	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Val	Gly	
	1				5				10					15			
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp	
				20					25					30			
5	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
			35				40						45				
	Tyr	Val	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	
10	65				70						75				80		
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Asn	Ser	Phe	Pro	Leu	
				85					90					95			
	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
			100						105								
15																	
	<210> 251																
	<211> 18																
	<212> ДНК																
20	<213> Штучна послідовність																
	<220>																
	<223> Штучна																
25	<400> 251																
	caggggtatta gcagttgg																18
	<210> 252																
	<211> 6																
30	<212> БІЛОК																
	<213> Штучна послідовність																
	<220>																
	<223> Штучна																
35	<400> 252																
	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp											
	1				5												
40	<210> 253																
	<211> 9																
	<212> ДНК																
	<213> Штучна послідовність																
45	<220>																
	<223> Штучна																
	<400> 253																
50	gttgcattcc																9
	<210> 254																
	<211> 3																
	<212> БІЛОК																
55	<213> Штучна послідовність																
	<220>																
	<223> Штучна																
60	<400> 254																
	Val	Ala	Ser														

1

5 <210> 255
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

10 <220>
 <223> Штучна

<400> 255
 саасаgacta асagttttccc tctcact 27

15 <210> 256
 <211> 9
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

20 <220>
 <223> Штучна

<400> 256
 Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu Thr

25 1 5

30 <210> 257
 <211> 366
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

35 <400> 257
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacccttagg agttatgtca tgtactgggt cgcсcagggt 120
 ccagggaagg ggctggaggg ggtctcaggт attagtggca gtagtggtgg cacatactac 180
 40 acagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gagatcggтg 300
 tatagtacca cctggtacgg gggcttcag cactggggcc agggcaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

45 <210> 258
 <211> 122
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

50 <220>
 <223> Штучна

<400> 258
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 55 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met Tyr Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val
 35 40 45
 60 Ser Gly Ile Ser Gly Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe	
	65 70 75 80	
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
	85 90 95	
5	Ala Arg Ser Val Tyr Ser Thr Thr Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His Trp	
	100 105 110	
	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	
10	<210> 259	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
15	<220>	
	<223> Штучна	
	<400> 259	
20	ggattcaccc ttaggagtta tgtc	24
	<210> 260	
	<211> 8	
	<212> БІЛОК	
25	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Штучна	
30	<400> 260	
	Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr Val	
	1 5	
35	<210> 261	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
40	<220>	
	<223> Штучна	
	<400> 261	
45	attagtggca gtagtggtgg caca	24
	<210> 262	
	<211> 8	
	<212> БІЛОК	
	<213> Штучна послідовність	
50	<220>	
	<223> Штучна	
	<400> 262	
55	Ile Ser Gly Ser Ser Gly Gly Thr	
	1 5	
	<210> 263	
60	<211> 45	
	<212> ДНК	

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

5

<400> 263

gcgagatcgg tgtatagtag cacctggtac gggggcctcc agcac 45

<210> 264

10 <211> 15

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

15 <223> Штучна

<400> 264

Ala Arg Ser Val Tyr Ser Thr Thr Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His

1 5 10 15

20

<210> 265

<211> 321

<212> ДНК

25 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

30 <400> 265

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgtat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgctc gggcgagtca gggtattagc agttgggttag cctgggtatca gctgaaacca 120

gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt taaaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggtac tgggacagat ttactcttca ccatcagcgg cctgcagcct 240

35 gaagattttg cagtttacta ttgtcaacag actaacagtt tccctctcac ttctggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 266

<211> 107

40 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

45

<400> 266

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Val Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser Ser Trp

20 25 30

50 Leu Ala Trp Tyr Gln Leu 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

55 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

60

<210> 267
 <211> 18
 <212> ДНК
 5 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна

 10 <400> 267
 caggttatta gcagttgg 18

 <210> 268
 <211> 6
 15 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна
 20
 <400> 268
 Gln Val Ile Ser Ser Trp
 1 5

 25
 <210> 269
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 30
 <220>
 <223> Штучна

 <400> 269
 35 gctgcatcc 9

 <210> 270
 <211> 3
 <212> БІЛОК
 40 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Штучна

 45 <400> 270
 Ala Ala Ser
 1

 50 <210> 271
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 55 <220>
 <223> Штучна

 <400> 271
 60 caacagacta acagtttccc tctcact 27
 <210> 272

<211> 9
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <223> Штучна

<400> 272
 Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu Thr
 10 1 5

<210> 273
 <211> 366
 15 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

20 <400> 273
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaaac ttggaacagc ctgggggggtc ccttagactc 60
 tcctgtacag cctctggatt caccttttagc agatctgcc aagaactgggt ccgccgggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagga attagtggta gtgggtggtcg aacatactac 180
 25 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa tacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgag cgccgaggac acggccgcat attactgtgc gaaagattcg 300
 tatactacca gttggtacgg aggtatggac gtctggggcc acgggaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

30 <210> 274
 <211> 122
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

35 <220>
 <223> Штучна

<400> 274
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Glu Gln Pro Gly Gly
 40 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Ser
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 45 Ser Gly Ile Ser Gly Ser 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 Ser Ala Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 50 Ala Lys Asp Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly His Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

55 <210> 275
 <211> 24
 <212> ДНК
 60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

5 <400> 275
 ggattcacct ttagcagatc tgcc 24

<210> 276
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 10 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

15 <400> 276
 Gly Phe Thr Phe Ser Arg Ser Ala
 1 5

20 <210> 277
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

25 <220>
 <223> Штучна

30 <400> 277
 attagtggta gtggtggtcg aaca 24

<210> 278
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

35 <220>
 <223> Штучна

40 <400> 278
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr
 1 5

45 <210> 279
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

50 <220>
 <223> Штучна

<400> 279
 gcgaagatt cgtatactac cagttggtac ggaggtatgg acgtc 45

55 <210> 280
 <211> 15
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

60 <220>
 <223> Штучна

<400> 280
Ala Lys Asp Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Met Asp Val
1 5 10 15
5

<210> 281
<211> 321
<212> ДНК
10 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

15 <400> 281
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggatatttc agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
ggaaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcttccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
agattcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
20 gaggattttg caatttacta ttgtcaacag gctaacagtg tcccgatcac cttcggccaa 300
gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 282
<211> 107
25 <212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

30 <400> 282
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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Phe Ser Trp
35 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 Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
40 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Val Pro Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
45 100 105

<210> 283
<211> 18
50 <212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

55 <400> 283
cagggtatatt tcagctgg 18

<210> 284
60 <211> 6
<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 5
 <400> 284
 Gln Gly Ile Phe Ser Trp
 1 5
 10
 <210> 285
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 15
 <220>
 <223> Штучна
 <400> 285
 20 gctgcttcc 9
 <210> 286
 <211> 3
 <212> БІЛОК
 25 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Штучна
 30 <400> 286
 Ala Ala Ser
 1
 35 <210> 287
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 40 <220>
 <223> Штучна
 <400> 287
 45 caacaggcta acagtgtccc gatcacc 27
 <210> 288
 <211> 9
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 50 <220>
 <223> Штучна
 <400> 288
 55 Gln Gln Ala Asn Ser Val Pro Ile Thr
 1 5
 60 <210> 289
 <211> 366
 <212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

5 <400> 289

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgttcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgaactgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtcaccgct attagtggca gtggtggtgg cacatactac 180

10 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa ctgctgttt 240

ctgcaattga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaacaaacg 300

tataccagca gctggtacgg tggctttgat atctggggcc aggggacaat ggtcaccgtc 360

tcttca 366

15 <210> 290

<211> 122

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

20 <220>

<223> Штучна

<400> 290

25 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

30 Thr Ala Ile Ser Gly Ser 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 Ser Leu Phe

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35 85 90 95

Ala Lys Gln Thr Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ile Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

40

<210> 291

<211> 24

<212> ДНК

45 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

50 <400> 291

ggattcacct ttagcagcta tgcc 24

<210> 292

<211> 8

55 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

60 <400> 292

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

5 <210> 293
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Штучна

<400> 293
attagtggca gtggtggtgg caca 24

15 <210> 294
<211> 8
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

20 <220>
<223> Штучна

<400> 294

25 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr
1 5

30 <210> 295
<211> 45
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

35 <220>
<223> Штучна

<400> 295
gcgaacaaaa cgtataccag cagctggtac ggtggctttg atatc 45

40 <210> 296
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

45 <220>
<223> Штучна

<400> 296
Ala Lys Gln Thr Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ile
50 1 5 10 15

55 <210> 297
<211> 321
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

60 <220>
<223> Штучна

<400> 297

gacatccaga tgacccagtc gccatcttcc gtgtccgcgt ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgctc gggcgagtca gggtttttag tcctgggtag cctgggtatca gcagatacca 120
 gggaaagccc ccaagctcct gatctatgct gcatcaaggc tgcaaagtgg ggtcccatcc 180
 aggttccgcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 5 gaggattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgcctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 298

<211> 107

10 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

15

<400> 298

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

20 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Phe Ser Ser Trp
 20 25 30

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

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

25 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 Ala Asn Ser Phe Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 299

<211> 18

35 <212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

40

<400> 299

cagggtttta gttcctgg

18

<210> 300

45 <211> 6

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

50 <223> Штучна

<400> 300

Gln Gly Phe Ser Ser Trp
 1 5

55

<210> 301

<211> 9

<212> ДНК

60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

5 <400> 301
 gctgcatca 9

<210> 302
 <211> 3
 <212> БІЛОК
 10 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

15 <400> 302
 Ala Ala Ser
 1

20 <210> 303
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

25 <220>
 <223> Штучна

30 <400> 303
 caacaggcta acagtttccc gctcact 27

<210> 304
 <211> 9
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

35 <220>
 <223> Штучна

40 <400> 304
 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5

45 <210> 305
 <211> 167
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

50 <220>
 <223> Штучна

<400> 305
 Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Ser Leu Ala Ser Leu Ser
 1 5 10 15

55 Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr
 20 25 30

Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Lys Lys Lys Asp Lys Val
 35 40 45

60 Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Ser Glu Ser Gly Asp
 50 55 60

Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp


```

65              70              75              80
Phe Trp Leu Gln Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys
              85              90              95
Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Arg
5              100              105              110
Ser Phe Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe
              115              120              125
Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Tyr Ser
              130              135              140
10 Glu Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Ile Leu
              145              150              155              160
Glu His His His His His His
              165

```

```

15
<210> 306
<211> 167
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

```

```

20
<220>
<223> Штучна

```

```

<400> 306
25 Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Ser Leu Ala Ser Leu Ser
   1              5              10              15
Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr
              20              25              30
Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Lys Lys Lys Asp Lys Val
30              35              40              45
Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Ser Glu Ser Gly Asp
   50              55              60
Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp
65              70              75              80
35 Phe Trp Leu Gln Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys
              85              90              95
Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Arg
              100              105              110
Ser Phe Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe
40              115              120              125
Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Tyr Ser
              130              135              140
Glu Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Ile Leu
145              150              155              160
45 Glu His His His His His His
              165

```

```

<210> 307
50 <211> 354
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
55 <223> Штучна

