

Перехресні посилання на споріднені заявки

Ця заявка заявляє пріоритет відповідно до попередньої заявки на патент США № 61/792,619, поданої 15 березня 2013 р., та попередньої заявки на патент США № 61/649,147, поданої 18 травня 2012 р., що включені в цей документ як посилання в повному обсязі.

Посилання на перелік послідовностей

Ця заявка подається разом з Переліком послідовностей в електронному форматі через EFS-Web. Перелік послідовностей поданий у вигляді текстового файлу під назвою A1712WOPCT_ST25.txt, створеного 17 травня 2013 р., розмір якого становить 189,804 байт. Інформація електронного формату Переліку послідовностей включена в цей документ як посилання в повному обсязі.

Рівень техніки

ST2 являє собою зв'язувальний рецептор для інтерлейкіну-33 (IL-33) – цитокіну, спорідненого IL-1 та IL-18, також відомого як NF-HEV або IL-1F11. ST2 експресується як у вигляді розчинного несигнального варіанта (розчинний ST2 або sST2), так і в повнорозмірній трансмембранній формі (FL ST2, ST2 або ST2L), яка опосередковує клітинні відповіді на IL-33. Остання форма експресується в широкому діапазоні типів клітин та безпосередньо пов'язана з патологічними запаленнями за великої кількості хворобливих станів. Вона включає лімфоцити, зокрема, експресуючі IL-5 та IL-13 Т-хелперні клітини, клітини натуральних кілерів (NK) та натуральних Т-кілерів (NKT), а також багато так званих природних імунних клітин, таких як тучні клітини, базофіли, еозинофіли, макрофаги та природні хелперні клітини (також відомі як нуоцити (Neill, Wong et al. 2010)). Зв'язування IL-33 з ST2 на цих клітинах призводить до накопичування корецептора, що широко експресується, відомого як IL-1R акцесорний білок (AcP), та активації прозапальних сигнальних шляхів, подібних до IL-1 та IL-18. Таким чином, IL-33 здатний прямо активувати експресуючі ST2 клітини або посилювати їх активацію в присутності інших активаційних стимулів. Приклади індукованих IL-33 клітинних відповідей включають вироблення запальних цитокинів, таких як IL-5, IL-6, IL-13, TNF, IFN- γ та GM-CSF, а також вироблення хемокинів, таких як CXCL8, CCL17 та CCL24. Також було показано, що IL-33 посилює гострі алергічні реакції за допомогою накопичування тучних клітин та активації базофілів, що ініціюються передачею сигналу рецептором IgE або іншими активаторами тучних клітин та базофілів. Також IL-33 збільшує накопичування, виживання та адгезивні властивості імунних клітин, які експресують ST2, та, таким чином, є важливим компонентом, який викликає та підтримує клітинне запалення в місцевих тканинах.

Прозапальна дія IL-33 на природні та адаптивні імунні клітини призводить до збудження великої кількості патологічних процесів. В легенях вони включають запалення дихальних шляхів, утворення слизу, гіперсприйнятливості дихальних шляхів та фіброзне ремоделювання. Також IL-33 може призвести до місцевого запалення в суглобах, а також до шкірної та суглобної гіперноцицепції, за допомогою стимуляції вироблення прозапальних цитокинів (Verri, Guerrero et al. 2008; Xu, Jiang et al. 2008). Надлишок IL-33 пов'язують з патологічним відкладенням колагену та фіброзом, також він призводить до пошкодження епітелію за запального захворювання кишечника. Внаслідок свого сильного впливу на базофіли та IgE-сенсibiliзовані тучні клітини, IL-33 також може викликати анафілактичний шок (Pushparaj, Tay et al. 2009) та може грати значну роль при алергічних захворюваннях. Багато з цих захворювань за своєю природою є хронічними та прогресуючими, та важко піддаються лікуванню, відповідно, існує потреба в більш ефективних способах лікування.

Відповідно до документально підтверджених даних з біологічного впливу існує декілька свідчень того, що каскад реакцій IL-33/ST2 призводить до захворювань людини. Наприклад, аномально високу експресію IL-33 виявляють за захворювань, які супроводжуються запаленням слизових оболонок та запаленням суглобів. Такі захворювання включають астму (Prefontaine, Lajoie-Kadoch et al. 2009; Prefontaine, Nadigel et al. 2010), запальне захворювання кишечника (Beltran, Nunez et al. 2010; Pastorelli, Garg et al. 2010; Sponheim, Pollheimer et al. 2010) та ревматоїдний артрит (Palmer, Talabot-Ayer et al. 2009; Matsuyama, Okazaki et al. 2010). Експресія IL-33 є підвищеною в шкірі, враженій псоразом (Theoharides, Zhang et al. 2010), та в шкірі пацієнтів з atopічним дерматитом (Pushparaj, Tay et al. 2009), а також є збільшеною за патологічних випадків фіброзу, таких як системна склеродермія (Yanaba, Yoshizaki et al. 2011) (Manetti, Ibba-Manneschi et al. 2009) та фіброзі печінки (Marvie, Lisbonne et al. 2009). Також концентрація циркулюючого розчинного ST2 є підвищеною в багатьох випадках захворювань, що додатково вказує на зв'язок між каскадом реакцій цього цитокіну та цими захворюваннями. Приклади включають астму (Kuroiwa, Arai et al. 2001; Oshikawa, Kuroiwa et al. 2001; Ali, Zhang et al. 2009), хронічне обструктивне захворювання легень (Hacker, Lambers et al. 2009), фіброз легень (Tajima, Oshikawa et al. 2003), сепсис та травми (Brunner, Krenn et al. 2004), ВІЛ-інфекцію (Miyagaki, Sugaya et al. 2011), системний червоний вовчак (Mok, Huang et al. 2010), запальне захворювання кишечника (Beltran, Nunez et al. 2010), а також ревматоїдний артрит, склероз, гранулематоз Вегенера та хворобу Бехчета (Kuroiwa, Arai et al. 2001) та серцево-судинні захворювання (Shah and Januzzi 2010). IL-33 посилює еозинофільне запалення, до того ж, існують свідчення того, що цей каскад реакцій має відношення до еозинофільних захворювань, таких як риносинусит та назальний поліпоз (Plager, Kahl et al. 2010), а також еозинофільний бронхіт (Oshikawa,

Kuroiwa et al. 2001).

Додаткові свідчення, які пов'язують каскад реакцій IL-33/ST2 із захворюваннями людини, надані генетичними дослідженнями, в яких було виявлено наявність поліморфізму гену IL-33 та/або ST2 в загальній популяції, які в значній мірі пов'язані з підвищеним ризиком захворювання або параметрами важкості захворювання. В деяких великих загальногеномних дослідженнях генетичу варіацію в ST2 (IL1RL1) або IL-33 пов'язали з підвищеним ризиком астми (Gudbjartsson, Bjornsdottir et al. 2009; Moffatt, Gut et al. 2010; Wu, Romieu et al. 2010), а в інших дослідженнях на генетичному рівні цей каскад реакцій пов'язали з підвищеним ступенем важкості астми (Ali, Zhang et al. 2009) та бронхіальною гіперчутливістю (Reijmerink, Postma et al. 2008). Подібні дослідження показали, що цей каскад реакцій на генетичному рівні має відношення до алергічних захворювань, таких як atopічний дерматит (Shimizu, Matsuda et al. 2005), риносинусит (Sakashita, Yoshimoto et al. 2008; Castano R 2009), а також назальний поліпоз (Buysschaert, Grulois et al. 2010).

В сукупності ці дані пов'язані з декількома захворюваннями людини та здатністю цього цитокіну стимулювати багато форм небезпечних запальних процесів, що робить його придатною мішенню для терапевтичного втручання.

Суть винаходу

У винаході запропоновані анти-ST2 антигензв'язувальні блки, наприклад, антитіла та їх функціональні фрагменти, що мають властивості, які підходять для комерційного виробництва та терапевтичного застосування для людини. Особливо застосування анти-ST2 антигензв'язувальних білків доцільно в способах лікування захворювань та порушень, пов'язаних з системою IL-33/ST2. В цьому документі запропоновані ST2-зв'язувальні антитіла, які зв'язують ST2 з високою афінністю та ефективно блокують зв'язування IL-33, чим знижують IL-33-опосередковану передачу сигналу в клітині.

В першому аспекті реалізації ST2-антигензв'язувальний білок містить а) варіабельний домен легкого ланцюга, який є щонайменше на 90% ідентичним, щонайменше на 95% ідентичним, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:164 або SEQ ID NO:165; б) варіабельний домен важкого ланцюга, який є щонайменше на 90% ідентичним, щонайменше на 95% ідентичним, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:146 або SEQ ID NO:147; або с) варіабельний домен легкого ланцюга згідно з а) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з б).

Переважні антигензв'язувальні білки в першому аспекті реалізації включають ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:95, та варіабельний домен важкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:29; ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:96, та варіабельний домен важкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:30; ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:97, та варіабельний домен важкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:31; ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:98, та варіабельний домен важкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:32; ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:99, та варіабельний домен важкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:33; ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:100, та варіабельний домен важкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:34; ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:101, та варіабельний домен важкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:35; ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:102, та варіабельний домен важкого ланцюга,

[illegible]

В другому аспекті реалізації ST2-антигензв'язувальний білок містить а) варіабельний домен легкого ланцюга, що містить не більше десяти або не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:164 або SEQ ID NO:165; б) варіабельний домен важкого ланцюга, що містить не більше десяти або не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:146 або SEQ ID NO:147; або с) варіабельний домен легкого ланцюга згідно з а) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з б).

[illegible]

[illegible]

[illegible]

В четвертому аспекті реалізації винаходу ST2-антигензв'язувальний білок відповідно до першого, другого або третього аспекту зв'язується з ST2 людини з афінністю, яка є меншою або дорівнює 1×10^{-10} M.

В шостому аспекті реалізації винаходу ST2-антигенів зв'язувальний білок відповідно до першого, другого, третього, четвертого або п'ятого аспекту знижує IL-33-опосередковану передачу сигналу

ST2 людини в клітинах людини, які експресують ST2.

В цьому аспекті реалізації винаходу ST2-антигензв'язувальний білок відповідно до шостого аспекту знижує IL-33-опосередковану передачу сигналу ST2 яванської макаки в клітинах яванської макаки, які експресують ST2.

У восьмому аспекті реалізації винаходу ST2-антигензв'язувальний білок відповідно до першого, другого, третього, четвертого, п'ятого, шостого або сьомого аспекту є антитілом, таким як антитіло людини. Переважні антитіла включають такі антитіла, які містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:84, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:18; ті, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:85, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:19; ті, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:86, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:20; ті, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:87, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:21; ті, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:88, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:22; ті, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:89, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:23; ті, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:90, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:24; ті, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:91, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:25; ті, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:92, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:26; ті, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:93, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:27; ті, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:94, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:28; ті, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:160, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:142; ті, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:161, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:143; ті, що містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:162, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:144.

В дев'ятому аспекті реалізації винаходу запропоновані відділені нуклеїнові кислоти, які кодують один або більше поліпептидних компонентів ST2-антигензв'язувального білка, наприклад, легкий ланцюг антитіла або важкий ланцюг антитіла. В переважних варіантах реалізації винаходу нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що містить:

a) варіабельний домен легкого ланцюга, який є щонайменше на 95% ідентичним амінокислотній послідовності, наведеній в SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:164 або SEQ ID NO:165;

b) варіабельний домен важкого ланцюга, який є щонайменше на 95% ідентичним амінокислотній послідовності, наведеній в SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:146 або SEQ ID NO:147;

c) варіабельний домен легкого ланцюга, що містить не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотній послідовності, наведеної в SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:164 або SEQ ID NO:165;

d) варіабельний домен важкого ланцюга, що містить не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотній послідовності, наведеної в SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:146 або SEQ ID NO:147;

e) варіабельний домен легкого ланцюга, що містить:

i) LCDR1, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності LCDR1, наведеної в SEQ ID NO:106; LCDR2, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності LCDR2, наведеної в SEQ ID NO:117; та LCDR3, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності LCDR3, наведеної в SEQ ID NO:128;

ii) LCDR1, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності LCDR1, наведеної в SEQ ID NO:107; LCDR2, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності LCDR2,

наведеної в SEQ ID NO:152; та HCDR3, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності HCDR3, наведеної в SEQ ID NO:155; або

xiv) HCDR1, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності HCDR1, наведеної в SEQ ID NO:150; HCDR2, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності HCDR2, наведеної в SEQ ID NO:153; та HCDR3, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності HCDR3, наведеної в SEQ ID NO:156.

В окремих варіантах реалізації дев'ятого аспекту поліпептид кодує легкий ланцюг антитіла та є щонайменше на 80%, щонайменше на 90%, щонайменше на 95% або на 100% ідентичним нуклеотидній послідовності, наведених в SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158 або SEQ ID NO:159. В інших варіантах реалізації дев'ятого аспекту поліпептид кодує важкий ланцюг антитіла та є щонайменше на 80%, щонайменше на 90%, щонайменше на 95% або на 100% ідентичним нуклеотидній послідовності, наведених в SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140 або SEQ ID NO:141.

В десятому аспекті реалізації винаходу запропонований вектор експресії, що містить одну або більше виділених нуклеїнових кислот відповідно до восьмого аспекту. В окремих варіантах реалізації вектор експресії кодує легкий ланцюг антитіла, важкий ланцюг антитіла або і легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла.

В одинадцятому аспекті реалізації винаходу запропонована клітина-хазяїн, що містить одну або більше виділених нуклеїнових кислот відповідно до дев'ятого аспекту, які функціонально пов'язані з промотором, включаючи рекомбінантні клітини-хазяїни, що містять один або більше векторів експресії відповідно до десятого аспекту реалізації винаходу. В переважних варіантах реалізації рекомбінантна клітина-хазяїн секретує антитіло, яке зв'язує ST2. Переважними клітинами-хазяїнами є клітини-хазяїни ссавців, включаючи клітинні лінії CHO.

У дванадцятому аспекті реалізації винаходу запропоновані способи лікування аутоімунних або запальних захворювань, при чому цей спосіб включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості ST2-антигензв'язувального білка відповідно до будь-якого аспекту з першого, другого, третього, четвертого, п'ятого, шостого, сьомого або восьмого. В переважних варіантах реалізації ST2-антигензв'язувальний білок являє собою антитіло, що містить амінокислотну послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:95, та амінокислотну послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:29 (наприклад, Ab1), антитіло, що містить амінокислотну послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:96, та амінокислотну послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:30 (наприклад, Ab2), антитіло, що містить амінокислотну послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:97, та амінокислотну послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:31 (наприклад, Ab3), антитіло, що містить амінокислотну послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:98, та амінокислотну послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:32 (наприклад, Ab4), антитіло, що містить амінокислотну послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:99, та амінокислотну послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:33 (наприклад, Ab5), антитіло, що містить амінокислотну послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:100, та амінокислотну послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:34 (наприклад, Ab6), антитіло, що містить амінокислотну послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:101, та амінокислотну послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:35 (наприклад, Ab7), антитіло, що містить амінокислотну послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:102, та амінокислотну послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:36 (наприклад, Ab8), антитіло, що містить амінокислотну послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:103, та амінокислотну послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:37 (наприклад, Ab9), антитіло, що містить амінокислотну послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:104, та амінокислотну послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:38 (наприклад, Ab10), антитіло, що містить амінокислотну послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:105, та амінокислотну послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:39 (наприклад, Ab11); антитіло, що містить амінокислотну послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:163, та амінокислотну послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:145 (наприклад, Ab30); антитіло, що містить амінокислотну послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:164, та амінокислотну послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:146

(наприклад, Ab32); або антитіло, що містить амінокислотну послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:165, та амінокислотну послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, наведену в SEQ ID NO:147 (наприклад, Ab33). В переважних варіантах реалізації ST2-антигензв'язувальний білок пригнічує зв'язування IL-33 з ST2. В особливо переважних варіантах реалізації аутоімунним або запальним захворюванням є астма, запальне захворювання кишечника, ревматоїдний артрит, псоріаз, атопічний дерматит, фіброз, хронічне обструктивне захворювання легень, системний червоний вовчак, склероз, гранулематоз Вегенера, хвороба Бехчета, риносинусит, назальний поліпоз, еозинофільний бронхіт та серцево-судинне захворювання.

У тринадцятому аспекті реалізації винаходу запропонований спосіб виготовлення ST2-антигензв'язувального білка відповідно до будь-якого аспекту з першого, другого, третього, четвертого, п'ятого, шостого, сьомого або восьмого, шляхом культивування рекомбінантної клітини-хазяїна відповідно до одинадцятого аспекту та виділення із зазначеної культури ST2-антигензв'язувального білка.

У чотирнадцятому аспекті реалізації винаходу запропоновані ST2-антигензв'язувальні білки відповідно до будь-якого аспекту з першого, другого, третього, четвертого, п'ятого, шостого, сьомого або восьмого, які перехресно конкурують з антитілом, вибраним з групи, що складається з:

- a) антитіла, яке містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID:84, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:18;
- b) антитіла, яке містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID:85, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:19;
- c) антитіла, яке містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID:86, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:20;
- d) антитіла, яке містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID:87, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:21;
- e) антитіла, яке містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID:88, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:22;
- f) антитіла, яке містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID:89, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:23;
- g) антитіла, яке містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID:90, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:24;
- h) антитіла, яке містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID:91, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:25;
- i) антитіла, яке містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID:92, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:26;
- j) антитіла, яке містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID:93, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:27;
- k) антитіла, яке містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID:94, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:28;
- l) антитіла, яке містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID:160, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:142;
- m) антитіла, яке містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID:161, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:143; та

n) антитіла, яке містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID:162, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:144.

У п'ятнадцятому аспекті реалізації винаходу запропонований виділений ST2-антигензв'язувальний білок, який переважно є антитілом або його функціональним фрагментом, який зв'язує поліпептид, що містить домен 1 та домен 2 ST2 людини (SEQ ID NO:175), при чому зв'язування в значній мірі пригнічується у випадку введення одиначної мутації в домен 1 та домен 2 ST2 людини цього поліпептиду, а одиначна мутація вибрана з групи, що складається з L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R та V176R. Під "в значній мірі пригнічується" мається на увазі те, що виміряна різниця у зв'язуванні є статично значною. У переважних варіантах реалізації зв'язування в значній мірі пригнічується для двох або більше представників групи, включаючи всіх представників групи. В окремих варіантах реалізації п'ятнадцятого аспекту зв'язування в значній мірі активується у випадку введення одиначної мутації в домен 1 та домен 2 ST2 людини цього поліпептиду, а одиначна мутація вибрана з групи, що складається з L53R, R72A та S73R. Під "в значній мірі активується" мається на увазі те, що виміряна різниця в зв'язуванні є статично значною. В переважних варіантах реалізації зв'язування в значній мірі активується для всіх представників групи. В окремих варіантах реалізації п'ятнадцятого аспекту ST2-зв'язувальний білок перехресно конкурує за зв'язування з ST2 людини з антитілом, який містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ

ID:85, та важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:19. В особливо переважних варіантах реалізації антигензв'язувальний білок є антигензв'язувальним білком відповідно до першого, другого, третього, четвертого, п'ятого, шостого, сьомого або восьмого аспекту.

В шістнадцятому аспекті реалізації винаходу запропонований антигензв'язувальний білок відповідно до першого, другого, третього, четвертого, п'ятого, шостого, сьомого, восьмого, чотирнадцятого або п'ятнадцятого аспекту, при чому зазначений ST2-зв'язувальний білок переважно являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, зв'язує частину ST2, що містить амінокислоти 33-44 та/або 88-94 з SEQ ID NO:1, що визначено за допомогою аналізу воднево-дейтерієвого обміну.

В сімнадцятому аспекті реалізації винаходу запропонований антигензв'язувальний білок, який переважно є антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, відповідно до першого, другого, третього, четвертого, п'ятого, шостого, сьомого, восьмого, чотирнадцятого, п'ятнадцятого або шістнадцятого аспекту, який зв'язується з ST2 з утворенням області контакту, при чому область контакту, утворена за зазначеного зв'язування, містить залишок ST2, вибраний з групи, яка складається з K1, F2, P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79 та Y81. В переважних варіантах реалізації область контакту, утворена за зазначеного зв'язування, містить залишок ST2, вибраний з P19, R20, Q21, G22, K23, та/або Y26, залишок ST2, вибраний з I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79, та/або Y81, або залишки ST2, вибрані з P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79 та Y81. Область контакту можна визначити за різницею в площі поверхні, яка є доступною для розчинника, між зв'язаним та незв'язаним ST2, при чому залишки з області контакту визначають як ті амінокислоти, які характеризуються різницею більше 10%, та ті, що утворюють опосередковані водою водневі зв'язки із зазначеним антитілом, або визначають як ті амінокислоти, які містять щонайменше один атом в межах 5Å від антитіла.

У вісімнадцятому аспекті реалізації винаходу запропонований відділений ST2-антигензв'язувальний білок, який переважно є антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, що містить а) варіабельний домен легкого ланцюга, який є щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичним амінокислотній послідовності, наведеній в SEQ ID NO:96; б) варіабельний домен важкого ланцюга, який є щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичним амінокислотній послідовності, наведеній в SEQ ID NO:30; в) варіабельний домен легкого ланцюга згідно з а) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з б); г) варіабельний домен легкого ланцюга, що містить не більше десяти або не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:96; д) варіабельний домен важкого ланцюга, що містить не більше десяти або не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:30; е) варіабельний домен легкого ланцюга згідно з д) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з е); ж) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить LCDR1, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно послідовності LCDR1, наведеної в SEQ ID NO:107; LCDR2, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно послідовності LCDR2, наведеної в SEQ ID NO:118; та LCDR3, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно послідовності LCDR3, наведеної в SEQ ID NO:129; з) варіабельний домен важкого ланцюга, який містить HCDR1, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно послідовності HCDR1, наведеної в SEQ ID NO:41; HCDR2, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно послідовності HCDR2, наведеної в SEQ ID NO:52; та HCDR3, що містить не більше трьох амінокислотних вставок, делецій або замін відносно послідовності HCDR3, наведеної в SEQ ID NO:63, або і) варіабельний домен легкого ланцюга згідно з ж) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з з).

У переважних варіантах реалізації вісімнадцятого аспекту варіабельна ділянка легкого ланцюга містить D28 або його консервативну заміну, I29 або його консервативну заміну, S30 або його консервативну заміну, N31 або його консервативну заміну, Y32 або його консервативну заміну, Y49 або його консервативну заміну, D50 або його консервативну заміну, N53 або його консервативну заміну, E55 або його консервативну заміну, T56 або його консервативну заміну, D91 або його консервативну заміну, D92 або його консервативну заміну, N93 або його консервативну заміну, F94 або його консервативну заміну або L96 або його консервативну заміну. В інших переважних варіантах реалізації варіабельна ділянка легкого ланцюга містить D28 або його консервативну заміну, N31 або його консервативну заміну, D50 або його консервативну заміну, N53 або його консервативну заміну, E55 або його консервативну заміну, D91 або його консервативну заміну та D92 або його консервативну заміну. В інших переважних варіантах реалізації варіабельна ділянка легкого ланцюга містить D28, N31, D50, N53, E55, D91 та D92.

У вісімнадцятий аспект реалізації також включені ST2-зв'язувальні білки, переважно антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти, при чому варіабельна ділянка важкого ланцюга містить W33

або його консервативну заміну, I50 або його консервативну заміну, D57 або його консервативну заміну, R59 або його консервативну заміну, H99 або його консервативну заміну, G100 або його консервативну заміну, T101 або його консервативну заміну, S102 або його консервативну заміну, S103 або його консервативну заміну, D104 або його консервативну заміну, Y105 або його консервативну заміну або Y106 або його консервативну заміну; при чому варіабельна ділянка важкого ланцюга містить S102 або його консервативну заміну, S103 або його консервативну заміну, D104 або його консервативну заміну та Y105 або його консервативну заміну; та при чому варіабельна ділянка важкого ланцюга містить S102, S103, D104 та Y105.

У певних варіантах реалізації вісімнадцятого аспекту ST2-антигензв'язувальний білок специфічно зв'язує ST2 людини з афінністю, яка є меншою або дорівнює 1×10^{-10} M, пригнічує зв'язування ST2 людини з IL-33 людини, знижує IL-33-опосередковану передачу сигналу ST2 людини в експресуючих ST2 клітинах людини, пригнічує зв'язування ST2 яванської макаки з IL-33 яванської макаки, знижує IL-33-опосередковану передачу сигналу ST2 яванської макаки в експресуючих ST2 клітинах яванської макаки та/або є антитілом, таким як антитіло людини.

Короткий опис фігур

Фіг.1 Обробка ST2 mAb призводить до значного пригнічення IL-33-індукованого IL-5 в рідині бронхоальвеолярного лаважу (РБАЛ) мишей штамів Balb/c та C57Bl/6.

Фіг.2 Обробка ST2 mAb є ефективною в алерген (CRA)-індукованій моделі астми таргана. У мишей, які були оброблені антитілом до ST2, спостерігали значно меншу кількість еозинофілів РБАЛ, ніж у мишей ізотипичного контролю, які були оброблені Ig.

Фіг.3 Пригнічення ST2 mAbs IL-33-індукованого вироблення IL-5 людини з CD4⁺ Т-клітин, отриманих від різних донорів. Лінія (—) відображає значення для позитивного контролю IL-33 людини в комбінації з IL-2 людини за відсутності пригнічення. (••••) відображає значення для позитивного контролю IL-2 людини. Лінія (— —) відображає значення для контролю середовища.

Фіг.4 Аналіз залежності доза-відповідь для IL-33 людини в НК-клітинах людини.

Фіг.5 Зниження активності IL-33 внаслідок впливу Ab2, зареєстроване під час аналізу НК-клітин людини, порівняно з комерційно доступними антитілами до ST2. Клон HB12, FB9 та 2A5 отримали від міжнародної корпорації MBL. Клон B4E6 отримали від MD Biosciences. Клон 97203 отримали від R&D Systems.

Фіг.6 Розташування ділянок ST2, що зв'язані Ab2, визначених за допомогою HDX (дивіться Приклад 12). Ділянка, яка відповідає амінокислотам 15-26 позаклітинного домену ST2, виділена червоним, а ділянка, яка відповідає амінокислотам 70-76 позаклітинного домену ST2 виділена пурпуровим.

Фіг.7 Загальна структура комплексу ST2/Ab2 sc-dsFv. На фігурі наведено зображення двох молекул Ab2 sc-dsFv, із забарвленою відповідно у ціановий/блакитний або світло-жовтий/золотистий парю легкий ланцюг (LC)/важкий ланцюг (HC). Дві молекули ST2 зображені пурпуровим та зеленим кольором.

Фіг.8 Область зв'язування. ST2 зображен жовтим кольором. Важкий ланцюг та легкий ланцюг Ab2 зображені сірим та пшеничним кольором. Петлі CDR для важкого ланцюга та легкого ланцюга забарвлені у наступному порядку: CDR1: червоним (HC) або світло-червоним (LC); CDR2: зеленим (HC) або світло-зеленим (LC); та CDR3: блакитним (HC) або світло-блакитним (LC).

Фіг.9 Карта розподілу електростатичного поверхневого потенціалу для ST2 та Ab2 sc-dsFv. Фіг.9А) Комплементарність заряду та поверхні для ST2 та Ab2 sc-dsFv. Область зв'язування обведена колом. Фіг.9В) Ліва частина: Ab2 (сірий/пшеничний колір) зв'язується позитивно зарядженою ділянкою на (поверхні) ST2; Права частина: ST2 (жовтий колір) зв'язується з кислотною ділянкою (поверхні) Ab2 sc-dsFv. На карті розподілу електростатичного поверхневого потенціалу червона поверхня відповідає негативному заряду, а блакитна поверхня відповідає позитивному заряду.

Фіг.10 Залишки в межах варіабельних доменів Ab2, які утворюють область контакту з ST2 за зв'язування з антигеном. Ділянки CDR обведені. Залишки в межах області контакту виділені жирним текстом. Залишки, які утворюють водневі зв'язки або сольові містки з амінокислотами в межах ST2, виділені курсивом.

Детальний опис винаходу

Заголовки розділів, які використовуються в цьому документі, наведені з метою структуризації та не обмежують предмету винаходу, що описується. Всі роботи, які перераховані в цьому описі, в повному об'ємі включені в документ як посилання.

Для синтезу рекомбінантних ДНК та олігонуклеотидів, культивування та трансформації тканин, очищення білка та таке інше, можна використовувати загальноприйнятні способи. Ферментативні реакції та очищення можна проводити відповідно до інструкції виробника або способами, які є загальноприйнятними в цій галузі техніки або описаними в цьому документі. Нижченаведені процедури та способи в загальному випадку можна здійснити відповідно до стандартних способів, широко відомих в цій галузі техніки, які описані в багатьох загальних та більш спеціалізованих роботах, що перелічені та обговорюються в описі винаходу. Дивіться, наприклад, Sambrook et al.,

2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., яка включена в цей документ як посилання для використання з будь-якою метою. У випадку якщо не наведені окремі визначення, термінологія, а також лабораторні процедури та методи аналітичної хімії, органічної хімії, медичинської та фармацевтичної хімії, які описані в цьому описі, є широковідомими за загальнотехнічного використання в цій галузі техніки. Для хімічного синтезу, хімічного аналізу, фармацевтичного виготовлення, складання рецептури, а також доставки препаратів та лікування пацієнтів можна використовувати стандартні методи.

ST2

Антигензв'язувальні білки, які описані в цьому документі, зв'язуються з ST2. ST2 експресується як у вигляді розчинного несигнального варіанта (розчинний ST2 або sST2), так і в повнорозмірній трансмембранній формі (FL ST2, ST2 або ST2L). Приклад амінокислотної послідовності ST2L людини наведений в Таблиці 1. Білок складається з декількох доменів. Амінокислоти 1-18 відповідають лідерній послідовності, яка може відщеплюватись під час процесингу білка в клітинах ссавців; амінокислоти 19-331 відповідають позаклітинному домену; амінокислоти 332-350 відповідають трансмембранному домену; а амінокислоти 351-556 відповідають внутрішньоклітинному домену. В переважних варіантах реалізації антигензв'язувальний білок зв'язується з позаклітинним доменом ST2L та запобігає взаємодії ST2 з IL-33. Приклад амінокислотної послідовності IL-33 людини наведений в Таблиці 1.

Передача сигналу IL-33 здійснюється через гетеродимерний рецептор, що містить ST2L та AcP. Приклад амінокислотної послідовності AcP людини наведений в Таблиці 1. Цей білок також складається з декількох доменів: амінокислоти 1-20 відповідають лідерній послідовності, яка може відщеплюватись під час процесингу білка в клітинах ссавців; амінокислоти 21-367 відповідають позаклітинному домену; амінокислоти 368-388 відповідають трансмембранному домену; а амінокислоти 389-570 відповідають внутрішньоклітинному домену. В прикладах, які ілюструють варіанти реалізації, ST2-антигензв'язувальний білок зв'язує ST2L та перешкоджає IL-33-опосередкованій передачі сигналу в клітинах, що експресують ST2L та AcP.

Таблиця 1

Амінокислотна послідовність ST2 людини (SEQ ID NO:1)

MGFWILAILTILMYSTAAKFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQ LLKFLPAXVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSEKNSKIYCPTIDLYNW TAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEAGDYTCFKIHENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSL FPVIGAPAQNEIKEVEIGKNANLTCSACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFSNGL ACLDMLVRIADVKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSIYCIIVCSVFLMLINVLVILKMF WIEATLLWRDIAPKYKTRNDGKLYDAYVVYPRNYKSSTDGASRVEHFVHQILPDVLENKCGYTLICIYGRD MLPGEDVVTAVETNIRKSRRHIFILTPQITHNKEFAYEQEVALHCAIQNDKAVILIEAMEALSELDMQLAEAL QDSLQHLMKVQGTIKWREDHIANKRSLNSKFWKHVRYQMPVPSKIPRKASSLTPLAAQKQ X = E або A
Амінокислотна послідовність AcP людини (SEQ ID NO:2)
MTLLWCVVSLYFYGILQSDASERCDDWGLDTMRQIQVFEDAPARIKCPLFEHFLKFNSTAHSAAGLTLIW YWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGNVTCMLRNTTYCSKVAFFLEVVQKDCSFN SPMKLPVHKLIEYGIQIRITCPNVDGYFPSSVKPTITWYMGCYKIQNFNNVIPEGMNLISFLIALISNNGNYT CVVTPENGRTFHLTRTLTVKVVGPSKNAVPPVIHSPNDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVW WTIDGKKPDDITDVTINESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAAKVQKQVPA PRYTVELACGFGATVLLVVLIVVYHVYWLEMLFYRAHFGTDETILDGKEYDIYVSYARNAEEEEFVLLTL RGVLENEFGYKLCIFDRDSLPGGIVTDETLISFIQKSRLLVVLSPNYVLQGTQALLELKAGLENMASRGNI NVILVQYKAVKETKVKEKRAKTVLTVIKWKGEKSKYPQGRFWKQLQVAMPVKKSPRRSSSDEQGLSYS SLKNV
Амінокислотна послідовність IL-33 людини (SEQ ID NO:3)
MKPKMKYSTNKISTAKWKNTASKALCFKLKGSQKAKEVCPMYFMKLRSGLMIKKEACYFRRETTKRPS LKTGRKHKRHLVLAACQQQSTVECFAGISGVQKYTRALHDSSITGISPITEYLASLSTYNDQSITFALEDE SYEIYVEDLKKDEKDKVLLSYYESQHPSNESGDGVDGKMLMVTLSPTKDFWLHANNKEHVELHKCE KPLPDQAFFVLHNMHSNCVSFECKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDSSENLCTENILFKLSET

В прикладах, які ілюструють варіанти реалізації цього винаходу, відбувається високоафінне зв'язування як ST2 людини, так і ST2 яванської макаки, включаючи ті випадки, коли відбувається високоафінне зв'язування та блокується взаємодія IL-33 яванської макаки з ST2 яванської макаки. Ці характеристики забезпечують інформативне токсикологічне дослідження на приматах за винятком людини.

Приклад амінокислотної послідовності ST2L яванської макаки наведений в Таблиці 2. Цей білок складається з декількох доменів: амінокислоти 1-18 відповідають лідерній послідовності, яка може

відщеплюватись під час процесингу білка в клітинах ссавців; амінокислоти 19-331 відповідають позаклітинному домену; амінокислоти 332-350 відповідають трансмембранному домену; а амінокислоти 351-556 відповідають внутришньоклітинному домену.

Приклад амінокислотної послідовності AcP яванської макаки наведений в Таблиці 2. Цей білок складається з декількох доменів: амінокислоти 1-20 відповідають лідерній послідовності, яка може відщеплюватися під час процесингу білка в клітинах ссавців; амінокислоти 21-367 відповідають позаклітинному домену; амінокислоти 368-388 відповідають трансмембранному домену; а амінокислоти 389-570 відповідають внутришньоклітинному домену.

Приклад амінокислотної послідовності IL-33 яванської макаки наведений в Таблиці 2.

Таблиця 2

Амінокислотна послідовність ST2 яванської макаки (SEQ ID NO:4)

MGLWILAILTILVYSTAAKFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKSSYIVDWYYSQTNKSIPQERNRVFASGQL LKFLPAEVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQPCDNPDLMYSTVSGSEKNSKIYCPTIDLYNWT APLEWFKNCQALQGSRYKAHKSFLVIDNVMTDDAGDYTCFKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSR FPVIRAPAHNETKEVEIGENTNLTCACFGKGAQFLATVQWQLNGNKITDFSEPRIQQEEGQNSFSNG LACVNTVLRIADVKEEDLLRYDCLALNLHGLRRHTIRLSRKNPIDHQSTYCIHVCVLLMLINILVILKTFW IEATLLWRDIAKPYKTRNDGKLYDAYVIYPRNYTSSADGASRVEYFVHQILPDVLENKCGYTLCTIYGRDML PGEDVVTAVETNIRKSRRHIFILTPQITHSEEFAYEQEVALHSALIQNSKVLIEMEALSELDMLQAEALQD SLRHLMEVQGTIKWREDHVANKRSLNSKFWKHVRYQMPVPSKMPRKASSLTSLAAQKQ
Амінокислотна послідовність AcP яванської макаки (SEQ ID NO:5)
MTLLWCVVSIFYGILQSDASERCDDWGLDTMRQIQVFEDPARIKCPLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLIW YWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFPLEVVQKDCSFN SPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTITWYMGCYKIQNFNNVIPEGMNLISLIAFISNNGNYT CVVTYPENGRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVW WTIDGKKPDDIPIDVTINESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAATVKQKQVPA PRYTVELACGFGATVLLVVLIVVYHVYWLEMLFYRAHFGTDETILDGKEYDIYVSYARNAEEEEFVLLTL RGVLENEFGYKLCIFDRDSLPGGIVTDETLSEFIQKSRLLVVLSPNYVLQGTQALLELKAGLENMASQGN NVILVQYKAVKETKVKEKRAKTVLTVIKWKGEKSKYPQGRFWKQLQVAMPVKKSPRRSSSDEQGLSYS SLKNV
Амінокислотна послідовність IL-33 яванської макаки (SEQ ID NO:6)
MKPKMKYSTNKTAKRKNTASKALCFKLGKSQKAKEVCHVYFMKLRSGLMIKKEACYFRRETTKRPS LKTGGKHKHGLVLAACQQQSTVECFAGISGVPKYTRALHDSSITGISPITESLASLSTYNDQSITFALEDE SYEIVVEDLKKDKKKDKVLLSYYESQHPSSSESGDGVGDKMLMVTLSPTKDFWLQANNKEHSHVELHKCE KPLPDQAFFVLHNRSFNCVSFECKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDHSENLGSENILFKLSEI

ST2-антигензв'язувальні білки

В цьому винаході запропоновані антигензв'язувальні білки, які специфічно зв'язують ST2. Варіанти реалізації антигензв'язувальних білків включають пептиди та/або поліпептиди, які специфічно зв'язують ST2. Такі пептиди або поліпептиди в деяких випадках можуть включати одну або більше посттрансляційних модифікацій. Варіанти реалізації антигензв'язувальних білків включають антитіла та їх фрагменти відповідно до наведених в цьому описі визначенням, які специфічно зв'язують ST2. Вони включають антитіла, які специфічно зв'язують ST2 людини, включаючи ті, що пригнічують зв'язування та/або активацію ST2 IL-33.

Антигензв'язувальні білки, які є об'єктами винаходу, специфічно зв'язуються з ST2. Вираз "специфічно зв'язує", який вживають в цьому описі, значить, що антигензв'язувальний білок серед інших білків переважно зв'язує ST2. В деяких варіантах реалізації вираз "специфічно зв'язує" значить, що ST2-антигензв'язувальний білок має більш високу афінність до ST2, ніж до інших білків. ST2-антигензв'язувальні білки, які специфічно зв'язують ST2, можуть мати афінність зв'язування до ST2 людини, яка менше або дорівнює 1×10^{-7} M, менше або дорівнює 2×10^{-7} M, менше або дорівнює 3×10^{-7} M, менше або дорівнює 4×10^{-7} M, менше або дорівнює 5×10^{-7} M, менше або дорівнює 6×10^{-7} M, менше або дорівнює 7×10^{-7} M, менше або дорівнює 8×10^{-7} M, менше або дорівнює 9×10^{-7} M, менше або дорівнює 1×10^{-8} M, менше або дорівнює 2×10^{-8} M, менше або дорівнює 3×10^{-8} M, менше або дорівнює 4×10^{-8} M, менше або дорівнює 5×10^{-8} M, менше або дорівнює 6×10^{-8} M, менше або дорівнює 7×10^{-8} M, менше або дорівнює 8×10^{-8} M, менше або дорівнює 9×10^{-8} M, менше або дорівнює 1×10^{-9} M, менше або дорівнює 2×10^{-9} M, менше або дорівнює 3×10^{-9} M, менше або дорівнює 4×10^{-9} M, менше або дорівнює 5×10^{-9} M, менше або дорівнює 6×10^{-9} M, менше або дорівнює 7×10^{-9} M, менше або дорівнює 8×10^{-9} M, менше або дорівнює 9×10^{-9} M, менше або дорівнює 1×10^{-10} M, менше або дорівнює 2×10^{-10} M, менше або дорівнює 3×10^{-10} M, менше або дорівнює 4×10^{-10} M, менше або дорівнює 5×10^{-10} M, менше або дорівнює 6×10^{-10} M, менше або дорівнює 7×10^{-10} M, менше або дорівнює 8×10^{-10} M, менше або дорівнює 9×10^{-10} M, менше або дорівнює 1×10^{-11} M, менше або дорівнює 2×10^{-11} M,

менше або дорівнює 3×10^{-11} М, менше або дорівнює 4×10^{-11} М, менше або дорівнює 5×10^{-11} М, менше або дорівнює 6×10^{-11} М, менше або дорівнює 7×10^{-11} М, менше або дорівнює 8×10^{-11} М, менше або дорівнює 9×10^{-11} М, менше або дорівнює 1×10^{-12} М, менше або дорівнює 2×10^{-12} М, менше або дорівнює 3×10^{-12} М, менше або дорівнює 4×10^{-12} М, менше або дорівнює 5×10^{-12} М, менше або дорівнює 6×10^{-12} М, менше або дорівнює 7×10^{-12} М, менше або дорівнює 8×10^{-12} М або менше або дорівнює 9×10^{-12} М.

Способи визначення афінності зв'язування антигензв'язувального білка добре відомі в цій галузі техніки. Загальноприйнятні способи визначення афінності включають поверхневий плазмонний резонанс (ППР) (Morton and Myszkla "Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors" *Methods in Enzymology* (1998) 295, 268-294), біо-шарову інтерферометрію, (Abdiche et al "Determining Kinetics and Affinities of Protein Interactions Using a Parallel Real-time Label-free Biosensor, the Octet" *Analytical Biochemistry* (2008) 377, 209-217), кінетичний ексклюзійний аналіз (KinExA) (Darling and Brault "Kinetic exclusion assay technology: characterization of molecular interactions" *Assay and Drug Dev Tech* (2004) 2, 647-657), ізотермічну калориметрію (Pierce et al "Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions" *Methods* (1999) 19, 213-221) та аналітичне ультрацентрифугування (Lebowitz et al "Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review" *Protein Science* (2002), 11:2067-2079). Приклади таких способів наведені в Прикладі 3.

Слід розуміти, що під час посилання в цьому описі до різних варіантів реалізації ST2-антигензв'язувальних білків, останні включають також ST2-зв'язувальні фрагменти. ST2-зв'язувальний фрагмент містить будь-який з фрагментів, які описані в цьому описі, або доменів антитіла, яке зберігає здатність специфічно зв'язуватись з ST2. ST2-зв'язувальний фрагмент може знаходитись в будь-якій з каркасних структур, які описані в цьому описі.

В певних терапевтичних варіантах реалізації ST2-антигензв'язувальний білок пригнічує зв'язування ST2 з IL-33 та/або пригнічує одну або більше біологічних функцій, які асоціюються зі зв'язуванням ST2 з IL-33, наприклад, IL-33-опосередковану передачу сигналу. Вважається, що такі антигензв'язувальні білки є "нейтралізуючими". В певних варіантах реалізації нейтралізуючий ST2-антигензв'язувальний білок специфічно зв'язує ST2 та пригнічує зв'язування ST2 з IL-33 на величину від 10% до 100%, наприклад, щонайменше на близько 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% або більше. Наприклад, можна досліджувати нейтралізуючу здатність ST2-антигензв'язувальних білків шляхом визначення здатності антигензв'язувального білка блокувати зв'язування IL-33 з ST2 або IL-33 з корецепторами ST2 та АсР, дивіться, наприклад, аналіз блокування IL-33, наведений в Прикладі 6. В іншому варіанті можна досліджувати нейтралізуючу здатність ST2-антигензв'язувальних білків методом, в якому визначається ефект від присутності ST2-антигензв'язувального білка в аналізі, який визначає IL-33-опосередковану біологічну функцію. Наприклад, це здатність IL-33 індукувати біологічну відповідь, таку як внутрішньоклітинна передача сигналу або підвищена експресія медіаторів мРНК або секреція медіаторів, таких як цитокіни та хемокини з клітин, таких як еозинофіли, базофіли, Т-клітини, тучні клітини, NK-клітини, NKT-клітини, нейтрофіли або природні хелперні клітини. В іншому варіанті це може бути здатність IL-33 стимулювати диференціацію, проліферацію, виживання, хемотаксис, зміну форми або адгезивних властивостей клітин, таких як еозинофіли, базофіли, Т-клітини, тучні клітини, NK-клітини, NKT-клітини, нейтрофіли або природні хелперні клітини. В іншому варіанті це може бути здатність IL-33 індукувати поверхневу експресію певних маркерів клітинної активації, таких як CD11b, на клітинах, таких як еозинофіли, базофіли, Т-клітини, тучні клітини, NK-клітини, NKT-клітини, нейтрофіли або природні хелперні клітини. Приклади таких способів наведені в Прикладах 7-10.

Варіанти реалізації антигензв'язувальних білків включають каркасні структури відповідно до наведених в цьому описі визначенням з однією або більше гіперваріабельними ділянками (CDRs – від англ. "complementarity determining regions"). Варіанти реалізації додатково включають антигензв'язувальні білки, що містять каркасну структуру з одним або більше варіабельними доменами антитіла, як важкими, так і легкими. Варіанти реалізації включають антитіла, які містять варіабельний домен легкого ланцюга, вибраний з групи, яка складається з варіабельного домену легкого ланцюга (LCv) Ab1, Ab2 LCv, Ab3 LCv, Ab4 LCv, Ab5 LCv, Ab6 LCv, Ab7 LCv, Ab8 LCv, Ab9 LCv, Ab10LCv, Ab11 LCv, Ab30 LCv, Ab32 LCv та Ab33 LCv (SEQ ID NO:95-105, 163-165, відповідно), та/або варіабельний домен важкого ланцюга, вибраний з групи, яка складається з варіабельного домену важкого ланцюга (HCv) Ab1, Ab2 HCv, Ab3 HCv, Ab4 HCv, Ab5 HCv, Ab6 HCv, Ab7 HCv, Ab8 HCv, Ab9 HCv, Ab10 HCv, Ab11HCv, Ab30HCv, Ab32HCv та Ab33HCv (SEQ ID NO:29-39, 145-147, відповідно), а також їх фрагменти, похідні, мутеїни та варіанти.

Прикладом легкого ланцюга, що містить Ab1 LCv, є легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:84.

Прикладом легкого ланцюга, що містить Ab2 LCv, є легкий ланцюг, який містить амінокислотну

послідовність, наведену в SEQ ID NO:85.

Прикладом легкого ланцюга, що містить Ab3 LCv, є легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:86.

Прикладом легкого ланцюга, що містить Ab4 LCv, є легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:87.

Прикладом легкого ланцюга, що містить Ab5 LCv, є легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:88.

Прикладом легкого ланцюга, що містить Ab6 LCv, є легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:89.

Прикладом легкого ланцюга, що містить Ab7 LCv, є легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:90.

Прикладом легкого ланцюга, що містить Ab8 LCv, є легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:91.

Прикладом легкого ланцюга, що містить Ab9 LCv, є легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:92.

Прикладом легкого ланцюга, що містить Ab10 LCv, є легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:93.

Прикладом легкого ланцюга, що містить Ab11 LCv, є легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:94.

Прикладом легкого ланцюга, що містить Ab30 LCv, є легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:160.

Прикладом легкого ланцюга, що містить Ab32 LCv, є легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:161.

Прикладом легкого ланцюга, що містить Ab33 LCv, є легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:162.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab1 HCv, є важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:18.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab2 HCv, є важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:19.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab3 HCv, є важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:20.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab4 HCv, є важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:21.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab5 HCv, є важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:22.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab6 HCv, є важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:23.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab7 HCv, є важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:24.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab8 HCv, є важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:25.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab9 HCv, є важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:26.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab10 HCv, є важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:27.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab11 HCv, є важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:28.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab30 HCv, є важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:142.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab32 HCv, є важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:143.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab33 HCv, є важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO:144.

Додаткові приклади передбачених каркасних структур включають: фібрoneктин, неокарциностагин CBM4-2, ліпокаліни, рецептори Т-клітин, домен протеїну-А (протеїн Z), Im9, TPR білки, цинк-пальцеві домени, рVIII, пташиний панкреатичний поліпептид, GCN4, домен WW, домен Src-гомології 3, домени PDZ, TEM1 бета-лактамазу, тіоредоксин, стафілококову нуклеазу, PHD-пальцеві домени, CL-2, BPTI, APPI, HPSTI, екотин, LACI-D1, LDTI, MTI-II, токсини скорпіону, пептид дефензин-А комах, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, цитохром b-562, домени рецептора Ldl, гамма-кристалін, убіквітин, трансферин та/або лектин-подібні домени С-типу. Огляд каркасних структур, які не належать антитілам, а також їх використання як терапевтичних препаратів, наведений у Gebauer and Skerra, Curr. Opin. Chem. Biol., 13:245-255 (2009) та Binz et al., Nat. Biotech., 23(10):1257-1268 (2005), які в повному обсязі включені в цей опис як посилання.