```

```

<400> 307
caggtcacct tgaaggagtc tggctcctgtg ctggtgaaac ccacagagag cctcacgctg 60
acctgctccg tctctggatt ctactcagt aatgttagaa tgggtgtgag ctggatccgt 120
cagtccccag ggaaggccct ggagtggctt gcacacattt tttcgaatga cgaaaaatcc 180
tacaccacat ctctgaagac caggctcacc atctccaagg acacctccag aagccaggtg 240

```

gtccttacca tgaccgacat ggaccctggg gacacagcca catattactg tgcacggata 300
cggaatttgg cctttaatta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

5 <210> 308
<211> 118
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Штучна

<400> 308
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15
15 Ser Leu Thr Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Val
20 25 30
Arg Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45
20 Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys Ser Tyr Thr Thr Ser
50 55 60
Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Ser Gln Val
65 70 75 80
Val Leu Thr Met Thr Asp Met Asp Pro Gly Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
25 Cys Ala Arg Ile Arg Asn Leu Ala Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

30 <210> 309
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

35 <220>
<223> Штучна

40 <400> 309
ggattctcac tcagtaatgt tagaatgggt 30

<210> 310
<211> 10
<212> БІЛОК
45 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

50 <400> 310
Gly Phe Ser Leu Ser Asn Val Arg Met Gly
1 5 10

55 <210> 311
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

60 <220>
<223> Штучна

<400> 311
atttttttcga atgacgaaaa a 21

5 <210> 312
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Штучна

<400> 312
Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys
15 1 5

<210> 313
<211> 30
20 <212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна
25

<400> 313
gcacggatac ggaatttggc ctttaattac 30

<210> 314
<211> 10
30 <212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
35 <223> Штучна

<400> 314
Ala Arg Ile Arg Asn Leu Ala Phe Asn Tyr
1 5 10
40

<210> 315
<211> 339
<212> ДНК
45 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

50 <400> 315
gacttcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtgtgtta cacagggtcca gcaataagaa ctacttagct 120
tggtatcagc agaagccagg acagcctcct aacctgtctca tttactgggc atctaccg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
55 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatggtact 300
ctatttactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 316
<211> 113
60 <212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

5 <400> 316
 Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu His Arg
 20 25 30
 10 Ser Ser Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 15 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Gly Thr Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110
 20 Lys

<210> 317
 25 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 30 <223> Штучна

<400> 317
 cagagtgtgt tacacaggtc cagcaataag aactac 36

35 <210> 318
 <211> 12
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

40 <220>
 <223> Штучна

<400> 318
 Gln Ser Val Leu His Arg Ser Ser Asn Lys Asn Tyr
 45 1 5 10

<210> 319
 <211> 9
 50 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Штучна

55 <400> 319
 tgggcatct 9

<210> 320
 60 <211> 3
 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

5 <400> 320
Trp Ala Ser
1

10 <210> 321
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

15 <220>
<223> Штучна

20 <400> 321
cagcaatatt atgtactct atttact 27

<210> 322
<211> 9
<212> БІЛОК

25 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна

30 <400> 322
Gln Gln Tyr Tyr Gly Thr Leu Phe Thr
1 5

35 <210> 323
<211> 537
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

40 <220>
<223> hST2-hFc

<400> 323

45 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

50 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

55 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

60 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	
5	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			
10	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	
15	Ser	Phe	Ser	Asn	Gly	Leu	Ala	Cys	Leu	Asp	Met	Val	Leu	Arg	Ile	Ala
				260					265					270		
	Asp	Val	Lys	Glu	Glu	Asp	Leu	Leu	Leu	Gln	Tyr	Asp	Cys	Leu	Ala	Leu
			275					280				285				
20	Asn	Leu	His	Gly	Leu	Arg	Arg	His	Thr	Val	Arg	Leu	Ser	Arg	Lys	Asn
		290					295					300				
	Pro	Ile	Asp	His	His	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
	305					310					315					320
	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
					325					330					335	
25	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
				340					345					350		
	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
			355				360						365			
30	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
		370					375					380				
	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
	385					390					395					400
	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
					405					410					415	
35	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
				420					425					430		
	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu
			435					440					445			
40	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
		450					455					460				
	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
	465					470				475						480
	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
					485				490					495		
45	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
				500					505					510		
	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
			515					520					525			
50	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
		530					535									

<210> 324

<211> 543

55 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> hST2-mFc

60

<400> 324

	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			
5	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					
10	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			
15	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					
20	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	Lys	Asp	Glu	Gln	Gly	Phe	Ser	Leu	
				180					185					190			
25	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					
30	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			
35	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	Asn	
	290						295					300					
40	Pro	Ile	Asp	His	His	Ser	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	
	305					310					315					320	
	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
					325					330					335		
	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	
				340					345					350			
45	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	
			355					360					365				
	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	
							375					380					
50	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	
	385					390					395					400	
	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	
					405					410					415		
	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	
				420					425					430			
55	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	
			435					440					445				
	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	
			450				455					460					
60	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	
	465					470					475					480	
	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	

```

      485      490      495
Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn
      500      505      510
Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
5  His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
    530      535      540

10 <210> 325
    <211> 884
    <212> БІЛОК
    <213> Штучна послідовність

15 <220>
    <223> hST2-hIL1RAcP-mFc

    <400> 325
20 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
25 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
30 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
35 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
40 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
45 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
50 Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg Ile Ala
    260      265      270
    Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu Ala Leu
    275      280      285
55 Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg Lys Asn
    290      295      300
    Pro Ile Asp His His Ser Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp
    305      310      315      320
    Thr Met Arg Gln Ile Gln Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys
    325      330      335
60 Cys Pro Leu Phe Glu His Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His

```


				340				345				350				
	Ser	Ala	Gly	Leu	Thr	Leu	Ile	Trp	Tyr	Trp	Thr	Arg	Gln	Asp	Arg	Asp
			355					360					365			
5	Leu	Glu	Glu	Pro	Ile	Asn	Phe	Arg	Leu	Pro	Glu	Asn	Arg	Ile	Ser	Lys
			370				375					380				
	Glu	Lys	Asp	Val	Leu	Trp	Phe	Arg	Pro	Thr	Leu	Leu	Asn	Asp	Thr	Gly
	385					390					395				400	
	Asn	Tyr	Thr	Cys	Met	Leu	Arg	Asn	Thr	Thr	Tyr	Cys	Ser	Lys	Val	Ala
				405						410					415	
10	Phe	Pro	Leu	Glu	Val	Val	Gln	Lys	Asp	Ser	Cys	Phe	Asn	Ser	Pro	Met
				420					425					430		
	Lys	Leu	Pro	Val	His	Lys	Leu	Tyr	Ile	Glu	Tyr	Gly	Ile	Gln	Arg	Ile
			435					440					445			
15	Thr	Cys	Pro	Asn	Val	Asp	Gly	Tyr	Phe	Pro	Ser	Ser	Val	Lys	Pro	Thr
		450					455					460				
	Ile	Thr	Trp	Tyr	Met	Gly	Cys	Tyr	Lys	Ile	Gln	Asn	Phe	Asn	Asn	Val
	465					470					475				480	
	Ile	Pro	Glu	Gly	Met	Asn	Leu	Ser	Phe	Leu	Ile	Ala	Leu	Ile	Ser	Asn
					485					490					495	
20	Asn	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Thr	Tyr	Pro	Glu	Asn	Gly	Arg	Thr
				500					505					510		
	Phe	His	Leu	Thr	Arg	Thr	Leu	Thr	Val	Lys	Val	Val	Gly	Ser	Pro	Lys
			515					520					525			
25	Asn	Ala	Val	Pro	Pro	Val	Ile	His	Ser	Pro	Asn	Asp	His	Val	Val	Tyr
		530					535					540				
	Glu	Lys	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Leu	Leu	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Phe
	545					550					555				560	
	Ser	Phe	Leu	Met	Asp	Ser	Arg	Asn	Glu	Val	Trp	Trp	Thr	Ile	Asp	Gly
					565					570					575	
30	Lys	Lys	Pro	Asp	Asp	Ile	Thr	Ile	Asp	Val	Thr	Ile	Asn	Glu	Ser	Ile
				580					585					590		
	Ser	His	Ser	Arg	Thr	Glu	Asp	Glu	Thr	Arg	Thr	Gln	Ile	Leu	Ser	Ile
			595					600					605			
35	Lys	Lys	Val	Thr	Ser	Glu	Asp	Leu	Lys	Arg	Ser	Tyr	Val	Cys	His	Ala
		610					615					620				
	Arg	Ser	Ala	Lys	Gly	Glu	Val	Ala	Lys	Ala	Ala	Lys	Val	Lys	Gln	Lys
	625					630				635					640	
	Val	Pro	Ala	Pro	Arg	Tyr	Thr	Val	Glu	Ser	Gly	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro
					645					650					655	
40	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu
				660					665					670		
	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu
			675					680					685			
45	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
		690					695					700				
	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu
	705					710					715				720	
	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr
					725					730					735	
50	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser
				740					745					750		
	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro
			755					760					765			
55	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln
		770					775					780				
	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val
	785					790					795				800	
	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val
					805					810					815	
60	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu
				820					825					830		

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg
835 840 845
Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val
850 855 860
5 Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg
865 870 875 880
Thr Pro Gly Lys

10
<210> 326
<211> 880
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

15
<220>
<223> mST2-mIL1RAcP-mFc

<400> 326

20 Ser Lys Ser Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg Cys
1 5 10 15
Pro Gln Arg Gly Arg Ser Thr Tyr Pro Val Glu Trp Tyr Tyr Ser Asp
20 25 30
Thr Asn Glu Ser Ile Pro Thr Gln Lys Arg Asn Arg Ile Phe Val Ser
25 35 40 45
Arg Asp Arg Leu Lys Phe Leu Pro Ala Arg Val Glu Asp Ser Gly Ile
50 55 60
Tyr Ala Cys Val Ile Arg Ser Pro Asn Leu Asn Lys Thr Gly Tyr Leu
65 70 75 80
30 Asn Val Thr Ile His Lys Lys Pro Pro Ser Cys Asn Ile Pro Asp Tyr
85 90 95
Leu Met Tyr Ser Thr Val Arg Gly Ser Asp Lys Asn Phe Lys Ile Thr
100 105 110
35 Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Val Gln Trp Phe
115 120 125
Lys Asn Cys Lys Ala Leu Gln Glu Pro Arg Phe Arg Ala His Arg Ser
130 135 140
Tyr Leu Phe Ile Asp Asn Val Thr His Asp Asp Glu Gly Asp Tyr Thr
145 150 155 160
40 Cys Gln Phe Thr His Ala Glu Asn Gly Thr Asn Tyr Ile Val Thr Ala
165 170 175
Thr Arg Ser Phe Thr Val Glu Glu Lys Gly Phe Ser Met Phe Pro Val
180 185 190
45 Ile Thr Asn Pro Pro Tyr Asn His Thr Met Glu Val Glu Ile Gly Lys
195 200 205
Pro Ala Ser Ile Ala Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly Ser His Phe
210 215 220
Leu Ala Asp Val Leu Trp Gln Ile Asn Lys Thr Val Val Gly Asn Phe
225 230 235 240
50 Gly Glu Ala Arg Ile Gln Glu Glu Glu Gly Arg Asn Glu Ser Ser Ser
245 250 255
Asn Asp Met Asp Cys Leu Thr Ser Val Leu Arg Ile Thr Gly Val Thr
260 265 270
Glu Lys Asp Leu Ser Leu Glu Tyr Asp Cys Leu Ala Leu Asn Leu His
275 280 285
55 Gly Met Ile Arg His Thr Ile Arg Leu Arg Arg Lys Gln Pro Ile Asp
290 295 300
His Arg Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met Arg Gln
305 310 315 320
60 Ile Gln Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro Leu Phe
325 330 335