В аспекти реалізації цього винаходу включені антитіла, що містять наступні варіабельні домени: Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO:95/SEQ ID NO:29), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:96/SEQ ID NO:30), Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO:97/SEQ ID NO:31), Ab4 LCv/Ab4 HCv (SEQ ID NO:98/SEQ ID NO:32), Ab5 LCv/Ab5 HCv (SEQ ID NO:99/SEQ ID NO:33), Ab6 LCv/Ab6 HCv (SEQ ID NO:100/SEQ ID NO:34), Ab7 LCv/Ab7 HCv (SEQ ID NO:101/SEQ ID NO:35), Ab8 LCv/Ab8 HCv (SEQ ID NO:102/SEQ ID NO:36), Ab9 LCv/Ab9 HCv (SEQ ID NO:103/SEQ ID NO:37), Ab10 LCv/Ab10 HCv (SEQ ID NO:104/SEQ ID NO:38), Ab11 LCv/Ab11 HCv (SEQ ID NO:105/SEQ ID NO:39), Ab30 LCv/Ab30 HCv (SEQ ID NO:163/SEQ ID NO:145), Ab32 LCv/Ab32 HCv (SEQ ID NO:164/SEQ ID NO:146), Ab33 LCv/Ab33 HCv (SEQ ID NO:165/SEQ ID NO:147) та їх комбінації, а також їх фрагменти, похідні, мутеїни та варіанти.

Приклади антитіл, які є об'єктами цього винаходу, включають Ab1 (SEQ ID NO:84/SEQ ID NO:18), Ab2 (SEQ ID NO:85/SEQ ID NO:19), Ab3 (SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:20), Ab4 (SEQ ID NO:87/SEQ ID NO:21), Ab5 (SEQ ID NO:88/SEQ ID NO:22), Ab6 (SEQ ID NO:89/SEQ ID NO:23), Ab7 (SEQ ID NO:90/SEQ ID NO:24), Ab8 (SEQ ID NO:91/SEQ ID NO:25), Ab9 (SEQ ID NO:92/SEQ ID NO:26), Ab10 (SEQ ID NO:93/SEQ ID NO:27), Ab11 (SEQ ID NO:94/SEQ ID NO:28), Ab30 (SEQ ID NO:160/SEQ ID NO:142), Ab32 (SEQ ID NO:161/SEQ ID NO:143) та Ab33 (SEQ ID NO:162/SEQ ID NO:144).

Зазвичай, кожний варіабельний домен легкого або важкого ланцюга антитіла містить три CDRs. Варіабельний домен важкого ланцюга містить CDR1 важкого ланцюга (HCDR1), CDR2 важкого ланцюга (HCDR2) та CDR3 важкого ланцюга (HCDR3). Варіабельний домен легкого ланцюга містить CDR1 легкого ланцюга (LCDR1), CDR2 легкого ланцюга (LCDR2) та CDR3 легкого ланцюга (LCDR3). В окремих варіантах реалізації винаходу антигензв'язувальний білок містить один або більше CDRs, які знаходяться в межах бажаних варіабельних domenів, які описані в цьому описі.

Приклади CDRs включають, але не обмежуються цим:

CDRs, які належать до Ab1 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:106), LCDR2 (SEQ ID NO:117) та LCDR3 (SEQ ID NO:128);

CDRs, які належать до Ab2 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:107), LCDR2 (SEQ ID NO:118) та LCDR3 (SEQ ID NO:129);

CDRs, які належать до Ab3 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:108), LCDR2 (SEQ ID NO:119) та LCDR3 (SEQ ID NO:130);

CDRs, які належать до Ab4 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:109), LCDR2 (SEQ ID NO:120) та LCDR3 (SEQ ID NO:131);

CDRs, які належать до Ab5 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:110), LCDR2 (SEQ ID NO:121) та LCDR3 (SEQ ID NO:132);

CDRs, які належать до Ab6 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:111), LCDR2 (SEQ ID NO:122) та LCDR3 (SEQ ID NO:133);

CDRs, які належать до Ab7 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:112), LCDR2 (SEQ ID NO:123) та LCDR3 (SEQ ID NO:134);

CDRs, які належать до Ab8 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:113), LCDR2 (SEQ ID NO:124) та LCDR3 (SEQ ID NO:135);

CDRs, які належать до Ab9 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:114), LCDR2 (SEQ ID NO:125) та LCDR3 (SEQ ID NO:136);

CDRs, які належать до Ab10 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:115), LCDR2 (SEQ ID NO:126) та LCDR3 (SEQ ID NO:137);

CDRs, які належать до Ab11 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:116), LCDR2 (SEQ ID NO:127) та LCDR3 (SEQ ID NO:138);

CDRs, які належать до Ab30 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:166), LCDR2 (SEQ ID NO:169) та LCDR3 (SEQ ID NO:172);

CDRs, які належать до Ab32 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:167), LCDR2 (SEQ ID NO:170) та LCDR3 (SEQ ID NO:173);

CDRs, які належать до Ab33 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:168), LCDR2 (SEQ ID NO:171) та LCDR3 (SEQ ID NO:174);

CDRs, які належать до Ab1 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:40), HCDR2 (SEQ ID NO:51) та HCDR3 (SEQ ID NO:62);

CDRs, які належать до Ab2 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:41), HCDR2 (SEQ ID NO:52) та HCDR3 (SEQ ID NO:63);

CDRs, які належать до Ab3 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:42), HCDR2 (SEQ ID NO:53) та HCDR3 (SEQ ID NO:64);

CDRs, які належать до Ab4 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:43), HCDR2 (SEQ ID NO:54) та HCDR3 (SEQ ID NO:65);

CDRs, які належать до Ab5 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:44), HCDR2 (SEQ ID NO:55) та HCDR3 (SEQ ID NO:66);

CDRs, які належать до Ab6 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:45), HCDR2 (SEQ ID NO:56) та HCDR3 (SEQ ID NO:67);

CDRs, які належать до Ab7 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:46), HCDR2 (SEQ ID NO:57) та HCDR3 (SEQ ID NO:68);

CDRs, які належать до Ab8 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:47), HCDR2 (SEQ ID NO:58) та HCDR3 (SEQ ID NO:69);

CDRs, які належать до Ab9 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:48), HCDR2 (SEQ ID NO:59) та HCDR3 (SEQ ID NO:70);

CDRs, які належать до Ab10 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:49), HCDR2 (SEQ ID NO:60) та HCDR3 (SEQ ID NO:71);

CDRs, які належать до Ab11 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:50), HCDR2 (SEQ ID NO:61) та HCDR3 (SEQ ID NO:72);

CDRs, які належать до Ab30 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:148), HCDR2 (SEQ ID NO:151) та HCDR3 (SEQ ID NO:154);

CDRs, які належать до Ab32 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:149), HCDR2 (SEQ ID NO:152) та HCDR3 (SEQ ID NO:155); і

CDRs, які належать до Ab33 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:150), HCDR2 (SEQ ID NO:153) та HCDR3 (SEQ ID NO:156).

В деяких варіантах реалізації антигензв'язуючий білок містить: А) поліпептид, наприклад, легкий ланцюг, який містить LCDR1 з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи, яка складається з SEQ ID NOS:106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167 та 168; LCDR2 з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи, яка складається з SEQ ID NOS:117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170 та 171; та/або LCDR3 з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи, яка складається з SEQ ID NOS:128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173 та 174; та/або В) поліпептид, наприклад, важкий ланцюг, який містить HCDR1 з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи, яка складається з SEQ ID NOS:40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149 та 150; HCDR2 з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи, яка складається з SEQ ID NOS:51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152 та 153; та/або HCDR3 з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи, яка складається з SEQ ID NOS:62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155 та 156.

В додаткових варіантах реалізації антигензв'язуючий білок містить: А) амінокислотну послідовність легкого ланцюга, що містить LCDR1, LCDR2 та LCDR3, які належать до будь-якого з Ab1 LCv, Ab2 LCv, Ab3 LCv, Ab4 LCv, Ab5 LCv, Ab6 LCv, Ab7 LCv, Ab8 LCv, Ab9 LCv, Ab10 LCv, Ab11 LCv, Ab30 LCv, Ab32 LCv та Ab33 LCv, та В) амінокислотну послідовність важкого ланцюга, що містить HCDR1, HCDR2 та HCDR3, які належать до будь-якого з Ab1 HCv, Ab2 HCv, Ab3 HCv, Ab4 HCv, Ab5 HCv, Ab6 HCv, Ab7 HCv, Ab8 HCv, Ab9 HCv, Ab10 HCv, Ab11 HCv, Ab30 HCv, Ab32 HCv та Ab33 HCv.

В певних варіантах реалізації CDRs містять не більше однієї, не більше двох, не більше трьох, не більше чотирьох, не більше п'яти або не більше шести амінокислотних вставок, делецій або замін відносно CDR, наведеного в цьому описі як приклад.

В аспекти реалізації цього винаходу включені антитіла, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NOS:95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 та 165. В аспекти реалізації цього винаходу включені антитіла, що містять варіабельний домен важкого ланцюга, вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NOS:29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 та 147. В додаткові аспекти реалізації цього винаходу включені антитіла, що містять А) варіабельний домен легкого ланцюга, вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NOS:95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 та 165, та В) варіабельний домен важкого ланцюга, вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NOS:29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 та 147.

Антитіла, які є об'єктами цього винаходу, можуть містити будь-яку відому в цій галузі техніки константну область. Константною областю легкого ланцюга може бути, наприклад, константна область легкого ланцюга каппа- або лямбда-типу, наприклад, людська константна область легкого ланцюга каппа- або лямбда-типу. Константною областю важкого ланцюга може бути, наприклад, константна область важкого ланцюга альфа-, дельта-, іпсилон-, гамма- або мю-типу, наприклад, людська константна область важкого ланцюга і альфа-, дельта-, іпсилон-, гамма- або мю-типу. В одному варіанті реалізації константною областю легкого або важкого ланцюга є фрагмент, похідна, варіант або мутант константної області природного походження.

В аспекти реалізації цього винаходу включені антитіла, що містять варіабельну ділянку легкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NOS:95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 та 165, що містить не більше однієї, не більше двох, не більше трьох, не більше чотирьох, не більше п'яти, не більше шести, не більше семи, не більше восьми, не більше дев'яти або не більше десяти амінокислотних вставок, делецій або замін. В аспекти реалізації цього винаходу включені антитіла, що містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NOS:29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 та 147, що містить не більше однієї, не більше двох, не більше трьох, не більше чотирьох, не більше п'яти, не більше

шести, не більше семи, не більше восьми, не більше дев'яти або не більше десяти амінокислотних вставок, делецій або замін. В додаткові аспекти реалізації цього винаходу включені антитіла, що містять А) варіабельну ділянку легкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NOS:95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 та 165, що містить не більше чотири, не більше п'яти, не більше шести, не більше семи, не більше восьми, не більше дев'яти або не більше десяти амінокислотних вставок, делецій або замін, та В) варіабельну ділянку важкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NOS:29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 та 147, що містить не більше чотири, не більше п'яти, не більше шести, не більше семи, не більше восьми, не більше дев'яти або не більше десяти амінокислотних вставок, делецій або замін.

В одному з варіантів реалізації антигензв'язувальний білок містить амінокислотну послідовність, яка є щонайменше на 80%, щонайменше на 81%, щонайменше на 82%, щонайменше на 83%, щонайменше на 84%, щонайменше на 85%, щонайменше на 86%, щонайменше на 87%, щонайменше на 88%, щонайменше на 89%, щонайменше на 90%, щонайменше на 91%, щонайменше на 92%, щонайменше на 93%, щонайменше на 94%, щонайменше на 95%, щонайменше на 96%, щонайменше на 97%, щонайменше на 98% або щонайменше на 99% ідентичною амінокислотній послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NOS:95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 та 165. В іншому варіанті реалізації антигензв'язувальний білок містить амінокислотну послідовність, яка є щонайменше на 80%, щонайменше на 81%, щонайменше на 82%, щонайменше на 83%, щонайменше на 84%, щонайменше на 85%, щонайменше на 86%, щонайменше на 87%, щонайменше на 88%, щонайменше на 89%, щонайменше на 90%, щонайменше на 91%, щонайменше на 92%, щонайменше на 93%, щонайменше на 94%, щонайменше на 95%, щонайменше на 96%, щонайменше на 97%, щонайменше на 98% або щонайменше на 99% ідентичною амінокислотній послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NOS:29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 та 147. У додатковому варіанті реалізації антигензв'язувальний білок містить А) амінокислотну послідовність, яка є щонайменше на 80%, щонайменше на 81%, щонайменше на 82%, щонайменше на 83%, щонайменше на 84%, щонайменше на 85%, щонайменше на 86%, щонайменше на 87%, щонайменше на 88%, щонайменше на 89%, щонайменше на 90%, щонайменше на 91%, щонайменше на 92%, щонайменше на 93%, щонайменше на 94%, щонайменше на 95%, щонайменше на 96%, щонайменше на 97%, щонайменше на 98% або щонайменше на 99% ідентичною амінокислотній послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NOS:95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 та 165, та В) амінокислотну послідовність, яка є щонайменше на 80%, щонайменше на 81%, щонайменше на 82%, щонайменше на 83%, щонайменше на 84%, щонайменше на 85%, щонайменше на 86%, щонайменше на 87%, щонайменше на 88%, щонайменше на 89%, щонайменше на 90%, щонайменше на 91%, щонайменше на 92%, щонайменше на 93%, щонайменше на 94%, щонайменше на 95%, щонайменше на 96%, щонайменше на 97%, щонайменше на 98% або щонайменше на 99% ідентичною амінокислотній послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NOS:29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 і 147.

В окремих варіантах реалізації антигензв'язувальний білок містить CDR3 легкого ланцюга та/або важкого ланцюга. В деяких варіантах реалізації антигензв'язувальний білок містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи послідовностей, наведених в SEQ ID NOS:128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173, 174, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155 та 156. В окремих варіантах реалізації зазначена амінокислотна послідовність містить не більше однієї, не більше двох, не більше трьох, не більше чотири, не більше п'яти або не більше шести амінокислотних вставок, делецій або замін відносно зразкової послідовності, наведеної в SEQ ID NOS:128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173, 174, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155 та 156. Таким чином, варіанти реалізації цього винаходу включають антигензв'язувальний білок, що містить амінокислотну послідовність, яка є щонайменше на 80%, щонайменше на 81%, щонайменше на 82%, щонайменше на 83%, щонайменше на 84%, щонайменше на 85%, щонайменше на 86%, щонайменше на 87%, щонайменше на 88%, щонайменше на 89%, щонайменше на 90%, щонайменше на 91%, щонайменше на 92%, щонайменше на 93%, щонайменше на 94%, щонайменше на 95%, щонайменше на 96%, щонайменше на 97%, щонайменше на 98% або щонайменше на 99% ідентичною амінокислотній послідовності, вибраної з групи послідовностей, наведених в SEQ ID NOS:128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173, 174, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155 та 156.

В окремих варіантах реалізації антигензв'язувальний білок містить CDR2 легкого ланцюга та/або важкого ланцюга. В деяких варіантах реалізації антигензв'язувальний білок містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи послідовностей, наведених в SEQ ID NOS:117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170, 171, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152 та 153. В окремих варіантах реалізації ця амінокислотна послідовність містить не більше

однієї, не більше двох, не більше трьох, не більше чотири, не більше п'яти або не більше шести амінокислотних вставок, делецій або замін відносно зразкової послідовності, наведеної в SEQ ID NOS:117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170, 171, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152 та 153. Таким чином, варіанти реалізації цього винаходу включають антигензв'язувальний білок, що містить амінокислотну послідовність, яка є щонайменше на 80%, щонайменше на 81%, щонайменше на 82%, щонайменше на 83%, щонайменше на 84%, щонайменше на 85%, щонайменше на 86%, щонайменше на 87%, щонайменше на 88%, щонайменше на 89%, щонайменше на 90%, щонайменше на 91%, щонайменше на 92%, щонайменше на 93%, щонайменше на 94%, щонайменше на 95%, щонайменше на 96%, щонайменше на 97%, щонайменше на 98% або щонайменше на 99% ідентичною амінокислотній послідовності, вибраної з групи послідовностей, наведених в SEQ ID NOS:117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170, 171, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152 та 153.

В окремих варіантах реалізації антигензв'язувальний білок містить CDR1 легкого ланцюга та/або важкого ланцюга. В деяких варіантах реалізації антигензв'язувальний білок містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи послідовностей, наведених в SEQ ID NOS:106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167, 168, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149 та 150. В окремих варіантах реалізації ця амінокислотна послідовність містить не більше однієї, не більше двох, не більше трьох, не більше чотири, не більше п'яти або не більше шести амінокислотних вставок, делецій або замін відносно зразкової послідовності, наведеної в SEQ ID NOS:106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167, 168, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149 та 150. Таким чином, варіанти реалізації цього винаходу включають антигензв'язувальний білок, що містить амінокислотну послідовність, яка є щонайменше на 80%, щонайменше на 81%, щонайменше на 82%, щонайменше на 83%, щонайменше на 84%, щонайменше на 85%, щонайменше на 86%, щонайменше на 87%, щонайменше на 88%, щонайменше на 89%, щонайменше на 90%, щонайменше на 91%, щонайменше на 92%, щонайменше на 93%, щонайменше на 94%, щонайменше на 95%, щонайменше на 96%, щонайменше на 97%, щонайменше на 98% або щонайменше на 99% ідентичною амінокислотній послідовності, вибраної з групи послідовностей, наведених в SEQ ID NOS:106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167, 168, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149 та 150.

Антигензв'язувальні білки, які є об'єктами винаходу, містять каркасні структури традиційних антитіл, включаючи людські та моноклональні антитіла, біспецифічні антитіла, діатіла, мінітіла, доменні антитіла, синтетичні антитіла (іноді називають "міметиками антитіл"), химерні антитіла, злиті антитіла (іноді називають "кон'югатами антитіл") та фрагменти кожного з перелічених елементів. Вищеописані CDRs, включаючи різні комбінації CDRs, можуть бути прицеплені до будь-якої з наступних каркасних структур.

Термін "антитіло", який вживається в цьому описі, стосується різних форм мономерних або мультимерних білків, що містять один або більше поліпептидних ланцюгів, які специфічно зв'язуються з антигеном відповідно до наведених в описі описів. В окремих варіантах реалізації антитіла отримують за допомогою рекомбінатних ДНК-технологій. В додаткових варіантах реалізації антитіла отримують за допомогою ферментативного або хімічного розщеплення антитіл природного походження. В іншому аспекті реалізації антитіло вибране з групи, яка складається з: a) людського антитіла; b) гуманізованого антитіла; c) химерного антитіла; d) моноклонального антитіла; e) поліклонального антитіла; f) рекомбінантного антитіла; g) антигензв'язувального фрагмента; h) одноланцюгового антитіла; i) діатіла; j) триатіла, k) тетратіла, l) фрагмента Fab; m) фрагмента F(ab')₂, n) антитіла IgA, o) антитіла IgD, p) антитіла IgE, q) антитіла IgG1, r) антитіла IgG2, s) антитіла IgG3, t) антитіла IgG4 та u) антитіла IgM.

Варіабельна ділянка або домен містить щонайменше три CDRs важкого або легкого ланцюгів, розміщених в межах каркасної області (каркасні області позначають як FR1, FR2, FR3 та FR4). Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD. Структурні одиниці традиційного антитіла, зазвичай, містять тетрамер. Кожний тетрамер зазвичай складається з двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, при чому кожна пара містить один "легкий" та один "важкий" ланцюг. Аміно-термінальна частина кожного ланцюга містить варіабельну ділянку довжиною від близько 100 до 110 або більше амінокислот, яка відповідає головним чином за впізнання антигену. Карбокси-термінальна частина кожного ланцюга визначає константну область, яка відповідає головним чином за ефекторну функцію. Людські легкі ланцюги класифікують як каппа або лямбда легкі ланцюги. Важкі ланцюги класифікують як мю, дельта, гамма, альфа або іпсилон, та саме вони визначають ізотип антитіла, відповідно як IgM, IgD, IgG, IgA та IgE. IgG має декілька підкласів, включаючи, але не обмежуючись цим, IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4. IgM має підкласи, включаючи, але не обмежуючись цим, IgM1 та IgM2. Варіанти реалізації винаходу включають всі подібні класи та підкласи антитіл, які містять варіабельний домен або CDR антигензв'язувальних білків, як описано в цьому описі.

Деякі антитіла природного походження, такі, що виявляють у верблюдів та лам, являють собою димери, які складаються з двох важких ланцюгів та не містять легкі ланцюги. В цей винахід

включені димерні антитіла, які складаються з двох важких ланцюгів, або їх фрагменти, які можуть зв'язуватися з ST2.

Зазвичай, варіабельні ділянки важкого та легкого ланцюгів мають однакову загальну структуру консервативних каркасних областей (FR), які з'єднані трьома гіперваріабельними ділянками, тобто такими, що визначають комплементарність ділянками або CDRs. CDRs головним чином відповідають за впізнання та зв'язування антигену. CDRs з двох ланцюгів кожної пари сполучаються за допомогою каркасних областей, що забезпечує можливість зв'язування зі специфічним епітопом. Від N-кінця до C-кінця та легкий та важкий ланцюги містять домени FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 та FR4. Віднесення амінокислот до кожного з доменів проводять відповідно до визначень Кабата.

CDRs визначають основні поверхневі точки контакту для зв'язування антигену. CDR3 легкого ланцюга та, особливо, CDR3 важкого ланцюга визначають найбільш важливі детермінанти для зв'язування антигену в межах варіабельних ділянок легкого та важкого ланцюгів. Для деяких антитіл CDR3 важкого ланцюга може визначати основну область контакту між антигеном та антитілом. Схеми *in vitro* відбору, в яких варіюється тільки CDR3, можна використовувати для змінення зв'язувальних властивостей антитіла або для визначення, які залишки є важливими для зв'язування антигену.

Зазвичай, антитіла природного походження містять сигнальну послідовність, яка сприяє участі антитіла в клітинному шляху, пов'язаному з секрецією білка, та яка звичайно не є присутньою в зрілому антитілі. Полінуклеотид, який кодує антитіло, що є об'єктом винаходу, може кодувати сигнальну послідовність природного походження або гетерологічну сигнальну послідовність як описується нижче.

В одному варіанті реалізації антигензв'язувальний білок являє собою антитіло, що містить від одного до шести CDRs з прикладів, які описані в цьому описі. Антитіла, які є об'єктами винаходу, можуть належати до будь-якого типу, включаючи антитіла IgM, IgG (включаючи IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgD, IgA або IgE. В конкретному варіанті реалізації антигензв'язувальний білок являє собою антитіло типу IgG, наприклад, антитіло IgG1.

В деяких варіантах реалізації, наприклад, коли антигензв'язувальний білок являє собою антитіло з повнорозмірними важким та легким ланцюгами, всі CDRs належать до одного виду, наприклад, людині. В іншому варіанті, наприклад, у варіантах реалізації, в яких антигензв'язувальний білок містить менше шести CDRs з наведених вище послідовностей, додаткові CDRs можуть належати як до інших видів, так і бути CDRs людини, які відрізняються від тих, які наведені в зразкових послідовностях. Наприклад, ділянки HCDR3 та LCDR3 з визначених в цьому описі відповідних послідовностей можна використовувати разом з HCDR1, HCDR2, LCDR1 та LCDR2, додатково вибраними з таких, що належать до інших видів або людських послідовностей антитіл, які відрізняються, або їх комбінацій. Наприклад, CDRs, які є об'єктами винаходу, можна заміщати ділянки CDR химерних або гуманізованих антитіл, що мають комерційну цінність.

В конкретних варіантах реалізації використовують каркасні компоненти антигензв'язувальних білків, які є компонентами людського походження. При цьому в деяких варіантах реалізації каркасні компоненти можуть являти собою суміш компонентів від різних видів. В такому випадку, якщо антигензв'язувальний білок являє собою антитіло, таке антитіло може бути химерним антитілом та/або гуманізованим антитілом. В загальному випадку, як "химерні антитіла", так і "гуманізовані антитіла" належать до антитіл, в яких об'єднані ділянки, що належать до більше ніж одного виду. Наприклад, "химерні антитіла" зазвичай містять варіабельну ділянку(ки), що належить миші (або, в деяких випадках, щуру), та константну область(і), що належать людині.