	Glu	His	Phe	Leu	Lys	Tyr	Asn	Tyr	Ser	Thr	Ala	His	Ser	Ser	Gly	Leu
				340					345					350		
	Thr	Leu	Ile	Trp	Tyr	Trp	Thr	Arg	Gln	Asp	Arg	Asp	Leu	Glu	Glu	Pro
			355					360					365			
5	Ile	Asn	Phe	Arg	Leu	Pro	Glu	Asn	Arg	Ile	Ser	Lys	Glu	Lys	Asp	Val
		370					375					380				
	Leu	Trp	Phe	Arg	Pro	Thr	Leu	Leu	Asn	Asp	Thr	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys
	385					390					395					400
10	Met	Leu	Arg	Asn	Thr	Tyr	Cys	Ser	Lys	Val	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	
				405					410					415		
	Val	Val	Gln	Lys	Asp	Ser	Cys	Phe	Asn	Ser	Ala	Met	Arg	Phe	Pro	Val
				420					425					430		
	His	Lys	Met	Tyr	Ile	Glu	His	Gly	Ile	His	Lys	Ile	Thr	Cys	Pro	Asn
			435					440					445			
15	Val	Asp	Gly	Tyr	Phe	Pro	Ser	Ser	Val	Lys	Pro	Ser	Val	Thr	Trp	Tyr
		450					455					460				
	Lys	Gly	Cys	Thr	Glu	Ile	Val	Asp	Phe	His	Asn	Val	Leu	Pro	Glu	Gly
	465					470					475					480
20	Met	Asn	Leu	Ser	Phe	Phe	Ile	Pro	Leu	Val	Ser	Asn	Asn	Gly	Asn	Tyr
				485						490				495		
	Thr	Cys	Val	Val	Thr	Tyr	Pro	Glu	Asn	Gly	Arg	Leu	Phe	His	Leu	Thr
				500					505					510		
	Arg	Thr	Val	Thr	Val	Lys	Val	Val	Gly	Ser	Pro	Lys	Asp	Ala	Leu	Pro
			515					520					525			
25	Pro	Gln	Ile	Tyr	Ser	Pro	Asn	Asp	Arg	Val	Val	Tyr	Glu	Lys	Glu	Pro
		530					535					540				
	Gly	Glu	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Lys	Val	Tyr	Phe	Ser	Phe	Ile	Met
	545					550					555					560
30	Asp	Ser	His	Asn	Glu	Val	Trp	Trp	Thr	Ile	Asp	Gly	Lys	Lys	Pro	Asp
				565						570					575	
	Asp	Val	Thr	Val	Asp	Ile	Thr	Ile	Asn	Glu	Ser	Val	Ser	Tyr	Ser	Ser
				580					585					590		
	Thr	Glu	Asp	Glu	Thr	Arg	Thr	Gln	Ile	Leu	Ser	Ile	Lys	Lys	Val	Thr
			595					600					605			
35	Pro	Glu	Asp	Leu	Arg	Arg	Asn	Tyr	Val	Cys	His	Ala	Arg	Asn	Thr	Lys
		610					615					620				
	Gly	Glu	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Lys	Val	Lys	Gln	Lys	Val	Ile	Pro	Pro
	625					630					635					640
40	Arg	Tyr	Thr	Val	Glu	Ser	Gly	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro
				645						650					655	
	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
				660					665					670		
	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu
			675					680					685			
45	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro
		690					695					700				
	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala
	705					710					715					720
50	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val
				725						730					735	
	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe
				740					745					750		
	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr
			755					760					765			
55	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu
		770					775					780				
	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys
	785					790					795					800
60	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn
				805						810					815	
	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp

				820					825					830			
	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	
			835					840					845				
5	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	
		850					855					860					
	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys	
	865					870					875					880	
10	<210> 327																
	<211> 876																
	<212> БІЛОК																
	<213> Штучна послідовність																
15	<220>																
	<223> hST2-hL1RAcP-hFc																
	<400> 327																
20	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					
25	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	
30				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				
35	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	
40				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				
45	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	
50				245					250					255			
	Ser	Phe	Ser	Asn	Gly	Leu	Ala	Cys	Leu	Asp	Met	Val	Leu	Arg	Ile	Ala	
				260				265						270			
	Asp	Val	Lys	Glu	Glu	Asp	Leu	Leu	Leu	Gln	Tyr	Asp	Cys	Leu	Ala	Leu	
		275				280						285					
55	Asn	Leu	His	Gly	Leu	Arg	Arg	His	Thr	Val	Arg	Leu	Ser	Arg	Lys	Asn	
		290				295						300					
	Pro	Ile	Asp	His	His	Ser	Ser	Glu	Arg	Cys	Asp	Asp	Trp	Gly	Leu	Asp	
	305				310					315						320	
	Thr	Met	Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Phe	Glu	Asp	Glu	Pro	Ala	Arg	Ile	Lys	
60				325						330					335		
	Cys	Pro	Leu	Phe	Glu	His	Phe	Leu	Lys	Phe	Asn	Tyr	Ser	Thr	Ala	His	

				340				345				350				
	Ser	Ala	Gly	Leu	Thr	Leu	Ile	Trp	Tyr	Trp	Thr	Arg	Gln	Asp	Arg	Asp
			355					360					365			
5	Leu	Glu	Glu	Pro	Ile	Asn	Phe	Arg	Leu	Pro	Glu	Asn	Arg	Ile	Ser	Lys
			370				375					380				
	Glu	Lys	Asp	Val	Leu	Trp	Phe	Arg	Pro	Thr	Leu	Leu	Asn	Asp	Thr	Gly
	385					390					395				400	
	Asn	Tyr	Thr	Cys	Met	Leu	Arg	Asn	Thr	Thr	Tyr	Cys	Ser	Lys	Val	Ala
				405						410					415	
10	Phe	Pro	Leu	Glu	Val	Val	Gln	Lys	Asp	Ser	Cys	Phe	Asn	Ser	Pro	Met
				420					425					430		
	Lys	Leu	Pro	Val	His	Lys	Leu	Tyr	Ile	Glu	Tyr	Gly	Ile	Gln	Arg	Ile
			435					440					445			
15	Thr	Cys	Pro	Asn	Val	Asp	Gly	Tyr	Phe	Pro	Ser	Ser	Val	Lys	Pro	Thr
		450					455					460				
	Ile	Thr	Trp	Tyr	Met	Gly	Cys	Tyr	Lys	Ile	Gln	Asn	Phe	Asn	Asn	Val
	465					470					475				480	
	Ile	Pro	Glu	Gly	Met	Asn	Leu	Ser	Phe	Leu	Ile	Ala	Leu	Ile	Ser	Asn
				485						490					495	
20	Asn	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Thr	Tyr	Pro	Glu	Asn	Gly	Arg	Thr
				500					505					510		
	Phe	His	Leu	Thr	Arg	Thr	Leu	Thr	Val	Lys	Val	Val	Gly	Ser	Pro	Lys
			515					520					525			
25	Asn	Ala	Val	Pro	Pro	Val	Ile	His	Ser	Pro	Asn	Asp	His	Val	Val	Tyr
		530					535					540				
	Glu	Lys	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Leu	Leu	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Phe
	545					550					555				560	
	Ser	Phe	Leu	Met	Asp	Ser	Arg	Asn	Glu	Val	Trp	Trp	Thr	Ile	Asp	Gly
				565						570					575	
30	Lys	Lys	Pro	Asp	Asp	Ile	Thr	Ile	Asp	Val	Thr	Ile	Asn	Glu	Ser	Ile
				580					585					590		
	Ser	His	Ser	Arg	Thr	Glu	Asp	Glu	Thr	Arg	Thr	Gln	Ile	Leu	Ser	Ile
			595					600					605			
35	Lys	Lys	Val	Thr	Ser	Glu	Asp	Leu	Lys	Arg	Ser	Tyr	Val	Cys	His	Ala
		610					615					620				
	Arg	Ser	Ala	Lys	Gly	Glu	Val	Ala	Lys	Ala	Ala	Lys	Val	Lys	Gln	Lys
	625					630				635					640	
	Val	Pro	Ala	Pro	Arg	Tyr	Thr	Val	Glu	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
				645						650					655	
40	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
				660					665					670		
	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
			675					680					685			
45	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
		690				695						700				
	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
	705					710					715				720	
	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
				725						730					735	
50	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
				740					745					750		
	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
			755					760					765			
55	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
		770					775					780				
	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
	785					790					795				800	
	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
				805						810				815		
60	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
				820					825					830		

	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
			835					840					845			
	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
		850					855					860				
5	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
	865					870					875					
	<210> 328															
10	<211> 310															
	<212> БІЛОК															
	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
15	<223> позаклітинний домен ST2 людини															
	<400> 328															
	Lys	Phe	Ser	Lys	Gln	Ser	Trp	Gly	Leu	Glu	Asn	Glu	Ala	Leu	Ile	Val
	1				5					10					15	
20	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			
25	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	
30	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			
35	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		
40	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			
45	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	
50	Ser	Phe	Ser	Asn	Gly	Leu	Ala	Cys	Leu	Asp	Met	Val	Leu	Arg	Ile	Ala
				260					265					270		
	Asp	Val	Lys	Glu	Glu	Asp	Leu	Leu	Leu	Gln	Tyr	Asp	Cys	Leu	Ala	Leu
			275					280					285			
55	Asn	Leu	His	Gly	Leu	Arg	Arg	His	Thr	Val	Arg	Leu	Ser	Arg	Lys	Asn
		290					295					300				
	Pro	Ile	Asp	His	His	Ser										
	305					310										
	<210> 329															
60	<211> 306															

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

5 <223> позаклітинний домен ST2 миші

<400> 329

	Ser	Lys	Ser	Ser	Trp	Gly	Leu	Glu	Asn	Glu	Ala	Leu	Ile	Val	Arg	Cys
	1				5					10					15	
10	Pro	Gln	Arg	Gly	Arg	Ser	Thr	Tyr	Pro	Val	Glu	Trp	Tyr	Tyr	Ser	Asp
				20					25					30		
	Thr	Asn	Glu	Ser	Ile	Pro	Thr	Gln	Lys	Arg	Asn	Arg	Ile	Phe	Val	Ser
				35				40					45			
	Arg	Asp	Arg	Leu	Lys	Phe	Leu	Pro	Ala	Arg	Val	Glu	Asp	Ser	Gly	Ile
15		50					55				60					
	Tyr	Ala	Cys	Val	Ile	Arg	Ser	Pro	Asn	Leu	Asn	Lys	Thr	Gly	Tyr	Leu
	65					70				75					80	
	Asn	Val	Thr	Ile	His	Lys	Lys	Pro	Pro	Ser	Cys	Asn	Ile	Pro	Asp	Tyr
					85					90					95	
20	Leu	Met	Tyr	Ser	Thr	Val	Arg	Gly	Ser	Asp	Lys	Asn	Phe	Lys	Ile	Thr
				100					105					110		
	Cys	Pro	Thr	Ile	Asp	Leu	Tyr	Asn	Trp	Thr	Ala	Pro	Val	Gln	Trp	Phe
			115					120					125			
	Lys	Asn	Cys	Lys	Ala	Leu	Gln	Glu	Pro	Arg	Phe	Arg	Ala	His	Arg	Ser
25		130					135					140				
	Tyr	Leu	Phe	Ile	Asp	Asn	Val	Thr	His	Asp	Asp	Glu	Gly	Asp	Tyr	Thr
	145					150				155					160	
	Cys	Gln	Phe	Thr	His	Ala	Glu	Asn	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ile	Val	Thr	Ala
					165					170					175	
30	Thr	Arg	Ser	Phe	Thr	Val	Glu	Glu	Lys	Gly	Phe	Ser	Met	Phe	Pro	Val
				180					185					190		
	Ile	Thr	Asn	Pro	Pro	Tyr	Asn	His	Thr	Met	Glu	Val	Glu	Ile	Gly	Lys
			195					200					205			
	Pro	Ala	Ser	Ile	Ala	Cys	Ser	Ala	Cys	Phe	Gly	Lys	Gly	Ser	His	Phe
35		210					215					220				
	Leu	Ala	Asp	Val	Leu	Trp	Gln	Ile	Asn	Lys	Thr	Val	Val	Gly	Asn	Phe
	225					230				235					240	
	Gly	Glu	Ala	Arg	Ile	Gln	Glu	Glu	Glu	Gly	Arg	Asn	Glu	Ser	Ser	Ser
					245					250				255		
40	Asn	Asp	Met	Asp	Cys	Leu	Thr	Ser	Val	Leu	Arg	Ile	Thr	Gly	Val	Thr
				260					265					270		
	Glu	Lys	Asp	Leu	Ser	Leu	Glu	Tyr	Asp	Cys	Leu	Ala	Leu	Asn	Leu	His
			275					280					285			
	Gly	Met	Ile	Arg	His	Thr	Ile	Arg	Leu	Arg	Arg	Lys	Gln	Pro	Ile	Asp
45		290					295					300				
	His	Arg														
	305															

50 <210> 330

<211> 339

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

55 <223> позаклітинний домен ST2 ІЛ 1РАСР людини

<400> 330

	Ser	Glu	Arg	Cys	Asp	Asp	Trp	Gly	Leu	Asp	Thr	Met	Arg	Gln	Ile	Gln
	1			5						10					15	
60	Val	Phe	Glu	Asp	Glu	Pro	Ala	Arg	Ile	Lys	Cys	Pro	Leu	Phe	Glu	His

20 25 30
 Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala Gly Leu Thr Leu
 35 40 45
 5 Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu Glu Pro Ile Asn
 50 55 60
 Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys Asp Val Leu Trp
 65 70 75 80
 Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Met Leu
 85 90 95
 10 Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro Leu Glu Val Val
 100 105 110
 Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu Pro Val His Lys
 115 120 125
 15 Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys Pro Asn Val Asp
 130 135 140
 Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr Trp Tyr Met Gly
 145 150 155 160
 Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro Glu Gly Met Asn
 165 170 175
 20 Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Cys
 180 185 190
 Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr Phe His Leu Thr Arg Thr
 195 200 205
 25 Leu Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asn Ala Val Pro Pro Val
 210 215 220
 Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr Glu Lys Glu Pro Gly Glu
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe Ser Phe Leu Met Asp Ser
 245 250 255
 30 Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys Pro Asp Asp Ile
 260 265 270
 Thr Ile Asp Val Thr Ile Asn Glu Ser Ile Ser His Ser Arg Thr Glu
 275 280 285
 35 Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys Val Thr Ser Glu
 290 295 300
 Asp Leu Lys Arg Ser Tyr Val Cys His Ala Arg Ser Ala Lys Gly Glu
 305 310 315 320
 Val Ala Lys Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys Val Pro Ala Pro Arg Tyr
 325 330 335
 40 Thr Val Glu

 <210> 331
 45 <211> 339
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 50 <223> позаклітинний домен ІЛ 1РАСР миші

 <400> 331
 Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met Arg Gln Ile Gln
 1 5 10 15
 55 Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro Leu Phe Glu His
 20 25 30
 Phe Leu Lys Tyr Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ser Gly Leu Thr Leu
 35 40 45
 60 Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu Glu Pro Ile Asn
 50 55 60
 Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys Asp Val Leu Trp

65 70 75 80
 Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Met Leu
 85 90 95
 Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro Leu Glu Val Val
 100 105 110
 5 Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Ala Met Arg Phe Pro Val His Lys
 115 120 125
 Met Tyr Ile Glu His Gly Ile His Lys Ile Thr Cys Pro Asn Val Asp
 130 135 140
 10 Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Ser Val Thr Trp Tyr Lys Gly
 145 150 155 160
 Cys Thr Glu Ile Val Asp Phe His Asn Val Leu Pro Glu Gly Met Asn
 165 170 175
 Leu Ser Phe Phe Ile Pro Leu Val Ser Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Cys
 180 185 190
 15 Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Leu Phe His Leu Thr Arg Thr
 195 200 205
 Val Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asp Ala Leu Pro Pro Gln
 210 215 220
 20 Ile Tyr Ser Pro Asn Asp Arg Val Val Tyr Glu Lys Glu Pro Gly Glu
 225 230 235 240
 Glu Leu Val Ile Pro Cys Lys Val Tyr Phe Ser Phe Ile Met Asp Ser
 245 250 255
 His Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys Pro Asp Asp Val
 260 265 270
 25 Thr Val Asp Ile Thr Ile Asn Glu Ser Val Ser Tyr Ser Ser Thr Glu
 275 280 285
 Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys Val Thr Pro Glu
 290 295 300
 30 Asp Leu Arg Arg Asn Tyr Val Cys His Ala Arg Asn Thr Lys Gly Glu
 305 310 315 320
 Ala Glu Gln Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys Val Ile Pro Pro Arg Tyr
 325 330 335
 Thr Val Glu
 35

<210> 332

<211> 227

40 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Fc IgG1 людини

45

<400> 332

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

		115				120			125								
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
		130					135					140					
5	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
	145					150					155				160		
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
				165						170					175		
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
			180						185					190			
10	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
			195					200					205				
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
		210				215						220					
	Pro	Gly	Lys														
15	225																

<210> 333
 <211> 233
 20 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Fc IgG2a миші

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

<210> 334
 60 <211> 167
 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> M.fascicularis ІЛ-33-6His

5

<400> 334

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

30

<210> 335

<211> 117

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

35

<220>

<223> сурогатне ІЛ-4R Ат HCVR-миші

<400> 335

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

55

<210> 336

<211> 111

<212> БІЛОК

60

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> сурогатне ІЛ-4R Ат LCVR-миші

<400> 336

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

20

<210> 337

<211> 124

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

25

<220>

<223> Дупілумаб HCVR

<400> 337

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

<210> 338

<211> 112

50

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Дупілумаб LCVR

55

<400> 338

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

35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 5 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 Val Gly Phe Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 10
 <210> 339
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 15 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Дупілумаб HCDR1
 20 <400> 339
 Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr Ala
 1 5
 25 <210> 340
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 30 <220>
 <223> Дупілумаб HCDR2
 <400> 340
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Asn Thr
 35 1 5
 <210> 341
 <211> 18
 40 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Дупілумаб HCDR3
 45 <400> 341
 Ala Lys Asp Arg Leu Ser Ile Thr Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Gly Leu
 1 5 10 15
 Asp Val
 50
 <210> 342
 <211> 11
 55 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Дупілумаб LCDR1
 60 <400> 342

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

5 <210> 343
<211> 3
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Дупілумаб LCDR2

<400> 343
Leu Gly Ser

15 1

<210> 344
<211> 9
20 <212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Дупілумаб LCDR3

25 <400> 344
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Tyr Thr
1 5

30 <210> 345
<211> 451
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

35 <220>
<223> Важкий ланцюг дупілумаба

<400> 345

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

	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
				180					185					190		
	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys
			195				200						205			
5	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu
		210					215					220				
	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu
	225					230					235					240
10	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
					245					250					255	
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
				260					265					270		
	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
			275					280					285			
15	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr
		290					295					300				
	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
	305					310					315					320
20	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser
					325					330					335	
	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
				340					345					350		
	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
			355					360					365			
25	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
		370					375					380				
	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
	385					390					395					400
30	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr
				405						410					415	
	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
				420					425					430		
	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
			435				440						445			
35	Ser	Leu	Gly													
		450														
	<210> 346															
40	<211> 219															
	<212> БІЛОК															
	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
45	<223> Легкий ланцюг дупилумабу															
	<400> 346															
	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
	1				5					10					15	
50	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser
				20					25					30		
	Ile	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Ser	Gly	Gln	Ser
			35					40					45			
55	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	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	Val	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ala
					85					90					95	
60	Leu	Gln	Thr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
				100					105					110		

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 5 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 10 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 15
 <210> 347
 <211> 207
 <212> БІЛОК
 20 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> ІЛ-4Ральфа людини
 25 <400> 347
 Met Lys Val Leu Gln Glu Pro Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile
 1 5 10 15
 Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu
 20 25 30
 30 Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr
 35 40 45
 Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu
 50 55 60
 Met Asp Asp Val Val Ser Ala Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala
 65 70 75 80
 35 Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val
 85 90 95
 Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp
 100 105 110
 40 Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu
 115 120 125
 Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro
 130 135 140
 Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg
 145 150 155 160
 45 Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val
 165 170 175
 Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro
 180 185 190
 50 Ser Thr Lys Trp His Asn Ser Tyr Arg Glu Pro Phe Glu Gln His
 195 200 205
 <210> 348
 55 <211> 270
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 60 <223> hIL33_O95760 (перед протеолітичною обробкою)

<400> 348

	Met	Lys	Pro	Lys	Met	Lys	Tyr	Ser	Thr	Asn	Lys	Ile	Ser	Thr	Ala	Lys
	1				5					10					15	
5	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				
10	Thr	Lys	Arg	Pro	Ser	Leu	Lys	Thr	Gly	Arg	Lys	His	Lys	Arg	His	Leu
						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
15				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				
20	Ile	Tyr	Val	Glu	Asp	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Lys	Asp	Lys	Val	Leu
						150					155					160
	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gln	His	Pro	Ser	Asn	Glu	Ser	Gly	Asp	Gly
					165					170					175	
25	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				
30	Ser	Asn	Cys	Val	Ser	Phe	Glu	Cys	Lys	Thr	Asp	Pro	Gly	Val	Phe	Ile
						230					235					240
	Gly	Val	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Val	Asp	Ser	Ser	Glu
					245					250					255	
35	Asn	Leu	Cys	Thr	Glu	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys	Leu	Ser	Glu	Thr		
				260					265					270		