"Гуманізовані антитіла", зазвичай, належать до антитіл нелюдського походження, в яких каркасні області варіабельного домену були замінені послідовностями з антитіл людини. В загальному випадку гуманізованого антитіла все антитіло, за винятком одного або більше CDRs, кодується полінуклеотидом людського походження або є ідентичним такому антитілу, за винятком одного або більше CDRs. CDRs, деякі або всі з яких кодується нуклеїновими кислотами, які належать організму нелюдського походження, прищеплюють в каркас складчастого бета-шару варіабельної ділянки людського антитіла, щоб отримати антитіло, специфічність якого визначається прищепленими CDRs. Отримання подібних антитіл описане, наприклад, в WO 92/11018, Jones 1986, Nature 321:522-525, Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-1536. Також гуманізовані антитіла можна отримати, використовуючи мишей з імунною системою, яка є генетично сконструйована. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. В зразкових варіантах реалізації, які описані в цьому описі, ідентифіковані CDRs є людськими, та, отже, в цьому контексті як гуманізовані, так і химерні антитіла містять деяку кількість CDRs нелюдського походження; наприклад, можуть бути отримані гуманізовані антитіла, що містять ділянки HCDR3 та LCDR3, при цьому один або більше інших ділянок CDRs належать до іншого виду.

В одному варіанті реалізації ST2-антигензв'язувальний білок являє собою мультиспецифічне антитіло та, зокрема, біспецифічне антитіло, яке іноді також називають "діатілом". Це такі антитіла,

які зв'язуються з двома або більше різними антигенами або різними епітопами на одному антигені. В окремих варіантах реалізації біспецифічне антитіло зв'язує ST2 та антиген на людській ефекторній клітині (наприклад, Т-клітині). Такі антитіла корисні за націлювання на відповідь ефекторних клітин проти експресуючих ST2 клітин, таких як експресуючі ST2 пухлинні клітини. В переважних варіантах реалізації людським антигеном ефекторної клітини є CD3. Патент США № 7,235,641. Способи отримання специфічних антитіл відомі в цій галузі техніки. Один з таких способів включає конструювання Fc-фрагмента важких ланцюгів таким чином, щоб створити "випуклості" та "западини", які сприяють утворенню гетеродимерів з важких ланцюгів за їх сумісної експресії в клітині. США 7,695,963. Інший спосіб також включає конструювання Fc-фрагмента важкого ланцюга, але при цьому використовує електростатичну взаємодію для стимуляції утворення гетеродимерів, в той же час, пригнічуючи утворення гомодимерів важких ланцюгів за їх сумісної експресії в клітині. WO 09/089,004, яка в повному обсязі включена в цей документ як посилання.

В одному варіанті реалізації ST2-антигензв'язувальний білок являє собою мінітіло. Мінітіла є мінімізованими антитіло-подібними білками, що містять scFv, який з'єднаний з доменом CH3. Hu et al., 1996, *Cancer Res.* 56:3055-3061.

В одному варіанті реалізації ST2-антигензв'язувальний білок являє собою доменне антитіло; дивіться, наприклад, патент США № 6,248,516. Доменні антитіла (dAbs) являють собою функціональні зв'язувальні домени антитіл, які відповідають варіабельним ділянкам важкого (VH) або легкого (VL) ланцюга людських антитіл. dAbs мають молекулярну масу приблизно в 13 кДа або менше однієї десятої від маси повнорозмірного антитіла. dAbs добре експресуються в великій кількості організмів-хазяїнів, включаючи клітинні системи бактерій, дріжджів та ссавців. До того ж, dAbs є високостабільними та зберігають активність навіть в жостких умовах, таких як за ліофілізації або теплової денатурації. Дивіться, наприклад, патенти США 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; заявку на патент США № 2004/0110941; Європейський патент 0368684; патент США 6,696,245, WO04/058821, WO04/003019 та WO03/002609.

В одному варіанті реалізації ST2-антигензв'язувальний білок являє собою фрагмент антитіла, який є фрагментом будь-якого з наведених в цьому описі антитіл, який зберігає специфічність зв'язування з ST2. В різних варіантах реалізації антигензв'язувальні білки містять без обмежень фрагменти F(ab), F(ab)', F(ab')₂, Fv або однокланцюгового Fv. Як мінімум, антитіло, відповідно до цього опису, містить поліпептид, який може специфічно зв'язуватись з ST2, що містить повністю або частково варіабельний домен легкого або важкого ланцюга, наприклад, один або більше CDRs.

Додаткові приклади фрагментів ST2-зв'язувального антитіла включають, але не обмежуються цим, (i) фрагмент Fab, що складається з доменів VL, VH, CL та CH1, (ii) фрагмент Fd, що складається з доменів VH та CH1, (iii) фрагмент Fv, що складається з VL та VH доменів одного антитіла; (iv) фрагмент dAb (Ward et al., 1989, *Nature* 341:544-546), що складається з одиничного варіабельного домену, (v) виділені ділянки CDR, (vi) фрагмент F(ab')₂ – бівалентний фрагмент, що містить два зв'язані фрагменти Fab, (vii) однокланцюгові молекули Fv (scFv), в яких домен VH та домен VL з'єднані пептидним лінкером, який робить можливою асоціацію двох доменів для утворення антигензв'язувальної ділянки (Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426, Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883), (viii) біспецифічні однокланцюгові димери Fv (PCT/US92/09965) та (ix) "діатіла" або "триатіла" – мультівалентні або мультиспецифічні фрагменти, сконструйовані шляхом генного злиття (Tomlinson et al., 2000, *Methods Enzymol.* 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448). Фрагменти антитіл можна модифікувати. Наприклад, молекули можна стабілізувати шляхом впровадження дисульфідних містиків, які з'єднують домени VH та VL (Reiter et al., 1996, *Nature Biotech.* 14:1239-1245). Аспекти цього винаходу включають ті варіанти реалізації, в яких компоненти цих фрагментів, що не належать до CDR, є людськими послідовностями.

В одному варіанті реалізації ST2-антигензв'язувальний білок являє собою повністю людське антитіло. В цьому варіанті реалізації, як зазначено вище, окремі структури містять повнорозмірні важкий та легкий ланцюги, які містять CDR ділянки. В додаткових варіантах реалізації використовують один або більше CDRs, які є об'єктами винаходу, спільно з іншими CDRs, каркасними областями, J та D ділянками, константними областями та так далі, що отримані з інших людських антитіл. Наприклад, CDRs, які є об'єктами винаходу, можна заміщувати CDRs будь-якою кількістю людських антитіл, зокрема антитіл, що мають комерційну цінність.

Однокланцюгові антитіла можуть утворюватись за з'єднання фрагментів варіабельного домену (Fv ділянка) важкого та легкого ланцюга за допомогою амінокислотного містка (короткого пептидного лінкеру), що призводить до утворення одиничного поліпептидного ланцюга. Такі однокланцюгові Fvs (scFvs) отримували за допомогою внесення ДНК, яка кодує пептидний лінкер, між ДНК, які кодують два поліпептиди варіабельного домену (V_L та V_H). Отримані в результаті поліпептиди можуть кон'югувати самі з собою, утворюючи антигензв'язувальні мономери, або вони можуть утворювати мультимери (наприклад, димери, тримери або тетрамери) залежно від довжини гнучкого лінкеру між двома варіабельними доменами (Kortt et al., 1997, *Prot. Eng.* 10:423; Kortt et al.,

2001, *Biomol. Eng.* 18:95-108). Комбінуючи різні поліпептиди, що містять V_L та V_H , можна отримувати мультимерні scFvs, які зв'язуються з різними епітопами (Kriangkum et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18:31-40). Методи, розроблені для отримання одноланцюгових антитіл, включають ті, що описані в патенте США № 4,946,778; Bird, 1988, *Science* 242:423; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879; Ward et al., 1989, *Nature* 334:544, de Graaf et al., 2002, *Methods Mol Biol.* 178:379-87. В цей винахід включені одноланцюгові антитіла, отримані із запропонованих в цьому описі антитіл (включаючи, але не обмежуючись scFvs, що містять такі комбінації варіабельних доменів: Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO:95/SEQ ID NO:29), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:96/SEQ ID NO:30), Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO:97/SEQ ID NO:31), Ab4 LCv/Ab4 HCv (SEQ ID NO:98/SEQ ID NO:32), Ab5 LCv/Ab5 HCv (SEQ ID NO:99/SEQ ID NO:33), Ab6 LCv/Ab6 HCv (SEQ ID NO:100/SEQ ID NO:34), Ab7 LCv/Ab7 HCv (SEQ ID NO:101/SEQ ID NO:35), Ab8 LCv/Ab8 HCv (SEQ ID NO:102/SEQ ID NO:36), Ab9 LCv/Ab9 HCv (SEQ ID NO:103/SEQ ID NO:37), Ab10 LCv/Ab10 HCv (SEQ ID NO:104/SEQ ID NO:38), і Ab11 LCv/Ab11 HCv (SEQ ID NO:105/SEQ ID NO:39), Ab30 LCv/Ab30 HCv (SEQ ID NO:163/SEQ ID NO:145), Ab32 LCv/Ab32 HCv (SEQ ID NO:164/SEQ ID NO:146), Ab33 LCv/Ab33 HCv (SEQ ID NO:165/SEQ ID NO:147)), та їх комбінації.

В одному варіанті реалізації ST2-антигензв'язувальний білок являє собою злитий білок антитіла (який іноді називають в цьому описі "кон'югатом антитіла"). Другий учасник кон'югації може мати білкову або небілкову природу; в загальному випадку останній отримують, використовуючи функціональні групи на антигензв'язувальному білку та на другому учасникові кон'югації. В окремих варіантах реалізації антитіло кон'югують з хімічною (лікарською) речовиною небілкової природи для отримання кон'югату з антитіла та лікарської речовини.

В одному варіанті реалізації ST2-антигензв'язувальний білок являє собою аналог антитіла, який іноді називають "синтетичним антитілом". Наприклад, в багатьох роботах використовують як альтернативні білкові каркаси, так і штучні каркаси з прищепленими CDRs. Такі каркаси включають, але не обмежуються цим, мутації, введені для стабілізації тримірної структури зв'язувального білка, а також повністю синтетичні каркаси, які складаються, наприклад, з біосумісних полімерів. Дивіться, наприклад, Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Volume 53, Issue 1:121-129. Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. До того ж, можна використовувати пептидні міметики антитіл ("PAMs"), а також роботу на основі міметиків антитіл, в якій компоненти фібрoneктину використовуються в якості каркасів.

Під час вживання в цьому описі під "білком" мається на увазі щонайменше дві ковалентно зв'язані амінокислоти, а сам термін включає в себе білки, поліпептиди, олігопептиди та пептиди. В деяких варіантах реалізації дві або більше ковалентно зв'язані амінокислоти з'єднані за допомогою пептидного зв'язку. Білок може складатися з амінокислот природного походження та пептидних зв'язків, наприклад, у випадку, коли білок отриманий рекомбінантним методом з використанням експресійних систем та клітин-хазяїнів, як описано нижче. В іншому варіанті реалізації білок може містити синтетичні амінокислоти (наприклад, гомофенілаланін, цитрулін, орнітин та норлейцин) або пептидоміметичні структури, тобто, "пептидні або білкові аналоги", такі як пептоїди (дивіться Simon et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:9367, яка включена в цей опис як посилання), які можуть бути стійкими до протеазів або в інших фізіологічних умовах та/або в умовах зберігання. Такі синтетичні амінокислоти можна вносити, зокрема, коли антигензв'язувальний білок синтезують *in vitro* за допомогою стандартних методів, добре відомих в цій галузі техніки. До того ж, можна використовувати будь-яку комбінацію з пептидоміметика та синтетичних і природних залишків/структур. Термін "амінокислота" також включає амінокислотні залишки, такі як пролін та гідроксипролін. "R-група" або "бічний ланцюг" амінокислоти може мати як (L)-, так і (S)-конфігурацію. В конкретному варіанті реалізації амінокислоти знаходяться в (L)- або (S)-конфігурації.

В окремих аспектах реалізації винаходу запропоновані рекомбінантні антигензв'язувальні білки, які зв'язують ST2 та, в деяких варіантах реалізації, рекомбінантний ST2 людини або його частину. В цьому контексті "рекомбінантним білком" називається білок, який отримують за допомогою рекомбінантних технологій з використанням будь-яких відомих в цій галузі техніки способів та методів, тобто, за допомогою експресії рекомбінантної нуклеїнової кислоти, як описано в цьому описі. Способи та методи отримання рекомбінантних білків добре відомі в цій галузі техніки. Варіанти реалізації винаходу включають рекомбінантні антигензв'язувальні білки, які зв'язують ST2 дикого типу та його варіанти.

"Який складається переважно з" означає, що амінокислотна послідовність може змінюватись в межах близько 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15% відносно перерахованих як SEQ ID NO: послідовностей та при цьому зберігає біологічну активність, як описано в цьому описі.

В деяких варіантах реалізації антигензв'язувальні білки, які є об'єктами винаходу, є виділеними білками або в значній мірі очищеними білками. "Виділений білок" не містить щонайменше деякі речовини, з якими він зазвичай пов'язаний в своєму природному стані, наприклад, в заданому зразку він становить щонайменше 5% або щонайменше 50% за масою від загального білка. Зрозуміло, що виділений білок може становити від 5 до 99,9% за масою від загального вмісту білка

залежно від обставин. Наприклад, білок може бути отриманий за значно вищої концентрації шляхом використання індукцйбельного промотору або промотору високого рівня експресії, при цьому отримують підвищений рівень концентрації білка. Це визначення включає в себе вироблення антигензв'язувального білка у великій кількості організмів та/або клітин-хазяїнів, які відомі в цій галузі техніки.

У випадку амінокислотних послідовностей ідентичність та/або подібність послідовностей визначають, використовуючи стандартні відомі в цій галузі методи, включаючи, але не обмежуючись цим, алгоритм локальної ідентичності послідовностей Сміта та Ватермана, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482, алгоритм вирівнювання послідовностей Нідлмана та Вунша, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443, метод пошуку подібності Пірсона та Ліпмана, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, комп'ютеризовані реалізації цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA та TFASTA, які входять до Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), програму для вирівнювання послідовностей Best Fit, яка описана Devereux et al., 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395, переважно використовуючи налаштування за замовчуванням або за допомогою підбору. Перважно відсоток ідентичності розраховується за допомогою FastDB на підставі наступних параметрів: штраф за порушення комплементарності – 1; штраф за наявність гепу – 1; штраф за розмір гепу – 0,33; та штраф за з'єднання – 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Прикладом алгоритму, що підходить, є PILEUP. PILEUP дозволяє проводити численне вирівнювання послідовностей з групи споріднених послідовностей, використовуючи прогресивне попарне вирівнювання. Також в ньому є функція побудови дерева, яке показує кластерні взаємозв'язки, які використовуються для створення вирівнювання. У PILEUP використовується спрощений метод прогресивного вирівнювання Фенга та Дулітла, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360; цей метод схожий з тим, який був описаний Хігінсом та Шарпом, 1989, *CABIOS* 5:151-153. Параметри PILEUP, що підходять, включають вагу гепу за замовчуванням 3,00, вагу довжини гепу за замовчуванням 0,10 та зважені кінцеві гепи.

Іншим прикладом алгоритму, що підходить, є алгоритм BLAST, який описаний у: Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; та Karin et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787. Програмою BLAST, яка особливо підходить, є програма WU-BLAST-2, яка була створена за Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480. WU-BLAST-2 використовує декілька пошукових параметрів, значення більшості з яких встановлені за замовчуванням. Для підгінних параметрів встановлюють наступні значення: інтервал перекриття=1, частка перекриттів=0,125, граничні розміри ділянки (T)=11. Параметри HSP S та HSP S2 є динамічними величинами та встановлюються програмою залежно від змісту конкретної послідовності та змісту конкретної бази даних, відносно яких проводиться пошук послідовності, яка цікавить; при цьому значення можуть бути підібрані так, щоб збільшити чутливість.

Додатковим алгоритмом, що підходить, є BLAST з генами, який описаний Altschul et al., 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402. BLAST з генами використовує показники заміни BLOSUM-62; пороговий параметр T, який встановлений на 9; метод двох збігів для запуску продовжень без гепів, витрати за довжини гепу k, які складають $10+k$; величину X_u , яка встановлена на 16, та величину X_g , яка встановлена на 40 на етапі пошуку по базі даних та на 67 на вихідному етапі алгоритмів. Вирівнювання з генами запускається за показника, який відповідає приблизно 22 біт.

В загальному випадку амінокислотна гомологія, подібність або ідентичність між окремими варіантами CDRs та наведеними в цьому описі послідовностями становить щонайменше 80%, та, частіше, має ступінь гомології або ідентичності, яка переважно збільшується та становить щонайменше 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% та практично 100%. Аналогічно "відсоток (%) ідентичності нуклеотидних послідовностей" відносно визначених в цьому описі нуклеотидних послідовностей визначається як відсотковий вміст нуклеотидних залишків в кандидатній послідовності, які є ідентичними нуклеотидним залишкам послідовності антигензв'язувального білка, яка кодує. В конкретному методі використовується BLASTN модуль WU-BLAST-2 зі встановленими за замовчуванням параметрами з інтервалом перекриття та часткою перекриття, які становлять відповідно 1 та 0,125.

В загальному випадку гомологія, подібність або ідентичність між нуклеотидними послідовностями, що кодують індивідуальні варіантні CDRs, та наведеними в цьому описі нуклеотидними послідовностями становить щонайменше 80%, та, частіше, має ступінь гомології або ідентичності, яка переважно збільшується та становить щонайменше 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% та практично 100%.

Таким чином, "варіантним CDR" є ділянка, яка має визначену гомологію, подібність або ідентичність батьківському CDR, який є об'єктом винаходу, та характеризується біологічною дією, яка складає, без обмежень щонайменше 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% від специфічності та/або активності батьківського CDR.

У випадку, якщо ділянка або область впровадження варіації амінокислотної послідовності є обумовленою, немає необхідності в обумовленні самої мутації. Наприклад, з метою оптимізації введення мутації на заданій ділянці можна провести випадковий мутагенез в цільовому кодоні або області та провести скринінг експресуючих варіантів CDR антигензв'язувальних білків, щоб обрати оптимальну комбінацію необхідної активності. Методи введення мутації заміщення в обумовлені ділянки ДНК з відомою послідовністю добре відомі, наприклад, це мутагенез з використанням праймерів M13 та мутагенез з використанням ПЛР. Скринінг мутантів проводять за допомогою аналізу антигензв'язувальної активності білка, наприклад, зв'язування ST2.

Амінокислотні заміни зазвичай складаються з одиничних залишків; інсерції зазвичай складають від близько одного (1) до близько двадцяти (20) амінокислотних залишків, хоча припустимі й значно більші за розміром інсерції. Діапазон делецій становить від близько одного (1) до близько двадцяти (20) амінокислотних залишків, хоча в деяких випадках делеції можуть бути й більшими.

Заміни, делеції, інсерції або будь-які їх комбнації можна використовувати для отримання кінцевої похідної або варіанта. В загальному випадку такі зміни проводять для декількох амінокислот, щоб мінімізувати зміни молекули, зокрема, імуногенність та специфічність антигензв'язувального білка. Проте за певних обставин припустимі й більш значні зміни. Консервативні заміни проводять в загальному випадку згідно з наступною схемою, наведеною у вигляді Таблиці 3.

Таблиця 3

Вихідний залишок	Приклади замін
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Значні зміни функціональності або імунологічної ідентичності здійснюють, вибираючи заміни, менш консервативні, ніж заміни, наведені в Таблиці 3. Наприклад, можна проводити заміни, які помітно впливають на: структуру поліпептидного скелету в області зміни, наприклад, структуру альфа-спіралі або бета-складчастого шару; заряд або гідрофобність молекули на ділянці-мішені; або на розмір бічного ланцюга. Замінами, для яких в загальному випадку передбачається, що вони призводять до найбільших змін у властивостях поліпептидів, є такі заміни, в яких: (а) гідрофільний залишок, наприклад, серил або треоніл, замінений на гідрофобний залишок, наприклад, лейцил, ізолейцил, фенілаланін, валіл або аланіл; (б) цистеїн або пролін замінений на будь-який інший залишок; (с) залишок, що містить електропозитивний бічний ланцюг, наприклад, лізил, аргиніл або гістидил, замінений на електронегативний залишок, наприклад, глутаміл або аспартил; або (d) залишок, що містить об'ємний бічний ланцюг, наприклад, фенілаланін, замінений на залишок, який не має бічного ланцюга, наприклад, гліцин.

Зазвичай варіанти проявляють таку ж якісну біологічну активність та викликають таку ж імунну відповідь, як аналог природного походження, хоча за необхідності вибирають також варіант для того, щоб модифікувати характеристики антигензв'язувальних білків. Або ж, варіант можна сконструювати таким чином, щоб змінити біологічну активність антигензв'язувального білка. Наприклад, можна змінити або видалити сайт глікозилювання, як обговорюється в цьому описі.

Інші похідні антитіл до ST2, які входять в об'єм цього винаходу, включають ковалентні або агрегаційні кон'югати антитіл до ST2 або їх фрагментів з іншими білками або поліпептидами,

отримані, наприклад, за експресії рекомбінантних злитих білків, що містять гетерологічні поліпептиди, зшиті з N-кінцем або C-кінцем поліпептиду антитіла до ST2. Наприклад, кон'югований пептид може бути гетерологічним сигнальним (або лідерним) поліпептидом, наприклад, альфа-фактором лідером дріжджів, або пептидом, таким як епітопна мітка. Злиті білки, що містять антитіло до ST2, можуть містити пептиди, які додані для того, щоб сприяти очищенню або ідентифікації антитіла до ST2 (наприклад, полі-His). Поліпептид антитіла до ST2 також може битбути з'єднаний з пептидом FLAG, як описано у Hopp et al., *Bio/Technology* 6:1204, 1988, та в патенте США 5,011,912. Пептид FLAG є високоантигенним та забезпечує наявність епітопу, обортно зв'язаного специфічним моноклональним антитілом (mAb), створюючи можливість швидкого аналізу та легкого очищення рекомбінантного білка, що експресується. Реагенти, які підходять для виготовлення злитих білків, в яких пептид FLAG зшитий із заданим поліпептидом, є комерційно доступними (Sigma, Сент-Луїс, Міссурі).

В одному варіанті реалізації отримують олігомер, використовуючи поліпептид, виділений з імуноглобулінів. Отримання злитих білків, що містять визначені гетерологічні поліпептиди, зшиті з різними фрагментами поліпептидів, виділених з антитіл, (включаючи Fc-домен), було описано, наприклад, Ashkenazi et al., 1991, *PNAS USA* 88:10535; Byrn et al., 1990, *Nature* 344:677; та Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", в *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, сторінки 10.19.1 - 10.19.11.

Один варіант реалізації цього винаходу стосується димерів, що містять злиті білки, отриманні шляхом злиття ST2-зв'язувального фрагмента антитіла до ST2 з Fc-областю антитіла. Димер можна отримати, наприклад, шляхом вставки гібридного гену, який кодує злитий білок, в вектор експресії, що підходить, експресії гібридного гену в клітинах-хазяїнах, трансформованих за допомогою рекомбінантного вектору експресії, та забезпечуючи можливості збирання злитого білка, що експресується, на зразок молекул антитіл, внаслідок чого між Fc-елементами утворюються міжланцюгові дисульфідні зв'язки, що призводить до утворення димеру.

Термін "Fc-поліпептид", що вживається в цьому описі, включає нативні та мутейнові форми поліпептидів, які виділені з Fc-області антитіла. Також включені процесовані форми таких поліпептидів, що містять шарнірну ділянку, яка стимулює димеризацію. Злиті білки, що містять Fc-елементи (та утворені ними олігомери) мають перевагу, яка складає легкість очищення за допомогою афінної хроматографії на колонках з протеїном A або протеїном G.

Одним з Fc-поліпептидів, що підходить, описаний в заявці відповідно до PCT WO 93/10151 (яка включена в цей опис як посилання), є одноланцюговий поліпептид, що розташовується від N-кінцевої шарнірної ділянки до нативного C-кінця Fc-області людського антитіла IgG. Іншим Fc-поліпептидом, що підходить, є Fc-мутейн, описаний в патенті США 5,457,035 та у Baum et al., 1994, *EMBO J.* 13:3992-4001. Амінокислотна послідовність цього мутейну є ідентичною нативній послідовності Fc, наведеної в WO 93/10151, за винятком того, що проведена заміна амінокислоти 19 з Leu на Ala, амінокислоти 20 з Leu на Glu та амінокислоти 22 з Gly на Ala. Цей мутейн демонструє знижену афінність до рецепторів Fc.

В інших варіантах реалізації варіабельний фрагмент важкого та/або легкого ланцюга антитіла до ST2 можна замінити варіабельним фрагментом важкого та/або легкого ланцюга іншого антитіла.