<210> 349
 <211> 159
 40 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 45 <223> hIL33_mature_PEPTIDE (після протеолітичної обробки)

<400> 349

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

```

115      120      125
Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser
130      135      140
Glu Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr
5  145      150      155

<210> 350
<211> 12
10 <212> БІЛОК
    <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Амінокислотні залишки 1-12 SEQ ID NO: 349; також відповідає залишкам
15 112-123 SEQ ID NO: 348
    (Uniprot O95760)

<400> 350
Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu
20  1      5      10

<210> 351
<211> 87
25 <212> БІЛОК
    <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Амінокислотні залишки 50-94 SEQ ID NO: 349; також відповідає залишкам
30 161-205 SEQ ID NO: 348
    (Uniprot O95760)

<400> 351
Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile
35  1      5      10      15
Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu
      20      25      30
Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser
      35      40      45
40 Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp Gly Val Asp Gly Lys Met Leu
      50      55      60
Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe Trp Leu His Ala Asn Asn
65      70      75      80
Lys Glu His Ser Val Glu Leu
45      85

<210> 352
<211> 556
50 <212> БІЛОК
    <213> Штучна послідовність

<220>
<223> ST2 людини (Див. номер доступу GenBank NP_057316)
55 <400> 352
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
60      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								
5		Val	Phe	Ala	Ser	Gly	Gln	Leu	Leu	Lys	Phe	Leu	Pro	Ala	Ala	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							
10	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									
15	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							
20	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									
25	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							
30	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									
35	Ala	Leu	Asn	Leu	His	Gly	Leu	Arg	Arg	His	Thr	Val	Arg	Leu	Ser	Arg					
	305				310						315				320						
	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							
40	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									
45	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								
50	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									
55	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							
60	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

5

<210> 353
<211> 570
<212> БІЛОК
10 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> ІЛ-1РАСР людини (Див. номер доступу GenBank Q9NPH3)

15 <400> 353
Met Thr Leu Leu Trp Cys Val Val Ser Leu Tyr Phe Tyr Gly Ile Leu
1 5 10 15
Gln Ser Asp Ala Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met
20 20 25 30
Arg Gln Ile Gln Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro
35 40 45
Leu Phe Glu His Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala
50 55 60
Gly Leu Thr Leu Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu
25 65 70 75 80
Glu Pro Ile Asn Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys
85 90 95
Asp Val Leu Trp Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr
100 105 110
30 Thr Cys Met Leu Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro
115 120 125
Leu Glu Val Val Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu
130 135 140
Pro Val His Lys Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys
35 145 150 155 160
Pro Asn Val Asp Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr
165 170 175
Trp Tyr Met Gly Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro
180 185 190
40 Glu Gly Met Asn Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly
195 200 205
Asn Tyr Thr Cys Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr Phe His
210 215 220
Leu Thr Arg Thr Leu Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asn Ala
45 225 230 235 240
Val Pro Pro Val Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr Glu Lys
245 250 255
Glu Pro Gly Glu Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe Ser Phe
260 265 270
50 Leu Met Asp Ser Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys
275 280 285
Pro Asp Asp Ile Thr Ile Asp Val Thr Ile Asn Glu Ser Ile Ser His
290 295 300
Ser Arg Thr Glu Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys
55 305 310 315 320
Val Thr Ser Glu Asp Leu Lys Arg Ser Tyr Val Cys His Ala Arg Ser
325 330 335
Ala Lys Gly Glu Val Ala Lys Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys Val Pro
340 345 350
60 Ala Pro Arg Tyr Thr Val Glu Leu Ala Cys Gly Phe Gly Ala Thr Val
355 360 365

	Leu	Leu	Val	Val	Ile	Leu	Ile	Val	Val	Tyr	His	Val	Tyr	Trp	Leu	Glu
	370					375					380					
	Met	Val	Leu	Phe	Tyr	Arg	Ala	His	Phe	Gly	Thr	Asp	Glu	Thr	Ile	Leu
	385					390				395						400
5	Asp	Gly	Lys	Glu	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Val	Ser	Tyr	Ala	Arg	Asn	Ala	Glu
					405					410					415	
	Glu	Glu	Glu	Phe	Val	Leu	Leu	Thr	Leu	Arg	Gly	Val	Leu	Glu	Asn	Glu
				420						425				430		
10	Phe	Gly	Tyr	Lys	Leu	Cys	Ile	Phe	Asp	Arg	Asp	Ser	Leu	Pro	Gly	Gly
			435					440					445			
	Ile	Val	Thr	Asp	Glu	Thr	Leu	Ser	Phe	Ile	Gln	Lys	Ser	Arg	Arg	Leu
	450						455					460				
	Leu	Val	Val	Leu	Ser	Pro	Asn	Tyr	Val	Leu	Gln	Gly	Thr	Gln	Ala	Leu
	465					470					475					480
15	Leu	Glu	Leu	Lys	Ala	Gly	Leu	Glu	Asn	Met	Ala	Ser	Arg	Gly	Asn	Ile
					485					490					495	
	Asn	Val	Ile	Leu	Val	Gln	Tyr	Lys	Ala	Val	Lys	Glu	Thr	Lys	Val	Lys
				500					505					510		
20	Glu	Leu	Lys	Arg	Ala	Lys	Thr	Val	Leu	Thr	Val	Ile	Lys	Trp	Lys	Gly
			515					520					525			
	Glu	Lys	Ser	Lys	Tyr	Pro	Gln	Gly	Arg	Phe	Trp	Lys	Gln	Leu	Gln	Val
		530					535					540				
	Ala	Met	Pro	Val	Lys	Lys	Ser	Pro	Arg	Arg	Ser	Ser	Ser	Asp	Glu	Gln
	545					550					555					560
25	Gly	Leu	Ser	Tyr	Ser	Ser	Leu	Lys	Asn	Val						
					565					570						
30	<210> 354															
	<211> 449															
	<212> БІЛОК															
	<213> Штучна послідовність															
35	<220>															
	<223> HC OF H4H9675P															
	<400> 354															
40	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Asn	Leu	Glu	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Arg	Ser
				20					25					30		
	Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
45	Ser	Gly	Ile	Ser	Gly	Ser	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	Ser	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
50	Ala	Lys	Asp	Ser	Tyr	Thr	Thr	Ser	Trp	Tyr	Gly	Gly	Met	Asp	Val	Trp
				100					105					110		
	Gly	His	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
			115					120					125			
	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr
55							135					140				
	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
	145					150					155					160
	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165						170					175	
60	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
				180					185					190		

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 5 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 10 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 15 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 20 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 25 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 30 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 Lys
 35
 <210> 355
 <211> 214
 <212> БІЛОК
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> LC OF H4H9675P
 45 <400> 355
 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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Phe Ser Trp
 20 25 30
 50 Leu Ala 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
 55 Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Val Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 60 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 5 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 10 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

15 <210> 356
 <211> 166
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

20 <220>
 <223> ІЛ-33 ЛЮДИНИ З НЕХА-HIS ТЭГОМ (АМІНОКИСЛОТИ 112-270
 НОМЕР ДОСТУПУ GENBANK №. 095760)

<400> 356
 25 Met Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu
 1 5 10 15
 Ser Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser
 20 25 30
 Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys
 30 35 40 45
 Val Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly
 50 55 60
 Asp Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys
 65 70 75 80