Інший спосіб отримання олігомерних похідних антитіла до ST2 включає використання лейцинової блискавки. Домени лейцинової блискавки являють собою пептиди, які стимулюють олігомеризацію білків, в яких вони знаходяться. Спочатку лейцинові блискавки були виявлені в декільках ДНК-зв'язувальних білках (Landschulz et al., 1988, *Science* 240:1759) та з того часу були знайдені у великій кількості різних білків. Сеед відомих лейцинових блискавок присутні пептиди природного походження та їх похідні, які димеризуються або тримеризуються. Приклади доменів лейцинових блискавок, які підходять для отримання розчинних олігомерних білків, описані в заявці відповідно до PCT WO 94/10308, а лейцинова блискавка, виділена з поверхнево-активного протеїну D (SPD) легонів, описана у Hoppe et al., 1994, *FEBS Letters* 344:191, обидві роботи включені в цей опис як посилання. Застосування модифікованої лейцинової блискавки, яка забезпечує стабільну тримеризацію зшитого з нею гетерологічного білка, описано у Fanslow et al., 1994, *Semin. Immunol.* 6:267-78. В одному з підходів рекомбінантні злиті білки, що містять фрагмент або похідну антитіла до ST2, зшиті з пептидом лейцинової блискавки, експресуються в клітинах-хазяїнах, що підходять, а розчинні олігомерні фрагменти або похідні антитіла до ST2, які утворюються, виділяють із супернатанту літінної культури.

Ковалентні модифікації антигензв'язувальних білків також включені в об'єм цього винаходу, та, зазвичай, але не завжди, здійснюються посттрансляційно. Наприклад, деякі види ковалентних модифікацій антигензв'язувального білка вносять в молекулу шляхом проведення реакції між певними амінокислотними залишками антигензв'язувального білка та органічною дериватизуючою речовиною, яка здатна реагувати з вибраними бічними ланцюгами або N- або C-кінцевими залишками.

Найчастіше проводять реакцію між залишками цистенілу та α -галоацетатами (та відповідними амінами), такими як хлороцтова кислота або хлорацетамід, для отримання похідних

карбоксиметилу або карбоксиамідометилу. Також залишки цистенілу дериватизують за допомогою проведення реакції з бромтрифторацетоном, α -бром- β -(5-імідозол)пропіоною кислотою, хлорацетилфосфатом, N-алкілмалеїдами, 3-нітро-2-піридилдисульфідом, метил-2-піридилдисульфідом, п-хлормеркурбензоатом, 2-хлормеркур-4-нітрофенолом або хлор-7-нітробензо-2-окса-1,3-діазолом.

Залишки гістидилу дериватизують за допомогою реакції з діетилпірокарбонатом за pH 5,5-7,0, оскільки цей агент є відносно специфічним до бічного ланцюга гістидилу. Також застосовують парабромфенацилбромід; реакцію проводять переважно у 0,1 М какодилаті натрію за pH 6,0.

Для залишків лізину та амінокінцевих залишків проводять реакцію з ангідридами бурштинової або іншої карбонової кислоти. Дериватизація ціма речовинами призводить до зміни полярності лізинових залишків. Інші реагенти, що підходять для дериватизації альфа-аміновмісних залишків, включають імідоефіри, такі як метилпіколінімідат; піридоксальфосфат; піридоксаль; хлорборгідрид; тринітробензенсульфонову кислоту; O-метилізосечовину; 2,4-пентандіон; та реакцію з гліоксилатом, яка каталізується трансаміназою.

Залишки аргінілу модифікують за допомогою реакції з одним або декількома загальприйнятими реагентами, серед яких фенілгліоксаль, 2,3-бутандіон, 1,2-циклогександіон та нінгідрин. Дериватизація залишків аргініну потребує, щоб реакція проводилась в лужних умовах внаслідок високого значення pK_a функціональної групи гуанідину. Крім того, ці реагенти можуть вступати в реакцію з групами лізину, а також з іпсилон-аміногрупою аргініну.

Можна проводити певні модифікації залишків тирозилу з акцентом на внесення спектральних міток до залишків тирозилу за допомогою проведення реакції з ароматичними сполуками діазонію або тетранітрометану. Найчастіше для утворення молекул O-ацетилтирозилу та 3-нітропохідних використовують, відповідно, N-ацетилімідизол та тетранітрометан. Залишки тирозилу йодують за допомогою ^{125}I або ^{131}I для приготування мічених білків для вживання в радіоімунологічному аналізі, при чому підходить вищеописаний спосіб з використанням хлораміну T.

Карбоксильні бічні групи (аспартил або глутаміл) вибірково модифікують за допомогою реакції з карбодіімідами ($R-N=C=N-R'$), де R та R' опційно є різними алкільними групами, такими як 1-циклогексил-3-(2-морфолініл-4-етил) карбодіімід або 1-етил-3-(4-азоніа-4,4-диметилпентил) карбодіімід. Крім того, залишки аспартилу та глутамілу перетворюють на залишки аспарагінілу та глутамінілу за допомогою реакції з іонами амонію.

Дериватизація з біфункціональними речовинами підходить для перехресного зшивання антигензв'язувальних білків з водонерозчинною матрицею підкладки або поверхнею для застосування в різних методах. Зазвичай вживані речовини, які перехресно зшиваються, включають, наприклад, 1,1-біс(діазаацетил)-2-фенілетан, глутаральдегід, N-гідроксисукцинімідефіри, наприклад, ефіри з 4-азидосаліциловою кислотою, гомобіфункціональні імідоефіри, включаючи дісукцинімідилефіри, такі як 3,3'-дитіобіс(сукцинімідилпропіонат), та біфункціональні малеїміди, такі як біс-N-малеїмідо-1,8-октан. Дериватизуючі речовини, такі як метил-3-[(п-азидофеніл)дитіо]пропіоїмідат, дозволяють отримати проміжні продукти, що фотоактивуються, які здатні утворювати перехресні зв'язки під дією світла. У іншому варіанті для іммобілізації білка використовують реактивні водонерозчинні матриці, такі як вуглеводи, що ціаноген-бромід-активуються, та реакційноздатні підкладки, які описані в патентах США № 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; та 4,330,440.

Залишки глутамінілу та аспарагінілу часто дезамідують для отримання, відповідно, залишків глутамілу та аспартилу. У іншому варіанті ці залишки дезамідують в м'яких кислих умовах. Всі форми цих залишків входять в об'єм цього винаходу.

Інші модифікації включають гідроксилування проліну та лізину, фосфорилювання гідроксильних груп залишків серилу або треонілу, метилювання α -аміногруп лізину, аргініну та бічних ланцюгів гістидину (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилювання N-кінцевого аміну амідування будь-яких C-кінцевих карбоксильних груп.

Інший вигляд ковалентної модифікації антигензв'язувального білка, що входить в об'єм цього винаходу, включає зміну профілю глікозилювання білка. Як відомо в цій галузі техніки, профілі глікозилювання можуть залежати як від білкової послідовності (наприклад, наявності або відсутності певних амінокислотних залишків глікозилювання, що обговорюється нижче), так і від клітини- або організму-хазяїна, в якому виробляється білок. Конкретні експресійні системи обговорюються нижче.

Глікозилювання поліпептидів зазвичай є N-зв'язаним або O-зв'язаним. N-зв'язане глікозилювання означає приєднання вуглеводної сполуки до бічного ланцюга залишку аспарагіну. Трипептидні послідовності аспарагін-X-серин та аспарагін-X-треонін, де X є будь-якою амінокислотою за винятком проліну, являють собою послідовності впізнання для ферментативного приєднання вуглеводної сполуки з бічного ланцюга аспарагіну. Таким чином, наявність в поліпептиді будь-якої з цих трипептидних послідовностей створює потенційну ділянку глікозилювання. O-зв'язане глікозилювання означає приєднання одного з цукрів N-

ацетилгалактозаміну, галактози або ксилози до гідроксиамінокислоти, як правило, серину або треоніну, хоча також можна застосовувати 5-гідроксипролін або 5-гідроксилізін.

Додавання ділянок глікозилювання в антигензв'язувальний білок зручно проводити шляхом зміни амінокислотної послідовності так, щоб вона містила одну або більше з вищеписаних трипептидних послідовностей (для N-зв'язаних ділянок глікозилювання). Також зміну можна здійснити шляхом додавання або заміщення одного або більше залишків серину або треоніну у вихідній послідовності (для O-зв'язаних ділянок глікозилювання). Для зручності амінокислотну послідовність антигензв'язувального білка переважно перетворюють шляхом внесення змін на рівні ДНК, зокрема, за допомогою введення в ДНК, що кодує цільовий поліпептид, мутацій в заздалегідь вибраних основах, так, щоб отримати кодони, які транслюватимуться в необхідні амінокислоти.

Інші способи збільшення кількості вуглеводних сполук в антигензв'язувальному білці полягають в хімічному або ферментативному сполученні глікозидів з білком. Перевагою подібних способів є те, що вони не вимагають вироблення білка в клітині-хазяїні, для якої можливе N- або O-глікозилювання. Залежно від способу, який використовується, сполучення цукру(ів) можна приєднати до (a) аргініну тагістидину, (b) вільних карбоксильних груп, (c) вільних сульфгідрильних груп, таких як групи цистеїну, (d) вільних гідроксильних груп, таких як групи серину, треоніну або гідроксипроліну, (e) ароматичних залишків, таких як залишки фенілаланіну, тирозину або триптофану, або (f) амідної групи глутаміну. Ці способи описані у WO 87/05330, яка опублікована 11 вересня 1987 р., та у Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

Видалення вуглеводних сполук, присутніх у вихідному антигензв'язувальному білку, можна здійснити хімічно або ферментативно. Хімічне деглікозилювання вимагає обробки білка сполукою трифторметансульфонової кислоти або аналогічною сполукою. Ця обробка призводить до відщеплення більшості або всіх цукрів за винятком зв'язувального цукру (N-ацетилглюкозаміну або N-ацетилгалактозаміну), при чому поліпептид залишається неушкодженим. Хімічне деглікозилювання описане Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 та Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Ферментативне відщеплення вуглеводних сполук від поліпептиду можна здійснити за допомогою великої кількості ендо- та екзоглікозидаз, як описано в Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Глікозилюванню в потенційних ділянках глікозилювання можна запобігти, використовуючи сполуку тунікаміцину, як описано в Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Тунікаміцин блокує утворення зв'язків білок-N-глікозид.

Інший вигляд ковалентної модифікації антигензв'язувального білка включає з'єднання антигензв'язувального білка з різними небілковими полімерами, включаючи, але не обмежуючись цим, різні поліолі, такі як поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь або поліоксіалкілени, способами, описаними в патентах США № 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 або 4,179,337. До того ж, як відомо в цій галузі техніки, амінокислотні заміни можна проводити в різних позиціях в межах антигензв'язувального білка для полегшення додавання полімерів, таких як ПЕГ.

У деяких варіантах реалізації ковалентна модифікація антигензв'язувальних білків, які є об'єктами винаходу, включає додавання однієї або більше міток.

Термін "група, що мітить", позначає будь-яку мітку, яка детектується. Приклади відповідних груп, що мітять, включають, але не обмежуються цим, наступні елементи: радіоізотопи або радіонукліди (наприклад, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентні групи (наприклад, ФІТЦ, родамін, люмінофори на основі комплексів лантанидів), ферментативні групи (наприклад, пероксидаза хрину, β -галактозидаза, люцифераза, лужна фосфатаза), хемолюмінісцентні групи, біотинільні групи, зумовлені поліпептидні епітопи, які розпізнаються вторинним репортером (наприклад, парні послідовності лейцинової блискавки, сайти зв'язування для вторинних антитіл, металозв'язувальні домени, епітопні мітки). У деяких варіантах реалізації група, що мітить, є сполученою з антигензв'язувальним білком за допомогою спейсерних "ніжок" різної довжини для зниження потенційної стеричної невідповідності. В цій галузі техніки відома велика кількість способів для мічення білків, які можна застосовувати в реалізації цього винаходу.

У загальному випадку мітки діляться на множину класів залежно від способу їх детекції: а) ізотопні мітки, які можуть бути радіоактивними або важкими ізотопами; б) магнітні мітки (наприклад, магнітні частки); в) редокс-активні речовини; г) речовини барвники; ферментативні групи (наприклад, пероксидаза хрина, β -галактозидаза, люцифераза, лужна фосфатаза); е) біотинільні групи; та ф) зумовлені поліпептидні епітопи, розпізнавані вторинним репортером (наприклад, парні послідовності лейцинової блискавки, сайти зв'язування для вторинних антитіл, металозв'язувальні домени, епітопні мітки і так далі). У деяких варіантах реалізації група, що мітить, сполучена з антигензв'язувальним білком за допомогою спейсерних "ніжок" різної довжини для зниження потенційної стеричної невідповідності. В цій галузі техніки відома велика кількість способів для мічення білків, які можна застосовувати в реалізації цього винаходу.

Специфічні мітки включають оптичні барвники, включаючи, але не обмежуючись цим, хромофори, люмінофори та флуорофори, при чому останні є специфічними у багатьох випадках. Флуорофори можуть бути як низькомолекулярними флуорофорами, так і белковоподібними флуорофорами.

Під “флуоресцентною міткою” маєтись на увазі будь-яка молекула, яку можна детектувати за її характерними флуоресцентними властивостями. Відповідні флуоресцентні мітки включають, але не обмежуються цим, флуоресцеїн, родамін, тетраметилродамін, еозин, еритрозин, кумарин, метил-кумарини, пірен, малахітовий зелений, стильбен, люциферовий жовтий, каскад синій, техаський червоний, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, зелений Орегон, барвники Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), каскад синій, каскад жовтий та R-фікоеритрин (PE) (Molecular Probes, Юджин, Орегон), ФІТЦ, родамін та техаський червоний (Pierce, Рокфорд, Іллінойс), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Піттсбург, Пенсильванія). Оптичні барвники, які підходять, включаючи флуорофори, описані в Molecular Probes Handbook авторства Richard P. Haugland, яка окремо включена в цей документ як посилання.

Білковоподібні флуоресцентні мітки, які підходять, також включають, але не обмежуються цим, зелений флуоресцентний білок, включаючи види ЗФБ Renilla, Ptilosarcus або Aequorea (Chalfie et al., 1994, Science 263:802-805), УЗФБ (Clontech Laboratories, Inc., Номер доступу в Genbank U55762), блакитний флуоресцентний білок (БФБ, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), посилений жовтий флуоресцентний білок (ПЖФБ, Clontech Laboratories, Inc.), люциферазу (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β -галактозидазу (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607) та Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, патенти США № 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558). Всі вищеперелічені посилання включені в цей опис як посилання.

Наведені як приклади антигензв'язувальні білки, які описані в цьому описі, мають властивості, обумовлені унікальним епітопом на ST2, що зв'язується антигензв'язувальним білком. Термін “епітоп” позначає амінокислоти молекули-мішені, з якими контактує антигензв'язувальний білок, наприклад, антитіло, коли антигензв'язувальний білок зв'язується з молекулою-мішенню. Епітоп може бути таким, що замінюється або не замінюється (наприклад, (i) в одноланцюговому поліпептиді це амінокислотні залишки, які не є такими, що замінюються по відношенню один до одного в поліпептидній послідовності, але в контексті молекули-мішені вони зв'язуються антигензв'язувальним білком, або (ii) в мультимерному рецепторі, що містить два або більше індивідуальних компонентів, наприклад, ST2 та АсР, це амінокислотні залишки, присутні в одному або більше з індивідуальних компонентів, але які зв'язуються при цьому антигензв'язувальним білком). Епітопні детермінанти можуть включати хімічно активні поверхневі групи молекул, такі як амінокислоти, бічні ланцюги цукрів, фосфорильні або сульфонільні групи, та можуть мати специфічні тривимірні структурні характеристики та/або специфічні зарядові характеристики. У загальному випадку антигензв'язувальні білки, специфічні відносно конкретної молекули-мішені, розпізнають переважно епітоп на молекулі-мішені в комплексній суміші з білків та/або макромолекул.

Методи характеристики зв'язування епітопу антигензв'язувальним білком добре відомі в цій галузі техніки, включаючи, але не обмежуючись цим, сортування (перехресне конкурування) (Miller et al “Epitope binning of murine monoclonal antibodies by a multiplexed pairing assay” J Immunol Methods (2011) 365, 118-25), пептидне картирування (наприклад, PEPSOT™) (Albert et al “The B-cell Epitope of the Monoclonal Anti-Factor VIII Antibody ESH8 Characterized by Peptide Array Analysis” 2008 Thromb Haemost 99, 634-7), методи мутагенезу, такі як отримання химер (Song et al “Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients” J. Virol. (2010) 84, 6935-6942), аланінове сканування (Cunningham and Wells “High-resolution epitope mapping of HGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis” Science (1989) 244, 1081– 1085), апрінінове сканування (Lim et al “A diversity of antibody epitopes can induce signaling through the erythropoietin receptor” Biochemistry (2010) 49, 3797–3804), метод HD-обміну (Coates et al “Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry” Rapid Commun. Mass Spectrom. (2009) 23 639– 647), ЯМР-метод з перехресним насиченням (Morgan et al “Precise epitope mapping of malaria parasite inhibitory antibodies by TROSY NMR cross-saturation” Biochemistry (2005) 44, 518-23) та кристалографію (Gerhardt et al “Structure of IL-17A in complex with a potent, fully human neutralizing antibody” J. Mol. Biol (2009) 394, 905-21). Ці методи розрізняються за рівнем деталізації, який вони забезпечують, відносно амінокислот, які складають епітоп.

Антигензв'язувальні білки, що є об'єктами цього винаходу, включають ті, що містять епітопи, які перекриваються з описаними в даному описі зразковими антигензв'язувальними білками, наприклад, Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 або Ab33. В окремих варіантах реалізації антигензв'язувальний білок містить епітопи, аналогічні епітопам зразкових антигензв'язувальних білків. В інших варіантах реалізації антигензв'язувальний білок зв'язує тільки підгрупу з амінокислот, аналогічних амінокислотам зразкових антигензв'язувальних

білків.

В окремих варіантах реалізації ST2-антигензв'язувальний білок містить епітоп, який є ідентичним або перекривається з Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 або Ab33, та містить а) варіабельний домен легкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений у SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:164 або SEQ ID NO:165; б) варіабельний домен важкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений у SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:146 або SEQ ID NO:147; або в) варіабельний домен легкого ланцюга згідно з а) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з б).

[illegible]

легкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:165, та варіабельний домен важкого ланцюга, який є щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, або є ідентичним амінокислотній послідовності, наведений в SEQ ID NO:147.

В окремих варіантах реалізації і ST2-антигензв'язувальний білок містить епітоп, який є ідентичним або перекривається з Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 або Ab33, та містить а) варіабельний домен легкого ланцюга, що містить не більше десяти або не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:164 або SEQ ID NO:165; б) варіабельний домен важкого ланцюга, що містить не більше десяти або не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:146 або SEQ ID NO:147; або в) варіабельний домен легкого ланцюга згідно з а) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з б).

[illegible]

наведеної в SEQ ID NO:38; ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, що містить не більше десяти або не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:105, та варіабельний домен важкого ланцюга, що містить не більше десяти або не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:39; ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, що містить не більше десяти або не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:163, та варіабельний домен важкого ланцюга, що містить не більше десяти або не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:145; ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, що містить не більше десяти або не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:164, та варіабельний домен важкого ланцюга, що містить не більше десяти або не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:146; та ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, що містить не більше десяти або не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:165 та варіабельний домен важкого ланцюга, що містить не більше десяти або не більше п'яти амінокислотних вставок, делецій або замін відносно амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:147.

[illegible]

[illegible]

Переважні ST2-антигенів зв'язувальні білки, які безпосередньо описані вище в опісії, включають ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга згідно з а) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з о); ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга згідно з b) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з р); ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга згідно з c) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з q); ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга згідно з d) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з r); ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга згідно з e) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з s); ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга згідно з f) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з t); ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга згідно з g) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з u); ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга згідно з h) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з v); ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга згідно з i) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з w); ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга згідно з j) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з x); ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга згідно з k) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з y); ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга згідно з l) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з z); ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга згідно з m) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з aa); та ті, що містять варіабельний домен легкого ланцюга згідно з n) та варіабельний домен важкого ланцюга згідно з bb).

Антигензв'язувальні білки, що містять ідентичний епітоп або такий, що перекривається, часто перехресно конкурують за зв'язування антигену. Таким чином, в окремих варіантах реалізації антигензв'язувальний білок, який є об'єктом винаходу, перехресно конкурує з Ab1, Ab2, Ab3, Ab4,

Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 або Ab33. Вираз “перехресно конкурувати” або “перехресна конкуренція” позначають, що антигензв'язувальні білки конкурують за один й той самий епітоп або ділянку зв'язування на мішені. Таку конкуренцію можна виявити за допомогою методу, в якому контрольний антигензв'язувальний білок (наприклад, антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент) запобігає або пригнічує специфічне зв'язування антигензв'язувального білка, який досліджується, і навпаки. Для того, щоб визначити, чи конкурує молекула, яка досліджується, з контрольною молекулою за зв'язування, можна використовувати численні види аналізу конкурентного зв'язування. Приклади аналітичних методів, які застосовують, включають твердофазний прямий та непрямий радіоімунологічний аналіз (RIA), твердофазний прямий та непрямий імуоферментний аналіз (ІФА), конкурентний “сендвіч-метод” (дивіться, наприклад, Stahl et al. (1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253), твердофазний прямий біотин-авідиновий ІФА (дивіться, наприклад, Kirkland et al., (1986) *J. Immunol.* 137:3614-3619), твердофазний прямий аналіз з використанням міток, твердофазний прямий “сендвіч-аналіз” з використанням міток, Luminex (Jia et al “A novel method of Multiplexed Competitive Antibody Binning for the characterization of monoclonal antibodies” *J. Immunological Methods* (2004) 288, 91–98) та поверхневий плазмонний резонанс (Song et al “Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients” *J. Virol.* (2010) 84, 6935-6942). Приклад методу для визначення перехресної конкуренції описаний в Прикладі 5. Зазвичай, якщо конкуруючий антигензв'язувальний білок є присутнім у надлишковій кількості, він пригнічує зв'язування контрольного антигензв'язувального білка із загальним антигеном щонайменше на 50%, 55%, 60%, 65%, 70% або 75%. В деяких випадках зв'язування пригнічується щонайменше на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більше.

Ab2 зв'язує ST2 людини та яванської макаки з високою афінністю та блокує зв'язування IL-33 з ST2, таким чином, блокуючи IL-33-опосередковану передачу сигналу ST2. Антитіла, що містять ідентичні, подібні або такі, що перекриваються з Ab2, епітопи, також можуть мати ці характерні особливості. В переважних варіантах реалізації ST2-антигензв'язувальний білок перехресно конкурує з Ab2 за зв'язування з ST2. Приклади ST2-антигензв'язувальних білків, які перехресно конкурують з Ab2, включають Ab1, Ab3, Ab5, Ab7, Ab8 та Ab30 (дивіться Приклад 5). Щоб знайти антитіла, які зв'язують такий, що перекривається, подібний або ідентичний епітоп, що й Ab2, можна дослідити одне або більше антитіл на предмет перехресного конкурування з Ab2. Більше того, отримуючи варіанти антитіла, яке перехресно реагує з Ab2, можна дослідити такі антитіла, щоб визначити, чи зберігається перехресна конкуренція після варіації, передбачаючи, що епітоп варіанта несуттєво змінився порівняно з батьківською молекулою. Таким чином, в окремих варіантах реалізації винаходу запропоновані варіанти антитіла, які перехресно конкурують з Ab2 за зв'язування з ST2.

Окрім перехресного конкурування один з одним на антитіла з такими, що перекриваються, подібними або ідентичними епітопами може аналогічно впливати мутагенез ST2. Певні мутації можуть пригнічувати зв'язування антитіла; інші можуть посилювати або активувати зв'язування. У Прикладі 11 проводили аргінін/аланін скануючий мутагенез фрагмента позаклітинного домену ST2 та визначали його вплив на наведені як приклади антитіла. В об'єм цього винаходу включені ST2-зв'язувальні білки, які характеризуються аналогічним впливом на них мутагенезу, що й наведені як приклади антитіла.

В окремих варіантах реалізації зв'язування ST2-антигензв'язувального білка пригнічується введенням одиничної мутації у ST2, при чому одинична мутація вибрана з групи, яка складається з L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R та V176R. В переважних варіантах реалізації будь-які дві або більше, три або більше, чотири або більше, п'ять або більше, шість або більше, сім або більше, вісім або більше, дев'ять або більше, десять або більше або всі одиничні мутації з вищенаведеної групи незалежно пригнічують зв'язування ST2-зв'язувального білка. В інших варіантах реалізації зв'язування ST2-антигензв'язувального білка активується введенням одиничної мутації у ST2, при чому одинична мутація вибрана з групи, яка складається з L53R, R72A та S73R. В переважних варіантах реалізації всі одиничні мутації з вищенаведеної групи незалежно активують зв'язування ST2-зв'язувального білка. В переважних варіантах реалізації ST2-антигензв'язувальний білок має характерні властивості Ab2, які пригнічуються будь-якою з L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R та V176R та активуються будь-якою з L53R, R72A, S73R.

Іншим методом аналізу антитіла на основі його епітопу є амідний воднево-дейтерієвий обмін (HDX). HDX широко застосовувався у вивченні білкової конформації та динаміки, взаємодій білок-ліганд та білок-білкових взаємодій (Zhang and Smith 1993, Engen and Smith 2001). Мас-спектрометричні вимірювання забезпечують ефективний інструмент для визначення ступіню обміну, оскільки заміщення одного водню дейтерієм призводить до збільшення маси на 1 Да під час кожного обміну. Ступінь HDX легко можна визначити на рівні пептиду, аналізуючи протеолітичне розщеплення білка за допомогою рідинної хроматографії спільно з тандемною мас-спектрометриєю в умовах, які регулюються (Engen and Smith 2001, Baerga-Ortiz, Hughes et al. 2002, Codreanu, Ladner et al. 2002, Hamuro,

Coales et al. 2006, Coales, Tuske et al. 2009, Zhang, Zhang et al. 2012).

Шляхом порівняння HDX-профілів антигену для протеолітичного розщеплення ST2 у відсутності або у присутності антитіла (у вільному та зв'язаному стані) можна виявити ділянки взаємодії. Зокрема, коли антитіло зв'язується з ST2, доступні для розчинника водні аміди вільного ST2 можуть виявитися захищеними, в результаті чого спостерігається більш низька швидкість обміну. Отже, ті ділянки, які у присутності антитіла отримують менше дейтерію ніж у його відсутності, потенційно є зв'язувальними епітопами. Інші фактори, які включають швидкість обміну у вільному стані, знання білкової структури антигену, а також результат інших методів картирування епітопів, враховуються за визначення епітопів.

Зв'язування Ab2 з ST2 аналізували за допомогою HDX, як описано у Прикладі 12. Аналіз показує, що Ab2 зв'язується з/змінює швидкість обміну фрагмента структури ST2, що містить амінокислоти 33-44 та 88-94 з амінокислот 19-322 з SEQ ID NO:1 (амінокислоти 15-26 та 70-76 зрілого ST2, відповідно). Антитіла з епітопами, що перекриваються, подібними або ідентичними епітопами з Ab2 також будуть зв'язуватись з/змінювати швидкість обміну амінокислот в межах 33-44 та 88-94 з SEQ ID NO:1. В окремих варіантах реалізації ST2-зв'язувальний білок, наприклад, антитіло, захищає будь-яку з амінокислот 33-44 з SEQ ID NO:1 за зв'язування з ST2 та аналізу за допомогою HDX. В інших варіантах реалізації захищені будь-які з амінокислот 88-94. Обидва варіанти вказують на часткове перекривання зв'язувальних епітопів з Ab2. В переважних варіантах реалізації захищені будь-які амінокислоти з 33-44 та будь-які з 88-94. В окремих варіантах реалізації ST2-зв'язувальний білок, наприклад, антитіло, захищає всі амінокислоти 33-44 з SEQ ID NO:1 за зв'язування з ST2 та аналізу за допомогою HDX. В інших варіантах реалізації захищені всі амінокислоти з 88-94. Обидва варіанти вказують на наявність подібного зв'язувального епітопу з Ab2. В переважних варіантах реалізації зв'язувальних 33-44 та всі з 88-94, що вказує на наявність ідентичного або практично ідентичного епітопу з Ab2.

Зв'язування Ab2 з ST2 додатково аналізували за допомогою рентгенівської кристалографії. Дані рентгенівської кристалографії узгоджувалися з даними HDX-аналізу. Область контакту між Ab та антигеном можна визначити/виявити більшою кількістю способів. В Прикладі 13 область контакту визначали за різницею у площі поверхні, яка є доступною для розчинника, та за відстанню. Залишками ST2, які знаходяться в межах області контакту з Ab2, визначеними за різницею у площі поверхні, яка є доступною для розчинника, та за відстанню менше 5Å, є (згідно з позиціями у зрілому ST2 (з відсутньою лідерною послідовністю)) K1, F2, P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79 та Y81. В окремих варіантах реалізації ST2-зв'язувальний білок утворює область контакту з ST2, яка перекривається з такою ж у Ab2, включаючи ті варіанти, в яких будь-які з K1, F2, P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79 або Y81 знаходяться в межах області контакту. В деяких варіантах реалізації ST2-зв'язувальний білок утворює область контакту з ST2, при цьому P19, R20, Q21, G22, K23 та/або Y26 знаходяться в межах області контакту. В інших варіантах реалізації I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79 та/або Y81 знаходяться в межах області контакту. В переважних варіантах реалізації K1, F2, P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79 та Y81 знаходяться в межах області контакту.

Кристалічна структура вказує на те, що визначені амінокислотні залишки утворюють водневі зв'язки або сольові містки з амінокислотами Ab2. Такі залишки включають K1, R20, K23, Y26, T75, N77, R78 та T79. В окремих варіантах реалізації ST2-антигензв'язувальний білок утворює водневі зв'язки або сольові містки з одним або більше з K1, R20, K23, Y26, T75, N77, R78 та T79.

Кристалічна структура додатково дає інформацію відносно того, які залишки Ab2 утворюють область контакту з ST2. На ФІГ. 10 показані залишки у варіабельній ділянці легкого ланцюга та у варіабельній ділянці важкого ланцюга, які утворюють область контакту з ST2. Також показані залишки, які утворюють водневі зв'язки або сольові містки з амінокислотами в ST2. Цю інформацію можна використовувати для конструювання варіантів Ab2, включаючи ті, що містять варіабельні домени, які є на 90% ідентичними, на 95% ідентичними, та 10 або менше інсерцій, делецій та/або замін в межах варіабельного домену легкого ланцюга або важкого ланцюга Ab2. Може виникнути необхідність зберігання амінокислот в межах області контакту, та при цьому зміни залишків, які не входять в цю область. Таким чином можна сконструювати та отримати варіанти Ab2, що містять одну або більше амінокислотних вставок, замін та/або делецій в межах одного або більше CDRs, що належать до Ab2, які підтримують зв'язування з ST2.

В деяких варіантах реалізації ST2-зв'язувальний білок містить варіант варіабельної ділянки легкого ланцюга Ab2 (SEQ ID NO:96), в якій D28, I29, S30, N31, Y32, Y49, D50, N53, E55, T56, D91, D92, N93, F94 та/або L96 залишаються незмінними або містять консервативні заміни, та/або варіант варіабельної ділянки важкого ланцюга Ab2 (SEQ ID NO:30), в якому W33, I50, D57, R59, H99, G100, T101, S102, S103, D104, Y105 та/або Y106 залишаються незмінними або містять консервативні мутації. В переважних варіантах реалізації D28, N31, D50, N53, E55, D91 та D92 варіабельної ділянки легкого ланцюга залишаються незмінними та S102, S103, D104 та Y105 важкого ланцюга залишаються незмінними.

Полінуклеотиди, які кодують ST2-антигенз'язувальні білки

У цей винахід включені нуклеїнові кислоти, які кодують ST2-антигенз'язувальні білки, включаючи антитіла, визначені відповідно до цього опису. Переважні нуклеїнові кислоти, включаючи ті, що кодують, наведені як приклади та описані в цьому описі легкі та важкі ланцюги.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab1 LC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:73.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab2 LC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:74.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab3 LC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:75.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab4 LC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:76.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab5 LC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:77.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab6 LC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:78.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab7 LC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:79.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab8 LC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:80.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab9 LC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:81.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab10 LC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:82.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab11 LC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:83.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує й Ab30 LC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:157.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab32 LC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:158.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab33 LC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:159.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab1 HC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:7.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab2 HC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:8.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab3 HC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:9.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab4 HC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:10.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab5 HC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:11.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab6 HC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:12.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab7 HC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:13.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab8 HC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:14.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab9 HC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:15.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab10 HC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:16.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab11 HC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:17.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab30 HC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:139.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab32 HC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:140.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує Ab33 HC, є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, наведену в SEQ ID NO:141.

Аспекти реалізації цього винаходу включають полінуклеотидні варіанти (отримані, наприклад, внаслідок дегенерації), які кодують амінокислотні послідовності, які описані в цьому описі.

Аспекти реалізації цього винаходу включають множину варіантів реалізації, включаючи, але не

обмежуючись цим, наступні варіанти реалізації, наведені як приклади.

Виділений поліпептид, при чому зазначений поліпептид кодує один або більше поліпептидів, що містять амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з:

A. 1. послідовності варіабельного домену легкого ланцюга, який є щонайменше на 90% ідентичним послідовності варіабельного домену легкого ланцюга, наведений в SEQ ID NOs:95-105, 163-165;

2. послідовності варіабельного домену важкого ланцюга, який є щонайменше на 90% ідентичним послідовності варіабельного домену важкого ланцюга, наведений в SEQ ID NOs:29-39, 145-147;

3. варіабельного домену легкого ланцюга згідно з (1) та варіабельного домену важкого ланцюга згідно з (2); та

B. варіабельного домену легкого ланцюга, що містить CDR1, CDR2, CDR3, та/або варіабельного домену важкого ланцюга, що містить CDR1, CDR2, CDR3, які є однаковими або різняться не більше, ніж на три амінокислотні вставки, заміни та/або делеції в кожному CDR з наступних послідовностей:

1. CDR1 (SEQ ID NO:106), CDR2 (SEQ ID NO:117), CDR3 (SEQ ID NO:128) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:40), CDR2 (SEQ ID NO:51), CDR3 (SEQ ID NO:62) важкого ланцюга, які належать до Ab1;

2. CDR1 (SEQ ID NO:107), CDR2 (SEQ ID NO:118), CDR3 (SEQ ID NO:129) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:41), CDR2 (SEQ ID NO:52), CDR3 (SEQ ID NO:63) важкого ланцюга, які належать до Ab2;

3. CDR1 (SEQ ID NO:108), CDR2 (SEQ ID NO:119), CDR3 (SEQ ID NO:130) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:42), CDR2 (SEQ ID NO:53), CDR3 (SEQ ID NO:64) важкого ланцюга, які належать до Ab3;

4. CDR1 (SEQ ID NO:109), CDR2 (SEQ ID NO:120), CDR3 (SEQ ID NO:131) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:43), CDR2 (SEQ ID NO:54), CDR3 (SEQ ID NO:65) важкого ланцюга, які належать до Ab4;

5. CDR1 (SEQ ID NO:110), CDR2 (SEQ ID NO:121), CDR3 (SEQ ID NO:132) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:44), CDR2 (SEQ ID NO:55), CDR3 (SEQ ID NO:66) важкого ланцюга, які належать до Ab5;

6. CDR1 (SEQ ID NO:111), CDR2 (SEQ ID NO:122), CDR3 (SEQ ID NO:133) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:45), CDR2 (SEQ ID NO:56), CDR3 (SEQ ID NO:67) важкого ланцюга, які належать до Ab6;

7. CDR1 (SEQ ID NO:112), CDR2 (SEQ ID NO:123), CDR3 (SEQ ID NO:134) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:46), CDR2 (SEQ ID NO:57), CDR3 (SEQ ID NO:68) важкого ланцюга, які належать до Ab7;

8. CDR1 (SEQ ID NO:113), CDR2 (SEQ ID NO:124), CDR3 (SEQ ID NO:135) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:47), CDR2 (SEQ ID NO:58), CDR3 (SEQ ID NO:69) важкого ланцюга, які належать до Ab8;

9. CDR1 (SEQ ID NO:114), CDR2 (SEQ ID NO:125), CDR3 (SEQ ID NO:136) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:48), CDR2 (SEQ ID NO:59), CDR3 (SEQ ID NO:70) важкого ланцюга, які належать до Ab9;

10. CDR1 (SEQ ID NO:115), CDR2 (SEQ ID NO:126), CDR3 (SEQ ID NO:137) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:49), CDR2 (SEQ ID NO:60), CDR3 (SEQ ID NO:71) важкого ланцюга, які належать до Ab10;

11. CDR1 (SEQ ID NO:116), CDR2 (SEQ ID NO:127), CDR3 (SEQ ID NO:138) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:50), CDR2 (SEQ ID NO:61), CDR3 (SEQ ID NO:72) важкого ланцюга, які належать до Ab11;

12. CDR1 (SEQ ID NO:166), CDR2 (SEQ ID NO:169), CDR3 (SEQ ID NO:172) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:148), CDR2 (SEQ ID NO:151), CDR3 (SEQ ID NO:154) важкого ланцюга, які належать до Ab30;

13. CDR1 (SEQ ID NO:167), CDR2 (SEQ ID NO:170), CDR3 (SEQ ID NO:173) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:149), CDR2 (SEQ ID NO:152), CDR3 (SEQ ID NO:155) важкого ланцюга, які належать до Ab32; та

14. CDR1 (SEQ ID NO:168), CDR2 (SEQ ID NO:171), CDR3 (SEQ ID NO:174) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:150), CDR2 (SEQ ID NO:153), CDR3 (SEQ ID NO:156) важкого ланцюга, які належать до Ab33.

В переважних варіантах реалізації поліпептид, який кодується виділеною нуклеїновою кислотою, є компонентом антигензв'язувального білка, який зв'язує ST2.

Нуклеотидні послідовності, що відповідають описаним у цьому описі амінокислотним послідовностям, призначені для того, щоб слугувати зондами або праймерами для виділення нуклеїнових кислот або пошуковими послідовностями для проведення пошуку за базами даних, можна одержати за допомогою "зворотної трансляції" амінокислотних послідовностей або за

допомогою визначення ділянок амінокислотної ідентичності з поліпептидами, для яких була визначена кодуюча послідовність ДНК. Добре відому процедуру полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) можна застосовувати для виділення і ампліфікації послідовності ДНК, що кодує ST2-антигензв'язувальні білки або необхідну комбінацію поліпептидних фрагментів ST2-антигензв'язувального білка. Олігонуклеотиди, що визначають необхідні кінці в комбінації з фрагментів ДНК, застосовують як 5' і 3' праймери. Олігонуклеотиди можуть додатково містити ділянки пізнання рестрикційних ендонуклеаз, щоб полегшити інсерцію ампліфікованої комбінації з фрагментів ДНК у вектор експресії. Способи ПЛР описані в Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; та *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Молекули нуклеїнових кислот, що є об'єктами за цим винаходом, містять ДНК і РНК, як в одноланцюжковій, так і в дволанцюжковій формах, а також відповідні комплементарні послідовності. ДНК містять, наприклад, кДНК, геномну ДНК, хімічно синтезовану ДНК, ДНК, ампліфіковану за допомогою ПЛР, і їх комбінації. Молекули нуклеїнових кислот, що є об'єктами за цим винаходом, містять повнорозмірні гени або молекули кДНК, а також комбінації з їх фрагментів. Нуклеїнові кислоти, що є об'єктами за цим винаходом, переважно одержані з джерел людського походження, але у винахід також включені нуклеїнові кислоти, одержані від інших видів.

"Виділеною нуклеїновою кислотою" є нуклеїнова кислота, яка була відокремлена від суміжних генетичних послідовностей, присутніх у геномі організму, з якого була виділена нуклеїнова кислота, у випадку нуклеїнових кислот, виділених із джерел природного походження. У випадку нуклеїнових кислот, ферментативно синтезованих із матриці або синтезованих хімічно, таких як продукти ПЛР, молекули кДНК або, наприклад, олігонуклеотиди, зрозуміло, що нуклеїнові кислоти, одержані за допомогою цих процесів, є виділеними нуклеїновими кислотами. Виділеною молекулою нуклеїнової кислоти називається молекула нуклеїнової кислоти у вигляді окремого фрагмента або у вигляді компонента крупнішої нуклеотидної конструкції. В одному переважному варіанті реалізації винаходу нуклеїнові кислоти є в значній мірі чистими від домішкового ендогенного матеріалу. Переважно молекула нуклеїнової кислоти отримана з ДНК або РНК, які щонайменше один раз були виділені практично у чистому вигляді в кількості або при концентрації, які дозволяють провести ідентифікацію, обробку і виділення компонентів їх нуклеотидних послідовностей стандартними біохімічними способами (такими, як ті, що описані в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Такі послідовності переважно надаються та/або конструюються у вигляді відкритої рамки зчитування, що не переривається внутрішніми нетрансльованими послідовностями або інтронами, які зазвичай присутні в еукаріотичних генах. Послідовності нетрансльованої ДНК можуть бути присутніми у напрямках 5' або 3' від відкритої рамки зчитування, де вони не заважають маніпуляціям з або експресії кодуючої ділянки.

Також у цей винахід включені нуклеїнові кислоти, що гібридизуються в умовах помірної жорсткості, і, переважніше, в умовах високої жорсткості, з нуклеїновими кислотами, що кодують описані в цьому описі ST2-антигензв'язувальні білки. Базові параметри, що впливають на вибір умов гібридизації, і керівництво по вибору прийнятних умов наведені в Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., розділи 9 та 11; і *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4), і можуть бути легко визначені фахівцями у цій галузі техніки на основі, наприклад, довжини та/або складу основ ДНК. Один із способів забезпечити умови помірної жорсткості включає використання розчину для попереднього відмивання, що містить 5 x SSC, 0,5% ДСН, 1,0 мМ ЕДТК (рН 8,0), гібридизаційного буфера з близько 50% формаміду, 6 x SSC, і температури гібридизації близько 55 градусів Цельсія (або інших схожих гібридизаційних розчинів, таких як розчин, що містить близько 50% формаміду, з температурою гібридизації близько 42 градусів Цельсія), і умов відмивання при близько 60 градусів Цельсія, в 0,5 x SSC, 0,1% ДСН. У загальному випадку умови високої жорсткості визначаються так само, як і наведені вище умови гібридизації, але з відмиванням при близько 68 градусах Цельсія, 0,2 x SSC, 0,1% ДСН. У гібридизаційному і відмивальному буферах SSC (1xSSC є 0,15 М NaCl і 15 мМ цитрату натрію) можна замінити на SSPE (1xSSPE є 0,15 М NaCl, 10 мМ NaH₂PO₄ і 1,25 мМ ЕДТК, рН 7,4); відмивання проводять через 15 хвилин після завершення гібридизації. Потрібно розуміти, що температуру відмивання і концентрацію солі можна за необхідності доводити так, як це необхідно для досягнення бажаного ступеня жорсткості, спираючись на основні принципи, що впливають на реакції гібридизації і стабільність спіралей, як відомо фахівцям у цій галузі техніки і додатково описано нижче (див., наприклад, Sambrook et al., 1989). При гібридизації нуклеїнової кислоти з цільовою нуклеїновою кислотою з невідомої послідовності за довжину гібриду приймають довжину нуклеїнової кислоти, що гібридизується. При гібридизації нуклеїнових кислот з відомими послідовностями довжину гібриду можна визначити шляхом вирівнювання нуклеотидних послідовностей і виявлення ділянки або ділянок з оптимальною комплементарністю послідовностей. Температура гібридизації для гібридів із передбачуваною довжиною менше 50 пар

основ має бути на 5-10 градусів Цельсія нижче за температуру плавлення (T_m) гібриду, при цьому T_m визначають згідно з наступним рівнянням. Для гібридів завдовжки менше 18 пар основ: T_m (градуси Цельсія) = $2(\# \text{ основ A} + \text{T}) + 4(\# \text{ основ G} + \text{C})$. Для гібридів завдовжки більше 18 пар основ: T_m (градуси Цельсія) = $81,5 + 16,6(\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41(\% \text{ G} + \text{C}) - (600/\text{N})$, де N – кількість основ у гібриді, а $[\text{Na}^+]$ – концентрація іонів натрію в гібридизаційному буфері ($[\text{Na}^+]$ для 1xSSC = 0,165 M). Переважно кожна з нуклеїнових кислот, що гібридизується, має довжину, що складає щонайменше 15 нуклеотидів (або, переважніше, щонайменше 18 нуклеотидів, або щонайменше 20 нуклеотидів, або щонайменше 25 нуклеотидів, або щонайменше 30 нуклеотидів, або щонайменше 40 нуклеотидів, або, найпереважніше, щонайменше 50 нуклеотидів) або щонайменше 25% (переважніше, щонайменше 50%, або щонайменше 60%, або щонайменше 70% і, найпереважніше, щонайменше 80%) від довжини нуклеїнової кислоти, що є об'єктом за цим винаходом, з якою вона гібридизується, і є щонайменше на 60% (переважніше, щонайменше 70%, щонайменше 75%, щонайменше 80%, щонайменше 81%, щонайменше 82%, щонайменше 83%, щонайменше 84%, щонайменше 85%, щонайменше 86%, щонайменше 87%, щонайменше 88%, щонайменше 89%, щонайменше 90%, щонайменше 91%, щонайменше 92%, щонайменше 93%, щонайменше 94%, щонайменше 95%, щонайменше 96%, щонайменше 97%, щонайменше 98% або щонайменше 99%, і, найпереважніше, щонайменше 99,5%) ідентичною в послідовностях з нуклеїновою кислотою, що є об'єктом за цим винаходом, з якою вона гібридизується, причому ідентичність послідовностей визначають шляхом порівняння послідовностей нуклеїнових кислот, що гібридизуються при вирівнюванні їх таким чином, щоб максимізувати перекривання і ідентичність, при цьому мінімізуючи гепи у послідовностях, як детальніше описано вище.

Варіанти реалізації винаходу одержують за допомогою стандартного сайт- специфічного мутагенезу нуклеотидів у ДНК, що кодує антигензв'язувальний білок, використовуючи касету або ПЛР-мутагенез або інші відомі в даній галузі техніки способи одержання ДНК, що кодує варіант, і згодом експресуючи рекомбінантну ДНК у клітинній культурі, як описується у цьому описі. При цьому фрагменти антигензв'язувального білка, що містять варіантні CDRs, що мають у своєму складі до близько 100-150 залишків, можна отримувати за допомогою *in vitro* синтезу, використовуючи відомі способи. Зазвичай варіанти демонструють таку саму якісну біологічну активність, що і їх аналоги природного походження, наприклад, зв'язування з ST2, хоча варіанти також можна вибирати так, щоб вони мали модифіковані характеристики, як детальніше буде описано нижче.

Для фахівця у цій галузі техніки зрозуміло, що внаслідок дегенерації генетичного коду можна одержати дуже велику кількість нуклеїнових кислот, усі з яких кодують CDRs (а також важкі і легкі ланцюги або інші компоненти антигензв'язувального білка), що є об'єктами за цим винаходом. Таким чином, визначивши склад конкретної амінокислотної послідовності, фахівці у цій галузі техніки можуть одержати будь-яку кількість різних нуклеїнових кислот, просто модифікуючи послідовність одного або більше кодонів способом, який не призводить до зміни амінокислотної послідовності кодованого білка.

Також у цьому винаході запропоновані системи експресії і конструкції у вигляді плазмід, векторів експресії, транскрипцій або касет експресії, що містять щонайменше один із вищеописаних полінуклеотидів. Додатково у винаході запропоновані клітини-хазяїни, що містять такі системи експресії або конструкції.

Зазвичай вектори експресії застосовують у будь-яких клітинах-хазяїнах, які містять послідовності для підтримки плазмід і для клонування і експресії екзогенних нуклеотидних послідовностей. Такі послідовності, що у сукупності називаються "фланкуючими послідовностями", в окремих варіантах реалізації винаходу зазвичай містять одну або більше з наступних нуклеотидних послідовностей: промотор, одну або більше енхансерних послідовностей, точку початку реплікації, послідовність термінації транскрипції, повну інтронну послідовність, що містить донорний і акцепторний сайт сплайсингу, послідовність, що кодує лідерну послідовність для секреції поліпептиду, ділянку зв'язування рибосоми, послідовність поліаденілювання, полілінкерну ділянку для інсерції нуклеїнової кислоти, що кодує призначений для експресії поліпептид, і маркерний елемент, що селекується. Кожна з цих послідовностей обговорюється нижче.