 35 Asp Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His
 85 90 95
 Lys Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn
 100 105 110
 Met His Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val
 115 120 125
 40 Phe Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser
 130 135 140
 Ser Glu Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr
 145 150 155 160
 45 His His His His His His
 165

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

50 1. Спосіб:
 (i) лікування запального захворювання або розладу дихальних шляхів або легень суб'єкта;
 (ii) лікування легеневого фіброзного захворювання або розладу у суб'єкта; або
 (iii) запобігання або зниження тяжкості алергічної реакції в дихальних шляхах або легенях
 суб'єкта;
 55 де спосіб включає введення суб'єкту, який потребує цього, однієї або більше доз терапевтично
 ефективної кількості антагоніста ІЛ-33 в комбінації з однією або більше дозами терапевтично
 ефективної кількості антагоніста рецептора інтерлейкіну-4 (ІЛ-4R),
 де антагоніст ІЛ-33 являє собою моноклональне антитіло, яке містить варіабельну ділянку
 важкого ланцюга (HCVR), що містить три ділянки важкого ланцюга, які визначають
 60 комплементарність (HCDR), HCDR1, HCDR2 і HCDR3, які містять амінокислотні послідовності
 SEQ ID NO: 276, 278 і 280, відповідно, і варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), що містить

три ділянки легкого ланцюга, які визначають комплементарність (LCDR), LCDR1, LCDR2 і LCDR3, які містять амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 284, 286 і 288, відповідно, і де антагоніст IL-4R являє собою моноклональне антитіло, яке містить HCVR, що містить три HCDR, HCDR1, HCDR2 і HCDR3, які містять амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 339, 340 і 341, відповідно, і LCVR, що містить три LCDR, LCDR1, LCDR2 і LCDR3, які містять амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 342, 343 і 344, відповідно.

2. Спосіб:

(i) лікування запального захворювання або розладу дихальних шляхів або легень суб'єкта;

(ii) лікування легеневого фіброзного захворювання або розладу у суб'єкта; або

(iii) запобігання або зниження тяжкості алергічної реакції в дихальних шляхах або легенях суб'єкта;

де спосіб включає введення суб'єкту, який потребує цього, однієї або більше доз терапевтично ефективної кількості антагоніста IL-33 в комбінації з однією або більше дозами терапевтично ефективної кількості антагоніста рецептора інтерлейкіну-4 (IL-4R),

де антагоніст IL-33 являє собою моноклональне антитіло, яке містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), що містить три ділянки важкого ланцюга, які визначають комплементарність (HCDR), HCDR1, HCDR2 і HCDR3, які містять амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 276, 278 і 280, відповідно, і варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), що містить три ділянки легкого ланцюга, які визначають комплементарність (LCDR), LCDR1, LCDR2 і LCDR3, які містять амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 284, 286 і 288, відповідно, і

де антагоніст IL-4R являє собою моноклональне антитіло, яке містить HCVR, що містить три HCDR, HCDR1, HCDR2 і HCDR3, які містять амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 339, 340 і 341, відповідно, і LCVR, що містить три LCDR, LCDR1, LCDR2 і LCDR3, які містять амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 342, 343 і 344, відповідно.

3. Спосіб за п. 1 або 2, де запальне захворювання або розлад дихальних шляхів або легень вибрано із групи, яка складається з: астми, хронічної обструктивної хвороби легень (COPD), астми і поєданого синдрому COPD (ACOS), хронічного бронхіту, емфіземи, хронічного риносинуситу з або без поліпів носа, гіперчутливого пневмоніту й алергічного риніту.

4. Спосіб за п. 1 або 2, де легенева фіброзна захворювання або розлад вибрано із групи, яка складається з: ідіопатичного легеневого фіброзу, фіброзу, пов'язаного з гострим пошкодженням легень або гострим респіраторним дистресом, силікозу, радіаційного фіброзу, блеоміцин-індукованого легеневого фіброзу або облітерувального синдрому бронхіоліту.

5. Спосіб за п. 3, де запальне захворювання або розлад являє собою астму.

6. Спосіб за п. 5, де астма посилюється одним або більше з таких чинників: вірусне захворювання, бактеріальна інфекція, вплив алергену, вплив хімічної речовини або хімічних парів або вплив подразника навколишнього середовища або забруднення повітря.