У деяких випадках вектор може містити послідовність, що кодує "мітку", тобто, молекулу олігонуклеотида, розташовану в 5' або 3' кінці кодуєчої послідовності ST2-антигензв'язувального білка; олігонуклеотидна послідовність кодує поліHis (наприклад, гексаHis) або будь-яку іншу "мітку", таку як FLAG, HA (гемаглютинін вірусу грипу) або тус, для яких існують комерційно доступні антитіла. Зазвичай така мітка зшивається з поліпептидом при експресії поліпептиду і може слугувати як засіб для афінного очищення або детектування ST2-антигензв'язувального білка у клітині-хазяїні. Афінне очищення можна здійснити, наприклад, за допомогою хроматографії на колонках, використовуючи як афінну матрицю антитіла до мітки. У деяких випадках мітку з очищеного ST2-антигензв'язувального білка можна згодом видалити різними способами, такими як застосування визначених пептидаз для розщеплювання.

Фланкуючі послідовності можуть бути гомологічними (тобто, отриманими від тих самих видів

та/або штамів, що і клітина-хазяїн), гетерологічними (тобто, отриманими від видів, відмінних від виду або штаму клітини-хазяїна), гібридними (тобто, такими, що є комбінацією з фланкуючих послідовностей із понад одного джерела), синтетичними або нативними. Отже, джерелом фланкуючої послідовності може бути будь-який прокаріотичний або еукаріотичний організм, будь-який організм хребетної або безхребетної тварини або будь-яка рослина, за умови, що фланкуюча послідовність є функціональною і може бути активована механізмом клітини-хазяїна.

Фланкуючі послідовності, що застосовуються у векторах, що є об'єктами за цим винаходом, можна одержати будь-яким із декількох відомих у цій галузі техніки способів. Зазвичай фланкуючі послідовності, що застосовуються у даній роботі, є заздалегідь ідентифікованими за допомогою картування та/або розщеплювання рестрикційними ендонуклеазами, і, отже, можуть бути виділені з відповідного тканинного джерела за допомогою відповідних рестрикційних ендонуклеаз. У деяких випадках може бути відома повна нуклеотидна послідовність фланкуючої послідовності. У даному випадку фланкуючу послідовність можна синтезувати за допомогою описаних у цьому описі способів синтезу або клонування нуклеїнових кислот.

У випадку, якщо відома вся послідовність або фрагмент фланкуючої послідовності, її можна одержати, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), та/або за допомогою скринінгу бібліотеки генома з відповідним зондом, таким як олігонуклеотид та/або фрагмент фланкуючої послідовності того ж самого або іншого виду. У випадку, якщо фланкуюча послідовність невідома, можна виділити фрагмент ДНК, що містить фланкуючу послідовність, з крупнішої ділянки ДНК, яка може містити, наприклад, кодуючу послідовність або навіть інший ген або гени. Виділення можна здійснити за допомогою розщеплювання рестрикційними ендонуклеазами для одержання необхідного фрагмента ДНК з подальшим виділенням з використанням очищення в агарозному гелі, хроматографії на колонках Qiagen® (Чатсворт, Каліфорнія) або інших відомих фахівцям у цій галузі техніки способів. Вибір прийнятних ферментів для реалізації цієї мети не утруднить фахівця у цій галузі техніки.

Точкою початку реплікації зазвичай є фрагмент прокаріотичних векторів експресії, які набувають на комерційній основі, і така точка допомагає при ампліфікації вектора в клітині-хазяїні. Якщо вибраний вектор не містить початку ділянки реплікації, його можна синтезувати хімічно на основі відомої послідовності і лігувати у вектор. Наприклад, точка початку реплікації з плазмиди pBR322 (New England Biolabs, Беверлі, Массачусетс) є прийнятною для більшості грамнегативних бактерій, а велика кількість вірусних точок (наприклад, SV40, поліоми, аденовірусу, вірусу везикулярного стоматиту (VBS) або папіломавірусів, таких як ВПЛ або ВПКРС) є прийнятними для клонуючих векторів у клітинах ссавців. У загальному випадку компонент точки початку реплікації не є необхідним для векторів експресії ссавців (наприклад, точку з SV40 часто використовують лише тому, що вона також містить ранній вірусний промотор).

Послідовність термінації транскрипції зазвичай розташовується в 3' кінці кодуючої ділянки поліпептиду і слугує для термінації транскрипції. Зазвичай у прокаріотичних клітинах послідовність термінації транскрипції є багатим G-C фрагментом, за яким йде полі-T послідовність. Оскільки цю послідовність легко клонувати з бібліотеки або навіть придбати на комерційній основі як частину вектора, її також неважко синтезувати, використовуючи способи для нуклеотидного синтезу, такі як ті, що описані у цьому документі.

Ген маркера, що селекується, кодує білок, необхідний для виживання і росту клітини-хазяїна, вирощеної в селективному культуральному середовищі. Типові гени селективних маркерів кодують білки, які (а) додають прокаріотичним клітинам-хазяїнам стійкість до антибіотиків або інших токсинів, наприклад, ампіциліну, тетрацикліну або канаміцину; (б) заповнюють ауксотрофні недоліки в клітинах; або (с) поставляють необхідні поживні речовини, недоступні у комплексному середовищі або середовищі з визначеним складом. Спеціальними селектованими маркерами є ген стійкості до канаміцину, ген стійкості до ампіциліну і ген стійкості до тетрацикліну. Також зручно використовувати ген стійкості до неоміцину для селекції як у прокаріотичних, так і в еукаріотичних клітинах-хазяїнах.

Інші селектовані гени можна використовувати для ампліфікації гена, призначеного для експресії. Ампліфікація є процесом, в якому гени, потрібні для вироблення білка, необхідного для росту або клітинної виживаності, багато разів повторюються один за іншим у межах хромосом послідовних генерацій рекомбінантних клітин. Приклади прийнятних для клітин ссавців селектованих маркерів охоплюють гени дегідрофолатредуктази (ДГФР) і безпромоторної тимідинкінази. Трансформанти клітин ссавців потрапляють під селекційний тиск, коли лише трансформанти однозначно пристосовані до виживання завдяки присутності у векторі селектованого гена. Селекційний тиск обумовлений культивуванням трансформованих клітин в умовах, в яких концентрація селекційної речовини в середовищі значно підвищена, що призводить до ампліфікації як селектованого гена, так і ДНК, що кодує інший ген, такий як антигензв'язувальний білок антитіла, яке зв'язується з поліпептидом ST2. В результаті з ампліфікованої ДНК синтезується підвищена кількість поліпептиду, такого як ST2-антигензв'язувальний білок.

Ділянка зв'язування рибосоми зазвичай необхідна для ініціації трансляції мРНК і є послідовністю Шайна-Дальгарно (прокаріоти) або послідовністю Козака (еукаріоти). Цей елемент зазвичай розташований у напрямку 3' до промотору і у напрямку 5' до кодувочої послідовності поліпептиду, що експресується. В окремих варіантах реалізації винаходу одна або більше кодувочих ділянок можуть бути функціонально пов'язаними з внутрішньою ділянкою зв'язування рибосоми (IRES), що робить можливою трансляцію двох відкритих рамок зчитування з одного РНК-транскрипту.

В деяких випадках, наприклад, якщо необхідне глікозилювання в експресійній системі еукаріотичної клітини-хазяїна, можна оперувати різними пре- і пропослідовностями для того, щоб покращити глікозилювання або вихід продукту. Наприклад, можна внести зміни в ділянку розщеплювання пептидазою визначеного сигнального пептиду або додати пропослідовності, які також можуть впливати на глікозилювання. Кінцевий білковий продукт може містити в -1 позиції (по відношенню до першої амінокислоти зрілого білка) одну або більше додаткових амінокислот, властивих для експресії, які могли виявитися не повністю видаленими. Наприклад, кінцевий білковий продукт може містити один або два амінокислотні залишки, що виявляються в ділянці розщеплювання пептидазою, приєднаних до амінокінця. В іншому варіанті реалізації винаходу використання деяких ділянок розщеплювання ферментами може призвести до появи злегка усіченої форми необхідного поліпептиду, у випадку, якщо фермент робить надріз у такій ділянці в межах поліпептиду.

Експресійні і клонуючі вектори, що є об'єктами за цим винаходом, зазвичай містять промотор, який розпізнається організмом-хазяїном і функціонально зв'язаний з молекулою, що кодує ST2-антигензв'язувальний білок. Промотори є нетранскрибуємими послідовностями, розташованими вище (тобто, у напрямку 5') стартового кодона структурного гена (зазвичай у межах від близько 100 до 1000 п.о.), які керують транскрипцією структурного гена. Традиційно промотори об'єднують у два класи: індукцибельні промотори і конститутивні промотори. Індукцибельні промотори ініціюють підвищення рівня транскрипції з контрольованої ними ДНК у відповідь на деякі зміни умов культивування, таких як наявність або відсутність поживних речовин або зміна температури. Конститутивні промотори, з іншого боку, постійно транскрибують ген, з яким вони функціонально зв'язані, при цьому контроль генної експресії є слабким або відсутній. Велика кількість промоторів, що впізнаються потенційними клітинами-хазяїнами, є добре відомими. Прийнятний промотор функціонально зв'язується з ДНК, що кодує важкий ланцюг або легкий ланцюг, що містить ST2-антигензв'язувальний білок, що є об'єктом за цим винаходом, шляхом видалення промотору з первинної ДНК за допомогою розщеплювання рестрикційними ферментами і вставки необхідної промоторної послідовності у вектор.

У цій галузі техніки також відомі промотори, прийнятні для застосування з дріжджовими організмами-хазяїнами. Дріжджові енхансери переважно використовуються з дріжджовими промоторами. Промотори, що є прийнятними для використання у клітинах-хазяїнах ссавців, добре відомі і охоплюють, але не обмежуються цим, ті, які одержані з геномів вірусів, таких як вірус полііоми, вірус віспи курей, аденовірус (такий як аденовірус-2), вірус папіломи великої рогатої худоби, вірус саркоми птахів, цитомегаловірус, ретровіруси, вірус гепатиту В і, найпереважніше, вірус мавп 40 (SV40). Інші прийнятні для ссавців промотори охоплюють гетерологічні промотори для ссавців, наприклад, промотори теплового шоку і промотор актину.

Додаткові промотори, які можуть представляти інтерес, охоплюють, але не обмежуються цим: ранній промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); промотор CMV (Thornsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); промотор, що знаходиться в 3' довгому кінцевому повторі вірусу саркоми Раяса (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-797); промотор герпесної тимідинкінази (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); промотор і регуляторні послідовності з гена металотіонеїну (Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); і прокаріотичні промотори, такі як промотор бета-лактамази (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); або tac-промотор (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). Також інтерес представляють наступні транскрипційні контрольні ділянки тваринного походження, які проявляють тканинну специфічність і використовувалися на трансгенних тваринах: контрольна ділянка гена еластази I, яка активна в панкреатичних ациноцитах (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); контрольна ділянка гена інсуліну, яка активна в панкреатичних бета-клітинах (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); контрольна ділянка гена імуноглобуліну, яка активна в лімфоцитах (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); контрольна ділянка вірусу пухлини молочної залози мишей, яка активна в клітинах тестикул, молочної залози, лімфоцитах і тучних клітинах (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); контрольна ділянка гена альбуміну, яка активна у печінці (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); контрольна ділянка гена альфа-фетопротейну, яка активна в печінці (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53-58); контрольна ділянка гена 1-антитрипсину, яка активна у печінці (Kelsey et al., 1987,

Genes and Devel. 1:161-171); контрольна ділянка гена бета-глобіну, яка активна в мієлоїдних клітинах (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); контрольна ділянка гена основного білка мієліну, яка активна в олігодендроцитах мозку (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); контрольна ділянка гена легкого ланцюга-2 міозину, який активний у скелетних м'язах (Sani, 1985, Nature 314:283-286); і контрольна ділянка гена гонадотропного рилізінг-гормона, яка активна в гіпоталамусі (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

Енхансерну послідовність можна вставити у вектор, щоб підсилити транскрипцію ДНК, що кодує легкий ланцюг або важкий ланцюг, що містить ST2-антигензв'язувальний білок, що є об'єктом за цим винаходом, вищими еукаріотами. Енхансери є цис-діючими елементами ДНК завдовжки, як правило, близько 10-300 п.о., які впливають на промотор таким чином, щоб підсилити транскрипцію. Енхансери відносно орієнтаційно і позиційно незалежні і виявляються як у 5', так і в 3' позиціях відносно одиниці транскрипції. Відомо декілька енхансерних послідовностей, доступних з генів тварин (наприклад, глобіну, еластази, альбуміну, альфа-фетопротейну і інсуліну). Проте, використовуються, як правило, енхансери, одержані з вірусів. Відомі у цій галузі техніки енхансер SV40, енхансер раннього промотору цитомегаловірусу, енхансер поліоми і енхансери аденовірусів є прикладами енхансерних елементів для активації еукаріотичних промоторів. Хоча енхансер може знаходитися у векторі як у 5', так і в 3' положенні відносно кодуєчої послідовності, зазвичай він розташований у позиції 5' від промотору. У вектор експресії можна включити послідовність, що кодує відповідну нативну або гетерологічну сигнальну послідовність (лідерну послідовність або сигнальний пептид) для того, щоб стимулювати позаклітинну секрецію антитіл. Вибір сигнального пептиду або лідера залежить від типу клітин-хазяїнів, в яких вироблятимуться антитіла, а гетерологічна сигнальна послідовність може замінити нативну сигнальну послідовність. Приклади функціональних у клітинах-хазяїнах сигнальних пептидів ссавців охоплюють наступні: сигнальну послідовність для інтерлейкіну-7 (IL-7), описану в патенті США № 4,965,195; сигнальну послідовність для рецептора інтерлейкіну-2, описану в Cosman et al., 1984, Nature 312:768; сигнальний пептид рецептора інтерлейкіну-4, описаний в Європейському патенті № 0367 566; сигнальний пептид рецептора інтерлейкіну-1 типу I, описаний у патенті США № 4,968,607; сигнальний пептид рецептора інтерлейкіну-1 типу II, описаний у Європейському патенті № 0 460 846.

Вектор може містити один або більше елементів, які сприяють експресії у випадку, коли вектор інтегрований у геном клітини-хазяїна. Приклади охоплюють елемент EASE (Aldrich et al. 2003 Biotechnol Prog. 19:1433-38) і ділянку прикріплення до ядерного матриксу (MAR). MARs опосередковують структурне впорядкування хроматину і можуть захистити інтегрований вектор від ефекту "положення". Таким чином, MARs виключно корисні у випадку використання векторів для одержання стабільних трансфектантів. У цій галузі техніки відома множина природних і синтетичних нуклеїнових кислот, що містять MAR, описаних, наприклад, у патентах США № 6,239,328; 7,326,567; 6,177,612; 6,388,066; 6,245,974; 7,259,010; 6,037,525; 7,422,874; 7,129,062.

Вектори експресії, що є об'єктами за цим винаходом, можна конструювати на основі первинного вектора, такого як комерційно доступний вектор. Такі вектори можуть містити або не містити всі необхідні фланкуючі послідовності. Якщо одна або більше з описаних у цьому описі фланкуючих послідовностей не присутні у векторі спочатку, їх можна одержати окремо і лігувати у вектор. Способи, що використовуються для одержання будь-якої з фланкуючих послідовностей добре відомі фахівцям у цій галузі техніки.

Після того, як вектор був сконструйований, а молекула нуклеїнової кислоти, що кодує легкий ланцюг, важкий ланцюг або легкий ланцюг і важкий ланцюг, що містять ST2-антигензв'язувальну послідовність, була вставлена у відповідну ділянку вектора, повноцінний вектор можна вносити до відповідної клітини-хазяїна для ампліфікації та/або експресії поліпептиду. Трансформацію вектора експресії для ST2-антигензв'язувального білка у вибрану клітину-хазяїна можна здійснити за допомогою широко відомих способів, зокрема трансфекцію, інфікування, спільне осадження фосфату кальцію, електропорацію, мікроін'єкцію, ліпофекцію, DEAE-декстран опосередковану трансфекцію або інші відомі способи. Вибраний спосіб частково залежатиме від типу клітини-хазяїна, що використовується. Ці способи і інші прийнятні способи добре відомі фахівцям у цій галузі техніки і наведені, наприклад, у Sambrook et al., 2001, вище.

Клітина-хазяїн при культивуванні у відповідних умовах синтезує ST2-антигензв'язувальний білок, який згодом можна вилучити з культурального середовища (якщо клітина-хазяїн секретує в середовище) або прямо з тієї клітини-хазяїна, що виробляє його (якщо він не секретується). Вибір прийнятної клітини-хазяїна залежить від різних чинників, таких як необхідні рівні експресії, поліпептидні модифікації, які бажані або необхідні для активності (такий як глікозилювання або фосфорилювання) і легкості фолдингу в біологічно активну молекулу. Клітина-хазяїн може бути еукаріотичною або прокаріотичною.

Доступні як організми-хазяїни для експресії клітинні лінії ссавців добре відомі в цій галузі техніки і охоплюють, але не обмежуються цим, іморталізовані клітинні лінії, доступні з Американської колекції типових культур (ATCC), а будь-які клітинні лінії, що використовуються у відомій у цій

області експресійної системи, можна застосовувати для одержання рекомбінантних поліпептидів, що є об'єктами за цим винаходом. У загальному випадку клітини-хазяїни трансформують за допомогою рекомбінантних векторів експресії, які містять ДНК, що кодує необхідний поліпептид антитіла до ST2. Серед клітин-хазяїнів, які можна застосовувати у цих цілях, знаходяться прокаріоти, дріжджові або вищі еукаріотичні клітини. Прокаріоти охоплюють грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад, *E. coli* або бацили. Вищі еукаріотичні клітини охоплюють клітини комах і стійкі клітинні лінії, що походять від ссавців. Приклади прийнятних клітинних ліній ссавців охоплюють лінію COS-7 клітин нирок мавп (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), L-клітини, клітини 293, клітини C127, клітини 3T3 (ATCC CCL 163), клітини яєчників китайського хом'яка (CHO) або їх похідні, такі як Veggie CHO і споріднені клітинні лінії, які зростають у безсироваткових середовищах (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31), клітини HeLa, клітинні лінії BHK (ATCC CRL 10) і клітинну лінію CVI/EBNA, одержану з клітинної лінії нирок африканської зеленої мавпи CVI (ATCC CCL 70), як описано в McMahon et al., 1991, EMBO J. 10: 2821, людські ембріональні клітини нирок, такі як 293, 293 EBNA або MSR 293, людські епідермальні клітини A431, людські клітини Colo205, інші трансформовані клітинні лінії приматів, нормальні диплоїдні клітини, клітинні штами, одержані з *in vitro* культури первинної тканини, первинні експлантати, HL-60, U937, Nak або клітини Юрката. В деяких випадках клітинні лінії ссавців, такі як, наприклад, HerG2/3B, KB, NIH 3T3 або S49, можна використовувати для експресії поліпептиду, коли поліпептид необхідно використовувати у різних способах сигнальної трансдукції або репортерних способах. В іншому варіанті реалізації винаходу можна здійснювати вироблення поліпептиду у нижчих еукаріотах, таких як дріжджі, або в прокаріотах, таких як бактерії. Прийнятні види дріжджів охоплюють *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, штами *Kluveromyces*, *Candida* або будь-які дріжджові штами, здатні експресувати гетерологічні поліпептиди. Прийнятні бактеріальні штами охоплюють *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* або будь-які бактеріальні штами, здатні експресувати гетерологічні поліпептиди. Якщо поліпептид одержаний із дріжджів або бактерій, може виникнути необхідність модифікувати поліпептид, що виробляється ними, наприклад, за допомогою фосфорилювання або глікозилювання відповідних ділянок, з метою одержання функціонального поліпептиду. Такі ковалентні приєднання можна здійснити, використовуючи відомі хімічні або ферментативні способи. Також поліпептид можна одержати, функціонально зв'язавши виділену нуклеїнову кислоту, що є об'єктом за цим винаходом, з прийнятними контрольними послідовностями в одному або більше векторі експресії комах і використовуючи експресійну систему комах. Матеріали і способи для експресійних систем на основі клітин бакуловірусів/комах комерційно доступні у вигляді наборів, наприклад, від Invitrogen, San Diego, Calif., U.S.A (MaxBac® kit), а такі способи добре відомі у цій галузі техніки і описані в Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), і Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). Також можна застосовувати безклітинні трансляційні системи для одержання поліпептидів за допомогою РНК, одержаних з розкритих у цьому описі нуклеотидних конструкцій. Прийнятні клонуючі і вектори експресії для застосування в клітинах-хазяїнах бактерій, грибів, дріжджів і ссавців описані в Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985). Клітина-хазяїн, яка містить виділену нуклеїнову кислоту, що є об'єктом за цим винаходом, переважно функціонально пов'язану з щонайменше однією експресійною контрольною послідовністю, називається "рекомбінантною клітиною-хазяїном".

В окремих варіантах реалізації клітинні лінії можуть бути вибрані за допомогою визначення, які клітинні лінії мають високі рівні експресії і постійно виробляють антигензв'язувальні білки з властивостями зв'язування ST2. В іншому варіанті реалізації винаходу може бути вибрана клітинна лінія з лінії В-клітин, яка не виробляє власних антитіл, але має здатність виробляти і секретувати гетерологічні антитіла.

ST2-антигензв'язувальні білки, що руйнують клітини

У переважних варіантах реалізації винаходу ST2-антигензв'язувальний білок зв'язує ST2 і пригнічує зв'язування IL-33, тим самим знижуючи IL-33-опосередковану передачу сигналу в експресуючих ST2 клітинах. При цьому в окремих варіантах реалізації винаходу ST2-антигензв'язувальний білок зв'язує ST2 і націлений на руйнування експресуючих ST2 клітин. Звичайно, ST2-антигензв'язувальний білок може пригнічувати зв'язування IL-33 і бути націленим на руйнування ST2-клітин.

ST2-антигензв'язувальні білки, які руйнують клітини, виключно ефективні при лікуванні захворювань, пов'язаних з надекспресією ST2, наприклад, запальних захворювань або експресуючих ST2 пухлин. Способи націлювання на клітини антигензв'язувальних білків, наприклад, антитіл, добре відомі у цій галузі техніки. Приклади варіантів реалізації обговорюються нижче.

Кон'югати антитіла з лікарською речовиною

Варіанти реалізації цього винаходу охоплюють кон'югати антитіла з лікарською речовиною (ADCs). У загальному випадку ADC містить антитіло, кон'юговане до хіміотерапевтичного агента, наприклад, цитотоксичному агенту, цитостатичному агенту, токсину або радіоактивному агенту.

Для кон'югації лікарської речовини до антитіла можна використовувати лінкерну молекулу. У цій галузі техніки відома множина лінкерів і лікарських речовин, які є прийнятними для застосування в ADC і можуть бути використані в реалізації цього винаходу. (Див. US20090028856; US2009/0274713; US2007/0031402; WO2005/084390; WO2009/099728; US5208020; US5416064; US5475092; 5585499; 6436931; 6372738; і 6340701, які всі включені у цей опис шляхом посилання).

Лінкери

В окремих варіантах реалізації ADC містить лінкер, що складається з одного або більше зв'язувальних компонентів. Приклади зв'язувальних компонентів охоплюють 6-малеїмідокапроїл, малеїмідопропаноїл, валін-цитрулін, аланін-фенілаланін, п-амінобензилоксикарбоніл і ті, які одержують унаслідок кон'югації зі зв'язувальними реагентами, зокрема, але не обмежуючись цим, N-сукцинімідил-4-(2-піридилтіо) пентаноат ("SPP"), N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат («SMCC», що також називається у цьому описі "MCC") і N-сукцинімідил(4-йодацетил) амінобензоат ("SIAB").

Лінкери можуть бути лінкерами, що "відщеплюються", або лінкерами, що "не відщеплюються" (Ducry and Stump, Bioconjugate Chem. 2010, 21, 5-13; у повному обсязі включена в цей опис шляхом посилання). Лінкери, що відщеплюються, сконструйовані таким чином, щоб вивільняти лікарську речовину при дії певних зовнішніх чинників, наприклад, при інтерналізації клітиною-мішенню. Лінкери, що відщеплюються, охоплюють кислотолабільні лінкери, лінкери, чутливі до протеаз, фотолабільні лінкери, лінкери диметилів або лінкери, що містять дисульфід. Лінкери, що не відщеплюються, залишаються ковалентно зв'язаними зі щонайменше однією амінокислотою антитіла і лікарською речовиною при інтерналізації і деградації всередині клітини-мішені. Прикладом лінкера, що не відщеплюється, є MCC.