7. Спосіб за п. 5, де астма являє собою еозинофільну астму, неоеозинофільну астму, стероїд-резистентну астму або стероїдчутливу астму.

8. Спосіб за п. 3, де запальне захворювання або розлад являє собою хронічну обструктивну хворобу легень (COPD).

9. Спосіб за п. 8, де хронічна обструктивна хвороба легень посилюється одним або більше з таких чинників: астма, вірусне захворювання, бактеріальна інфекція, вплив алергену, вплив хімічної речовини або хімічних парів або вплив подразника навколишнього середовища, або забруднення повітря.

10. Спосіб за п. 8, де хронічна обструктивна хвороба легень виникає в результаті або частково посилюється сигаретним димом.

11. Спосіб за будь-яким із пп. 1-10, де антагоніст IL-33 і антагоніст IL-4R призначені для застосування в комбінації з одним або більше додатковими терапевтичними засобами, корисними для полегшення запального захворювання або розладу.

12. Спосіб за п. 11, де один або більше додаткових терапевтичних засобів вибрані з групи, яка складається з нестероїдного протизапального засобу (NSAID), кортикостероїду, бронхіального дилатора, антигістаміну, епінефрину, протинабрякового засобу, антагоніста тимального стромального лімфопоетину (TSLP), антагоніста IL-1, антагоніста IL-8, антагоніста IL-13, іншого антагоніста IL-4, подвійного антагоніста IL-4/IL-13, IL-33/подвійного антагоніста IL-13, антагоніста IL-5, антагоніста IL-6, антагоніста IL-12/23, антагоніста IL-22, антагоніста IL-25, антагоніста IL-17, антагоніста IL-31, інгібітору TNF, інгібітору IgE, інгібітору лейкотрієну, перорального інгібітору PDE4, метилксантину, недокромілу натрію, кромоліну натрію, бета 2-агоніста тривалої дії (LABA), мускаринового антагоніста тривалої дії (LAMA), інгаляційного кортикостероїду (ICS) й іншого антагоніста IL-33.

13. Спосіб за п. 12, де інший антагоніст IL-33 вибраний із групи, яка складається з іншого антитіла до IL-33, пастки на основі іншого рецептора IL-33, антитіла ST2, розчинного рецептора ST2, антагоніста рецептора IL-33, відмінного від ST2, антагоніста IL-1RAcP й антитіла, яке взаємодіє з комплексом IL-33/ST2.

5 14. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, де антагоніст IL-33 і антагоніст IL-4R знаходяться в окремих складах для введення суб'єкту, який потребує цього.

15. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, де антагоніст IL-33 і антагоніст IL-4R приготовані разом для введення суб'єкту, який потребує цього.

10 16. Спосіб за будь-яким із пп. 1-15, де антагоніст IL-33 і антагоніст IL-4R призначені для підшкірного, внутрішньовенного, внутрішньом'язового або інтраназального введення суб'єкту.

17. Спосіб за будь-яким із пп. 1-16, де антагоніст IL-33 містить HCVR, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 274 або послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 274, і LCVR, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 282 або послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 282.

15 18. Спосіб за будь-яким із пп. 1-17, де антагоніст IL-4R містить HCVR, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 337 або послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 337, і LCVR, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 338 або послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 338.

20 19. Спосіб за будь-яким із пп. 1-18, де антагоніст IL-33 містить HCVR, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 274, і LCVR, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 282, де антагоніст IL-4R містить HCVR, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 337, і LCVR, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 338.

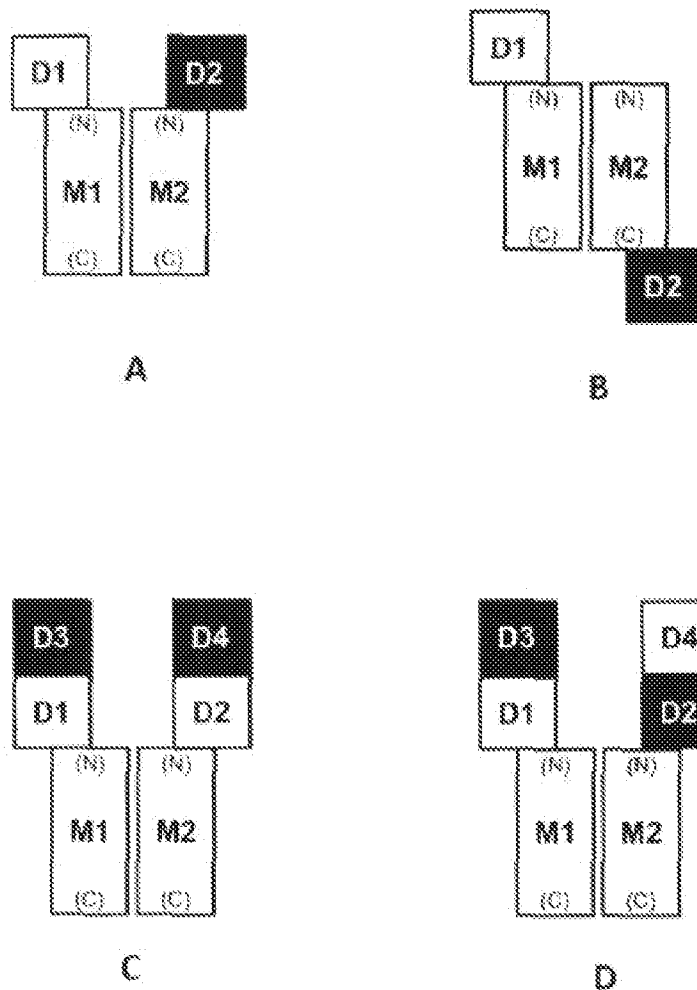
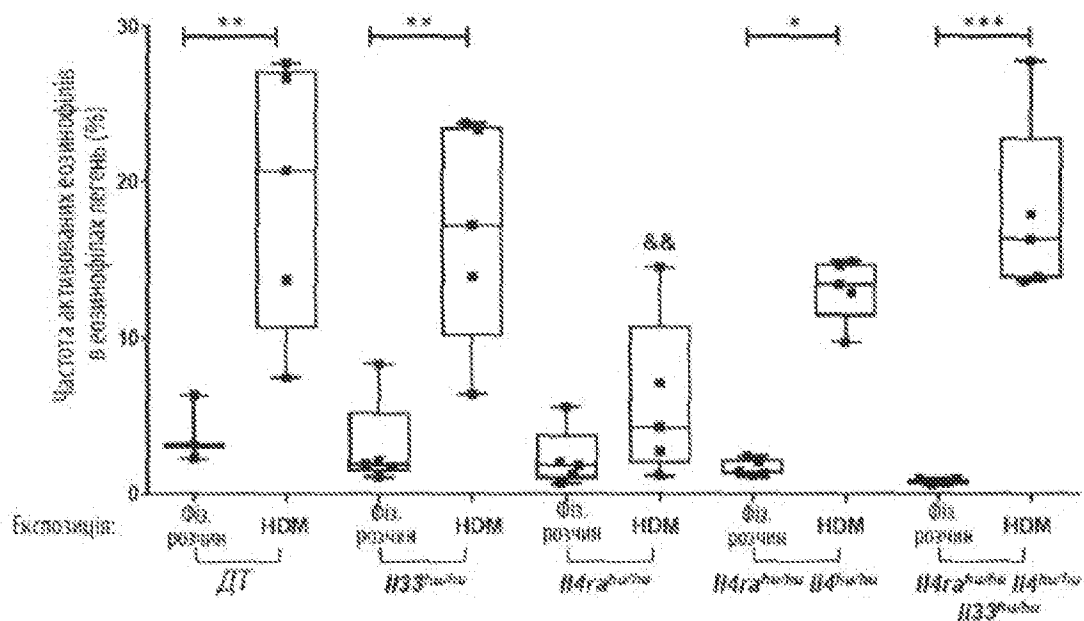
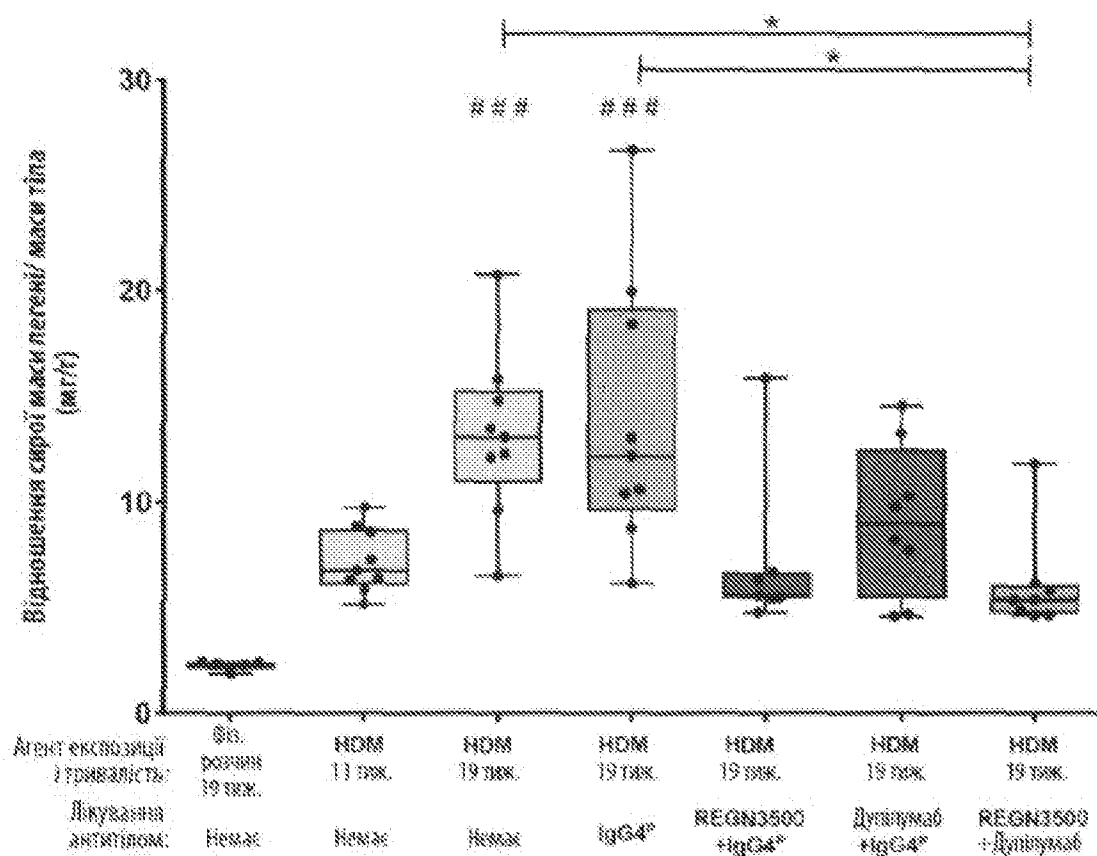


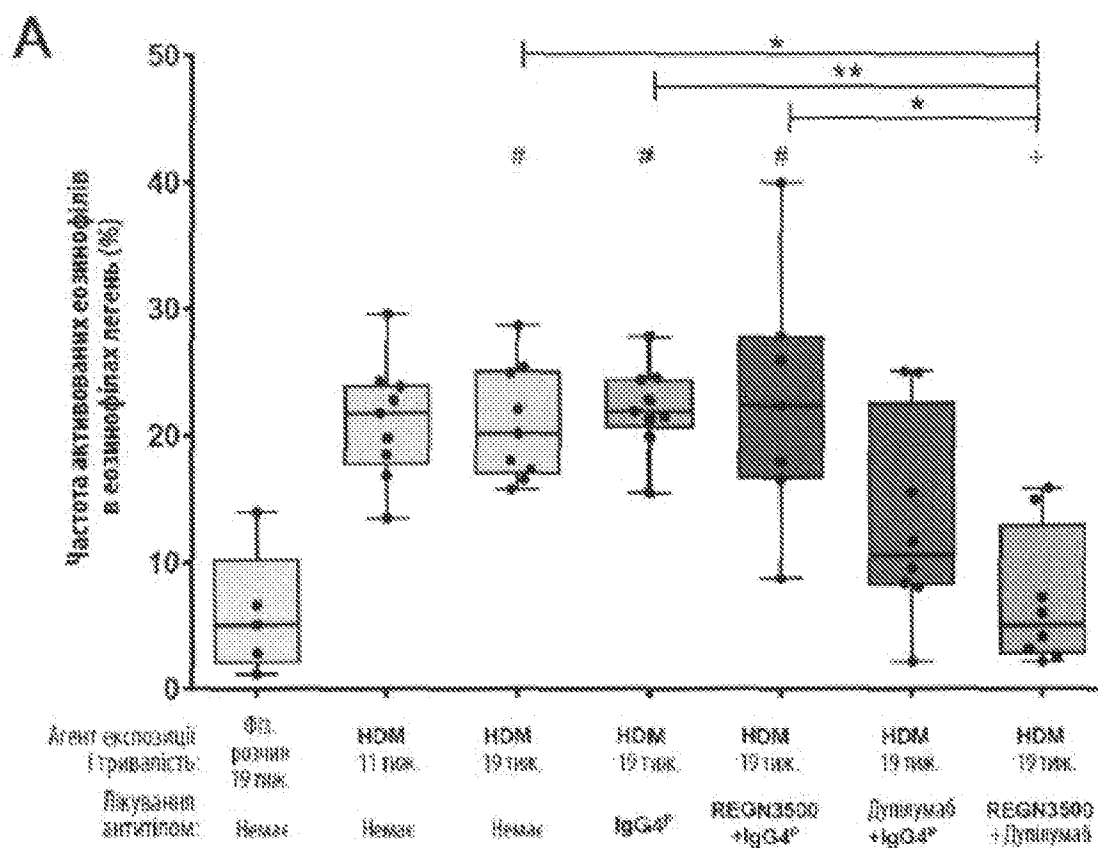
Fig. 1



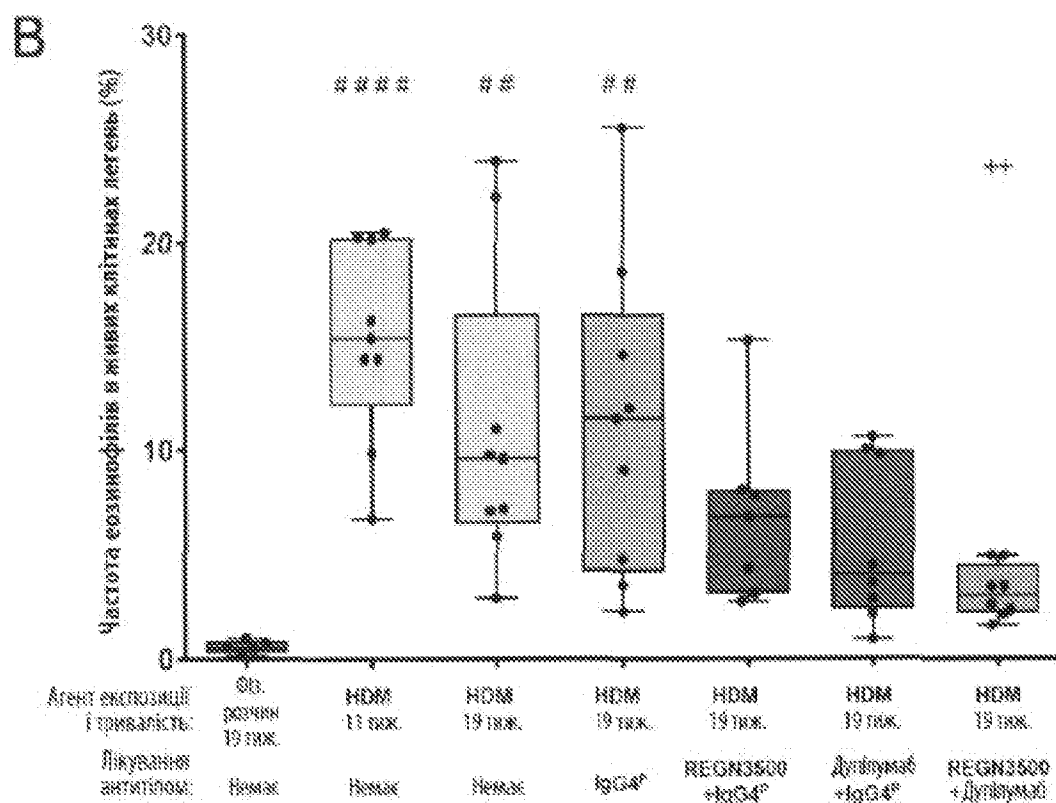
Фіг. 2



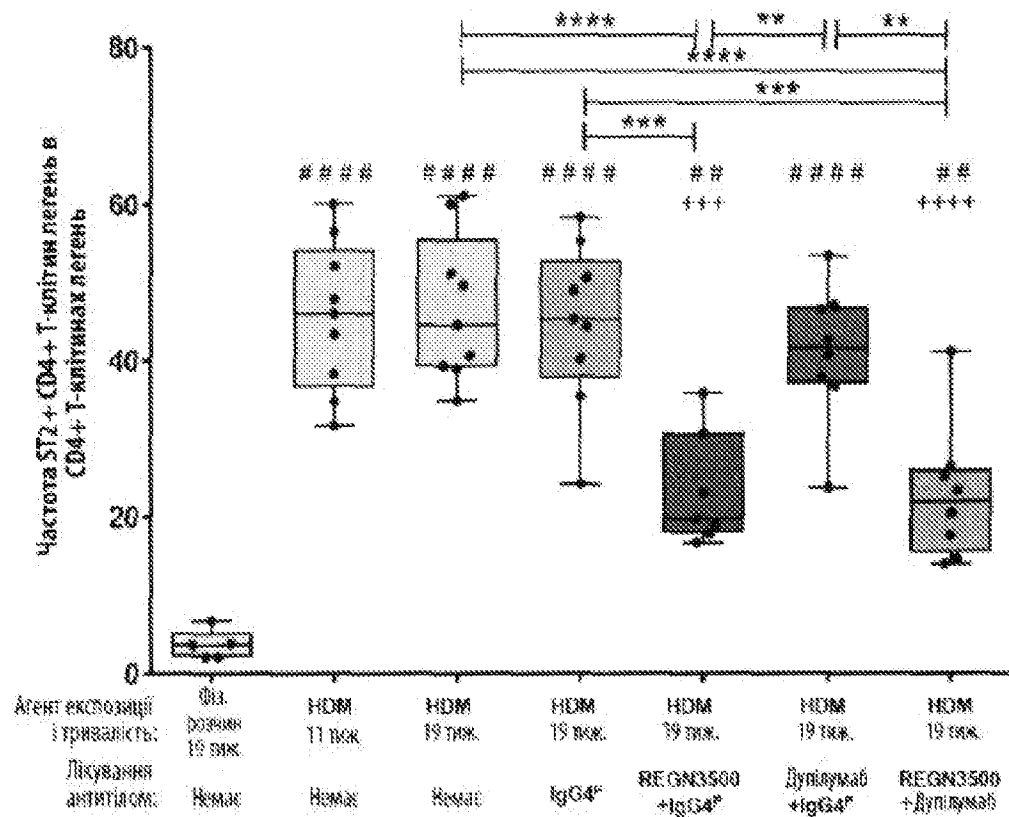
Фіг. 3



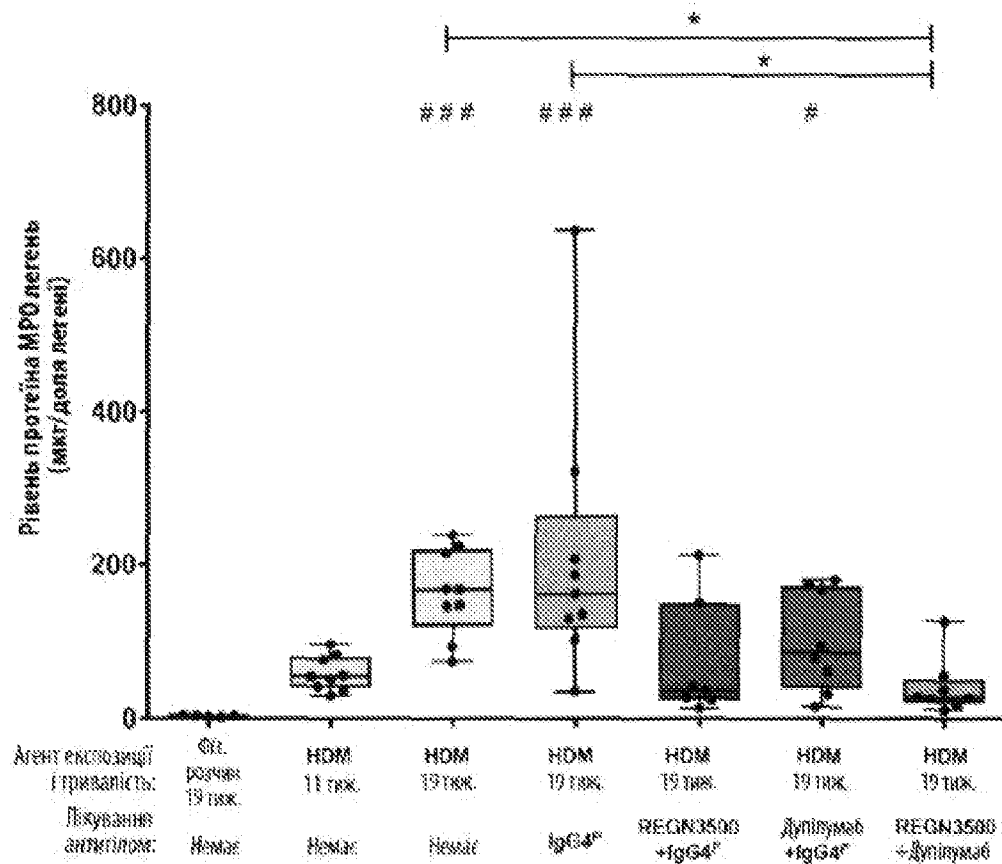
Фіг. 4А



Фіг. 4Б



Фиг. 5



Фиг. 6

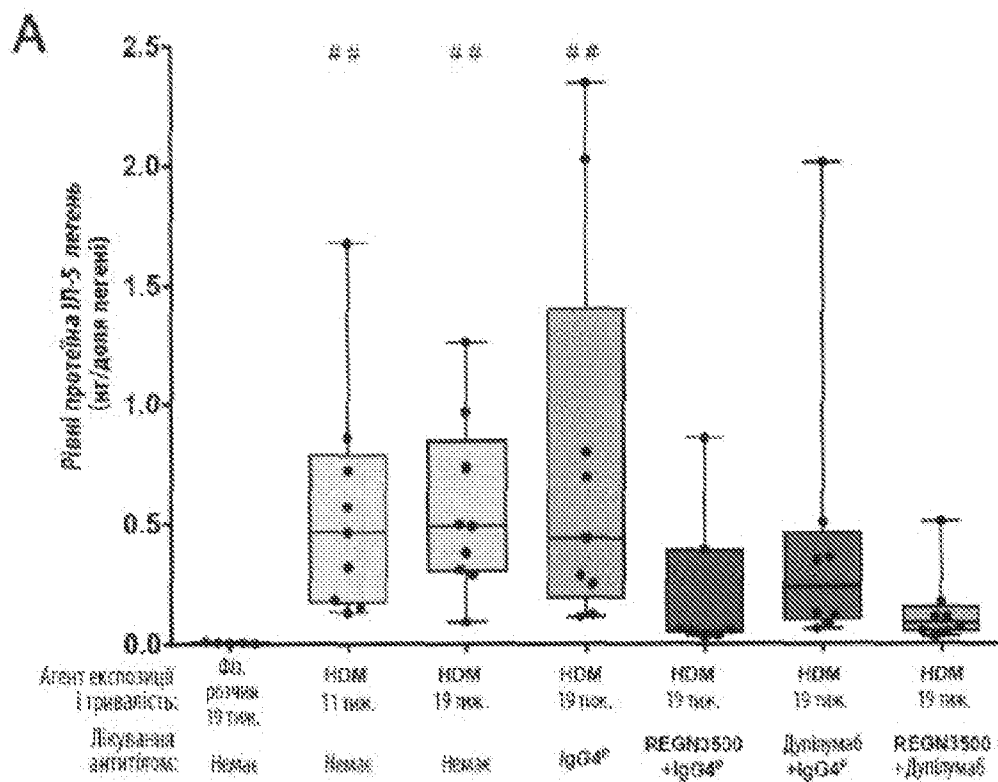


Fig. 7A

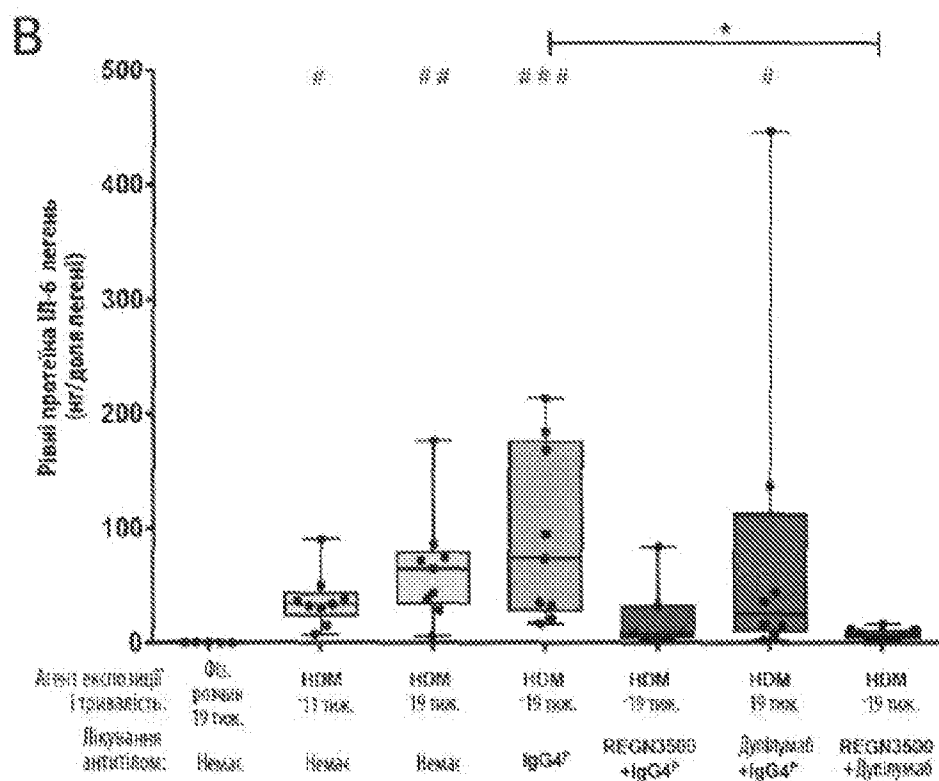


Fig. 7B

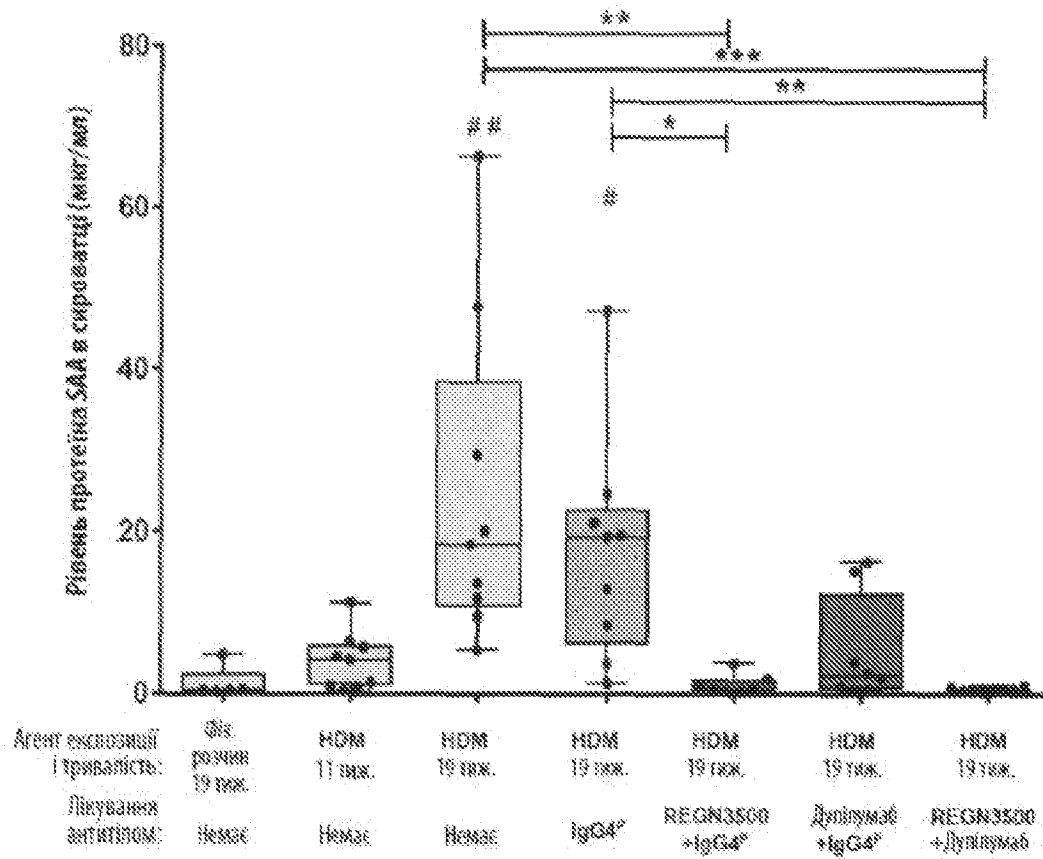


Fig. 8

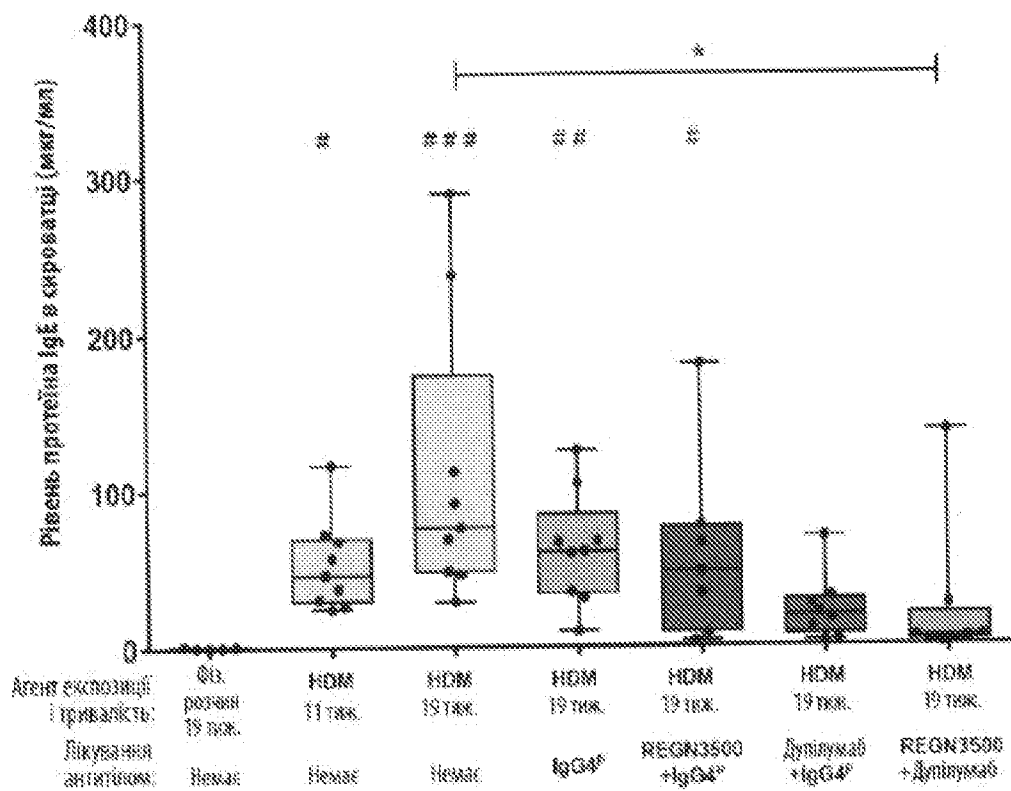


Fig. 9