Лікарські речовини

В окремих варіантах реалізації антитіло кон'юговане до хіміотерапевтичного агента. Приклади хіміотерапевтичних агентів охоплюють алкілюючі агенти, такі як тіотепа і циклофосфамід (CYTOXAN.TM.); алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азириди, такі як бензодоба, карбоквон, метуредоба і уредоба; етиленіміни і метиламеламіни, зокрема алтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід і триметилполмеламін; ацетогеніни (особливо булатацин і булатацинон); камптотетин (зокрема синтетичні аналоги топотекану); бріостатин; калістатин; CC-1065 (зокрема його адозелезинові, карзелезинові і бізелезинові синтетичні аналоги); криптофіцини (особливо криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (зокрема синтетичні аналоги KW-2189 і CBI-TMI); елеутеробін; панкреатистатин; саркодиктін; спонгістатин; азотисті іприти, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамід, естрамустин, іфосфамід, меклоретамін, гідрохлорид оксиду меклоретаміна, мелфалан, новембіксін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урацилпирит; нітросечовина, такі як кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, німустин, ранімуустин; антибіотики, такі як енедіїнові антибіотики (наприклад, каліхеаміцин, особливо каліхеаміцин гамма 1 і каліхеаміцин тета I, див., наприклад, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); динеміцин, зокрема динеміцин А, еспераміцин; а також неокарциностатиновий хромофор і споріднені хромопротейненедеїнові антибіотичні хромофори), аклациномізини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, карабіцин, карміноміцин, карцинофілін; хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубіцин (зокрема морфоліно-доксорубіцин, ціаноморфоліно-доксорубіцин, 2-піроліно-доксорубіцин і дезоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцелломіцин, мітоміцини, мікофенолову кислоту, ногаламіцин, олівоміцини, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, циностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурину, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; аналоги піримідину, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидезоксиуридин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин, 5-FU; андрогени, такі як калустерон, дромостанолон пропіонат, епітіостанол, мелітіостан, тестостерон; анти-адренальні речовини, такі як аміноглутетимід, мітотан, трилостан; компенсатор фолієвої кислоти, такий як фролінієва кислота; ацеглатон; глікозид альдофосфаміду; амінолевулінова кислота; амсакрин; бестрабуцил; бізантрен; едотраксат; дефосфамін; демеколцин; діазиквон; ельфортнітин; ацетат еліптінію; епотилон; етоглуцид; нітрат галію; гідроксисечовина; лентинан; лонідамін; майтанзиноїди, такі як майтанзин і ансамітоцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопідамол; нітракрин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; подофілінова кислота; 2-етилгідразид; прокарбазин; PSK.RTM.; разоксан; ризоксин; сизофуран; спірогерманіум; теназонова кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриетиламін; трихотечени (особливо токсин Т-2, веракурин А, роридин А і ангуїдин); уретан; віндезин; дакарбазин; маномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид ("Ara-C"); циклофосфамід; тіотепа; таксоїди, наприклад, паклітаксел (TAXOL.TM., Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) і доксетаксел (TAXOTERE.RTM., Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабін; 6-тіогуанін; меркаптопурин; ветототрексат;

аналоги платини, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин; платина; етопозид (VP-16); іфосфамід; митоміцин С; мітоксантрон; вінкрисдин; вінорелбін; навелбін; новантрон; теніпозид; дауноміцин; аміноптерин; кселода; ібандронат; CPT-11; інгібітор топоізомерази RFS 2000; диформетилорнітин (ДФМО); ретиноєва кислота; капецитабін; і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-яких вищеперелічених сполук. Також у дане визначення включені антигормональні агенти, які регулюють або інгібують гормональну активність у пухлинах, такі як антиестроген, зокрема, наприклад, тамоксифен, ралоксифен, 4(5)-імідазоли, що інгібують ароматазу, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон і тореміфен (Fareston); і антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід, бікалутамід, лейпролід і гoserелін; міРНК і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-яких вищеперелічених сполук. Інші хіміотерапевтичні агенти, яких можна застосовувати у межах цього винаходу, розкриті в публікації США № 20080171040 або публікації США 20080305044 і у повному обсязі включені у цей опис як посилання.

Передбачається, що антитіло може бути кон'юговане до двох або більше різних хіміотерапевтичних агентів або фармацевтична композиція може містити суміш антитіл, при цьому компоненти антитіл є однаковими за винятком того, що вони кон'юговані до різних хіміотерапевтичних агентів. Подібні варіанти реалізації можуть бути доцільні при націлюванні на множинні біологічні процеси у клітині-мішені.

У переважних варіантах реалізації ADC містить антитіло, кон'юговане до однієї або більше молекул майтанзиноїда, які є мітотичними інгібіторами, що діють шляхом пригнічення полімеризації тубуліну. Майтанзиноїди, зокрема різні модифікації, описані в патентах США № 3896111; 4151042; 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; 4371533; і WO 2009/099728. Лікарські речовини на основі майтанзиноїдів можуть бути виділені з природних джерел, одержані за допомогою рекомбінантних технологій або виготовлені синтетично. Приклади майтанзиноїдів охоплюють С-19-дехлор (патент США № 4256746), С-20-гідрокси (або С-20-деметил) +/- С-19-дехлор (патенти США № 4307016 і 4361650), С-20-деметокси (або С-20-ацилокси (-OCOR) +/- дехлор (патент США № 4294757), С-9-SH (патент США № 4,424,219), С-14-алкоксиметил (деметокси/CH₂OR) (патент США № 4,331,598), С-14-гідроксिमетил або ацилоксиметил (CH₂OH або CH₂OAc) (патент США № 4,450,254), С-15-гідрокси/ацилокси (патент США № 4,364,866), С-15-метокси (патенти США № 4,313,946 і 4,315,929), С-18-N-деметил (патенти США № 4,362,663 і 4,322,348) і 4,5-дезоксид (патент США № 4,371,533).

Залежно від необхідного типу зв'язку як позиції для зв'язування можна використовувати різні позиції у сполуках майтанзиноїдів. Наприклад, для утворення ефірного зв'язку добре підходять позиція С-3, що містить гідроксильну групу, позиція С-14, модифікована гідрозиметилом, позиція С-15, модифікована гідроксильною групою, і позиція С-20, що містить гідроксильну групу (патенти США № 5208020, RE39151 і 6913748; патентні публікації США № 20060167245 і 20070037972, і WO 2009099728).

Переважні майтанзиноїди охоплюють відомі у цій галузі техніки сполуки DM1, DM3 і DM4 (патентні публікації США № 2009030924 і 20050276812, включені у цей опис шляхом посилання).

ADCs, що містять майтанзиноїди, способи одержання таких ADCs і їх терапевтичні застосування описані в патентах США № 5208020 і 5416064, патентній публікації США № 20050276812 і WO 2009099728 (які всі включено у цей опис шляхом посилання). Лінкери, прийнятні для одержання ADCs, що містять майтанзиноїди, відомі в цій галузі техніки (патент США № 5208020 і патентні публікації США № 2005016993 і 20090274713; які всі включено в цей опис шляхом посилання). ADCs, що містять майтанзиноїди, що містять лінкери SMCC, можна одержати згідно опису, наведеному в патентній публікації США № 2005/0276812.

Антитіла з посиленою ефекторною функцією

Однією з функцій Fc-фрагмента антитіла є взаємодія з імунною системою при зв'язуванні антитілом своєї мішені. Це називається "ефекторною функцією". Ця взаємодія призводить до антитілозалежної клітинної цитотоксичності (АЗКЦ), антитілозалежного клітинного фагоцитозу (АЗКФ) та/або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ). АЗКЦ і АЗКФ опосередковуються через зв'язування Fc з Fc-рецепторами на поверхні клітин імунної системи. КЗЦ опосередковується через зв'язування Fc з білками системи комплементу, наприклад, C1q.

Підкласи IgG розрізняються за своєю здатністю опосередковувати ефекторні функції. Наприклад, IgG1 набагато перевершує IgG2 і IgG4 в опосередкуванні АЗКЦ і КЗЦ. Отже, у варіантах реалізації винаходу, які націлені на руйнування клітини, що експресує ST2, переважним буде IgG1-антитіло до ST2.

Ефекторну функцію антитіла можна підвищити або знизити за допомогою введення однієї або більше мутацій у Fc. Варіанти реалізації цього винаходу охоплюють антигензв'язувальні білки, наприклад, антитіла, що містять Fc, сконструйовані таким чином, щоб підвищувати ефекторну функцію (США 7,317,091 і Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009; які обидві у повному обсязі включені у цей опис шляхом посилання). Приклади IgG1 Fc молекул, що мають підвищену

ефекторну функцію, охоплюють (на основі системи нумерації Кабата) такі, що містять наступні заміни: S239D/I332E

S239D/A330S/I332E
S239D/A330L/I332E
S298A/D333A/K334A
P247I/A339D
P247I/A339Q
D280H/K290S
D280H/K290S/S298D
D280H/K290S/S298V
F243L/R292P/Y300L
F243L/R292P/Y300L/P396L
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
G236A/S239D/I332E
K326A/E333A
K326W/E333S
K290E/S298G/T299A
K290N/S298G/T299A
K290E/S298G/T299A/K326E
K290N/S298G/T299A/K326E

Додаткові варіанти реалізації цього винаходу включають антигензв'язувальні білки, наприклад, антитіла, що містять Fc, сконструйовані таким чином, щоб знижувати ефекторну функцію. Приклади Fc молекул, що мають знижену ефекторну функцію, охоплюють (на основі системи нумерації Кабата) такі, що містять наступні заміни:

N297A (IgG1)
L234A/L235A (IgG1)
V234A/G237A (IgG2)
L235A/G237A/E318A (IgG4)
H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)
C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)
C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)
L234F/L235E/P331S (IgG1)
S267E/L328F (IgG1)

Іншим способом підвищення ефекторної функції IgG білків, що містять Fc, є зниження флукозилювання Fc. Видалення ядром фукози з 2-антенарних олігосахаридів комплексного типу, приєднаних до Fc, значно підвищує ефекторну функцію АЗКЦ без зміни у зв'язуванні антигена або ефекторної функції КЗЦ. Відомо декілька способів зниження або припинення флукозилювання молекул, що містять Fc, наприклад, антитіл. Вони включають рекомбінантну експресію в певних клітинних лініях ссавців, зокрема клітинну лінію з генним нокаутом FUT8, варіантну СНО-лінію Lec13, клітинну лінію гібридами щурів YB2/0, клітинну лінію, що містить малу інтерферуючу РНК, специфічну проти гена FUT8, і клітинну лінію, що спільно експресує β -1,4-N-ацетилглюкозамінілтрансферазу III і Гольджі α -манозидазу II. В іншому варіанті молекули, що містять Fc, можуть експресуватися в клітині, що не належить ссавцеві, такий як рослинна клітина, дріжджова або прокаріотична клітина, наприклад, *E. coli*. Отже, у визначених варіантах реалізації винаходу композиція містить антитіло, наприклад, Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10 або Ab11, що характеризується зниженим фукозилюванням або відсутністю флукозилювання.

Фармацевтичні композиції

У деяких варіантах реалізації винаходу запропонована фармацевтична композиція, що містить терапевтично ефективну кількість одного з множини антигензв'язувальних білків, що є об'єктами за цим винаходом, спільно з фармацевтично ефективними розчинниками, носіями, розчинниками, емульгаторами, консервантами та/або ад'ювантами. В окремих варіантах реалізації антигензв'язувальний білок є антитілом. Фармацевтичні композиції, що є об'єктами за цим винаходом, охоплюють, але не обмежуються цим, рідкі, заморожені і ліофілізовані композиції.

Переважно матеріали для виготовлення лікарських препаратів нетоксичні для пацієнта при дозуваннях і концентраціях, що застосовуються. У конкретних варіантах реалізації винаходу запропоновані фармацевтичні композиції, що містять терапевтично ефективну кількість ST2-антигензв'язувального білка, наприклад, ST2-зв'язувального антитіла.

У окремих варіантах реалізації винаходу фармацевтична композиція може містити матеріали для виготовлення лікарських препаратів для модифікації, підтримки або збереження, наприклад, рівня рН, осмолярності, в'язкості, прозорості, кольору, ізотонічності, запаху, стерильності, стабільності, швидкості розчинення або вивільнення, поглинання або проникності композиції. У таких варіантах реалізації винаходу прийнятні матеріали для виготовлення лікарських препаратів охоплюють, але не обмежуються цим, амінокислоти (такі як гліцин, глутамін, аспарагін, аргінін,

пролін або лізин); протимікробні речовини; антиоксиданти (такі як аскорбінова кислота, сульфат натрію або гідрогенсульфат натрію); буфери (такі як борат, бікарбонат, Tris-HCl , цитрати, фосфати або інші органічні кислоти); об'ємоутворювальні агенти (наприклад, маніт або гліцин); хелатуючі агенти (такі як етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТК)); комплексоутворювальні агенти (такі як кофеїн, полівінілпіролідон, бета-циклодекстрин або гідроксипропіл-бета-циклодекстрин), наповнювачі; моносахариди; дисахариди; і інші вуглеводи (такі як глюкоза, маноза або декстрин); білки (такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни); забарвлюючі, ароматизуючі і розбавляючі агенти; емульгатори; гідрофільні полімери (такі як полівінілпіролідон); низькомолекулярні поліпептиди; солетворні протиіони (такі як натрій); консерванти (такі як бензалконійхлорид, бензойна кислота, саліцилова кислота, тимерозал, фенолиловий спирт, метилпарабен, пропілпарабен, хлорексидин, сорбінова кислота або перекис водню); розчинники (такі як гліцерин, поліпропіленгліколь або поліетиленгліколь); цукрові спирти (такі як маніт або сорбіт); суспендуючі агенти; поверхнево-активні речовини або змочувальні агенти (такі як плуроніки, ПЕГ, ефіри сорбітану, полісорбати, такі як полісорбат 20, полісорбат, тритон, трометамін, лецитин, холестерин або тилоксапал); агенти, що підвищують стабільність (такі як сахароза або сорбіт); агенти, що підвищують тонічність (такі як галіди лужних металів, переважно, хлорид натрію або калію або маніт-сорбіт); засоби доставки; розчинники; допоміжні речовини та/або фармацевтичні ад'юванти. Див. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

В окремих варіантах реалізації оптимальна фармацевтична композиція визначається фахівцем у цій галузі техніки залежно від, наприклад, вибраного способу введення, форми доставки і необхідного дозування. Дивитися, наприклад, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, вище. У окремих варіантах реалізації винаходу такі композиції можуть чинити вплив на фізичний стан, стабільність, швидкість *in vivo* вивільнення і швидкість *in vivo* виведення антигензв'язувальних білків, що є об'єктами за цим винаходом. У окремих варіантах реалізації винаходу первинний наповнювач або носій у фармацевтичній композиції може бути водного або неводного походження. Наприклад, прийнятним наповнювачем або носієм може бути вода для ін'єкції, фізіологічний розчин або штучна цереброспінальна рідина, за можливістю, з додаванням інших речовин, що часто застосовуються у композиціях для парентерального введення. Додатковими прикладами носіїв є нейтральний буферний фізіологічний розчин або фізіологічний розчин, змішаний з сироватковим альбуміном. У конкретних варіантах реалізації винаходу фармацевтичні композиції містять Tris -буфер з рівнем рН близько 7,0-8,5 або ацетатний буфер з рН близько 4,0-5,5, і можуть додатково містити сорбіт або його прийнятний замінник. У окремих варіантах реалізації винаходу композиції, що містять ST2-антигензв'язувальний білок, можна підготувати для зберігання шляхом змішування вибраного складу, що має необхідний ступінь очищення, з довільними агентами для приготування лікарського препарату (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, вище) у вигляді ліофілізованої пігулки або водного розчину. Крім того, в окремих варіантах реалізації продукт, що містить ST2-антигензв'язувальний білок, можна виготовити у вигляді ліофілізату, використовуючи відповідні допоміжні речовини, такі як сахарозу.

Для фармацевтичних композицій, що є об'єктами за цим винаходом, можна вибрати парентеральний спосіб доставки. В іншому варіанті реалізації винаходу для композицій можна вибрати інгаляційний спосіб або доставку через травний тракт, наприклад, пероральну. Виготовлення таких фармацевтично прийнятних композицій відоме у цій галузі техніки. Компоненти лікарського препарату переважно містяться в концентраціях, які є прийнятними для цього місця введення. В окремих варіантах реалізації винаходу використовують буфери для підтримки у складі фізіологічного рівня рН або трохи меншого рН, зазвичай, в інтервалі від близько 5 до близько 8.

У випадках, коли передбачається парентеральне введення, терапевтичні композиції для застосування у цьому винаході можуть надаватися у вигляді апірогенного, парентерального прийнятного водного розчину, що містить необхідний ST2-антигензв'язувальний білок у фармацевтично прийнятному носіїві. Виключно прийнятним носієм для парентеральної ін'єкції є стерильна дистильована вода, в якій препарат ST2-антигензв'язувального білка одержують у вигляді стерильного ізотонічного розчину з додаванням відповідних консервантів. У окремих варіантах реалізації винаходу виготовлення лікарського препарату може включати змішування необхідної молекули разом з агентами, такими як мікросфери, що ін'єктуються, біоруйновані частки, полімерні сполуки (такі як полімолочна кислота або полігліколева кислота), гранули або ліпосоми, які можуть забезпечити контрольоване або тривале вивільнення продукту, який потім можна доставити за допомогою ін'єкції речовин сповільненого всмоктування. В окремих варіантах реалізації можна також застосовувати гіалуронову кислоту, яка сприяє тривалому знаходженню в системі циркуляції. У окремих варіантах реалізації винаходу для внесення необхідного антигензв'язувального білка можна використовувати пристрої, що імплантуються, для доставки лікарських речовин.

Фармацевтичні композиції, що є об'єктами за цим винаходом, можна одержати для введення шляхом інгаляції. У цих варіантах реалізації ST2-антигензв'язувальні білки переважно

виготовляють у вигляді сухого інгалюємого порошку. У конкретних варіантах реалізації винаходу інгаляційні розчини, що містять ST2-антигензв'язувальний білок, також можна виготовити разом з пропелентом для аерозольної доставки. В окремих варіантах реалізації розчини можуть розпилятися. Інгаляційне введення і способи виготовлення відповідних лікарських препаратів додатково описані у міжнародній патентній заявці № PCT/US94/001875, яка включена у цей опис шляхом посилання і описує інгаляційне введення хімічно модифікованих білків.

Також передбачається, що лікарські препарати можна вводити перорально. ST2-антигензв'язувальні білки, які вводять у такий спосіб, можна виготовляти з або без носіїв, що зазвичай використовуються при одержанні твердих дозованих форм, таких як пігулки і капсули. У окремих варіантах реалізації винаходу капсулу можна виготовити так, щоб вивільнення активної частини лікарського препарату відбувалося в тому місці шлямково-кишкового тракту, де максимізована біологічна доступність і мінімізована пресистемна деградація. Для полегшення абсорбції ST2-антигензв'язувального білка можна додавати додаткові агенти. Також можна застосовувати розчинники, ароматизатори, легкоплавкий віск, рослинні олії, лубриканти, суспендуєчі агенти, речовини для покращення розпаданості пігулок і зв'язувальні речовини.

Наявність додаткових фармацевтичних композицій очевидна для фахівців у цій галузі техніки, зокрема лікарські препарати, що містять ST2-антигензв'язувальні білки у вигляді, який забезпечує тривалу або контрольовану доставку. Способи для виготовлення великої кількості засобів тривалої або контрольованої доставки, таких як ліпосомні носії, біорозкладані мікрочастки або пористі гранули і ін'єкція речовин сповільненого всмоктування, також відомі фахівцям у цій галузі техніки. Див., наприклад, міжнародну патентну заявку № PCT/US93/00829, яка включена у цей опис шляхом посилання і описує контрольоване вивільнення пористих полімерних мікрочасток для доставки фармацевтичних композицій. Препарати тривалого вивільнення можуть містити напівпроникні полімерні матриці у вигляді формованих виробів, наприклад, плівок або мікрокапсул. Матриці з тривалим вивільненням можуть містити складні полієфіри, гідрогелі, полілактиди (що розкриті в патенті США № 3,773,919 і публікації Європейської патентної заявки № EP 058481, які включені у цей опис шляхом посилання), кополімери L-глутамінової кислоти і гамма-етил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 2:547-556), полі-(2-гідроксietилметакрилат) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 і Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), етиленвінілацетат (Langer et al., 1981, *supra*) або полі-D(-)-3-гідроксимасляну кислоту (публікація Європейської патентної заявки № EP 133,988). Композиції з тривалим вивільненням можуть також містити ліпосоми, які можна одержати одним з декількох відомих у цій галузі техніки способів. Див., наприклад, Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3688-3692; публікації Європейських патентних заявок № EP 036,676; EP 088,046 і EP 143,949, включені шляхом посилання.

Фармацевтичні композиції для *in vivo* введення зазвичай одержують у вигляді стерильних препаратів. Стерилізацію можна здійснити шляхом фільтрації через стерильні фільтруючі мембрани. У випадку, якщо композиція ліофілізована, стерилізацію із застосуванням вказаного способу можна провести як до, так і після ліофілізації і відновлення. Композиції для парентерального введення можна зберігати в ліофілізованій формі або в розчині. Парентеральні композиції зазвичай поміщають у контейнер, що має стерильний вхідний отвір, наприклад, пакет для внутрішньовенного розчину або ємність з пробкою, через яку вводиться гіподермальна голка для ін'єкції.

Аспекти цього винаходу включають препарати ST2-антигензв'язувального білка, які самі слугують буфером і які можна застосовувати як фармацевтичні композиції, як описано у міжнародній патентній заявці WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599), яка включена у цей опис у повному обсязі шляхом посилання.

Як обговорювалося вище, в окремих варіантах реалізації запропоновані композиції, що містять ST2-антигензв'язувальні білки, зокрема, фармацевтичні композиції, що містять ST2-антигензв'язувальні білки, які окрім ST2-антигензв'язувального білка містять одну або більше допоміжних речовин, таких як ті, що описані в ілюстративних цілях у цьому розділі і в інших частинах опису. У зв'язку з цим, допоміжні речовини можна використовувати у винаході у різних цілях, таких як регулювання фізичних, хімічних або біологічних властивостей лікарських препаратів, наприклад, регулювання в'язкості, та/або у способах згідно цьому винаходу для того, щоб покращити ефективність та/або стабілізувати такі лікарські препарати або способи відносно деградації і псування внаслідок, наприклад, дій, які можуть мати місце під час виробництва, перевезення, зберігання, попереднього приготування, введення і так далі.

Доступна велика кількість робіт по стабілізації білка і способам і матеріалам для виготовлення препаратів, що використовуються у зв'язку з цим, таких як Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations", *Pharm Res.* 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution", у: *RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE*, Carpenter and Manning, eds. *Pharmaceutical Biotechnology*. 13: 61-84 (2002), і Randolph et al., "Surfactant-protein interactions", *Pharm Biotechnol.* 13: 159-75 (2002), які всі у повному обсязі включені у цей опис шляхом посилання, зокрема, у розділах, що стосуються

допоміжних речовин і відповідних способів приготування білкових препаратів згідно цьому винаходу, які самі служать буфером, особливо, до білкових фармацевтичних продуктів і способів застосування у ветеринарії і медицині людини.

Згідно деяким варіантам реалізації винаходу можна використовувати солі для того, щоб, наприклад, регулювати іонну силу та/або ізотонічність лікарського препарату та/або покращити розчинність та/або фізичну стабільність білка або іншого інгредієнта композиції згідно з винаходом.

Як добре відомо, іони можуть стабілізувати нативний стан білків за допомогою зв'язування із зарядженими залишками на поверхні білка і за допомогою екранування заряджених і полярних груп на білка і зменшення сили їх електростатичної взаємодії, тяжіння і відштовхування. Також іони можуть стабілізувати денатурований стан білка, зокрема, за допомогою зв'язування з денатурованими пептидними зв'язками (--CONH) білка. Більше того, іонна взаємодія із зарядженими і полярними групами на білка також може зменшити внутрішньомолекулярну електростатичну взаємодію і, тим самим, запобігти або знизити агрегацію пептиду і нерозчинність.

Різновиди іонів істотно розрізняються по своїй дії на білки. Було створено велику кількість класифікацій для іонів і їх дії на білки, які можна використовувати при виготовленні фармацевтичних композицій згідно цього винаходу. Одним з прикладів є ряд Гофмейстера, в якому іонні і полярні неіонні розчини розташовуються відповідно до своєї дії на конформаційну стабільність білків у розчині. Стабілізуючі розчини називаються "космотропними". Дестабілізуючі розчини називаються "хаотропними". Космотропи зазвичай використовують при високих концентраціях (наприклад, >1-молярного сульфату амонію) для преципітації білків з розчину ("висолювання"). Хаотропи зазвичай використовують для денатурації та/або розчинення білків ("усолювання"). Відносна ефективність іонів при "усолюванні" і "висолюванні" визначає їх положення у ряді Гофмейстера.

Згідно різним варіантам реалізації винаходу у препаратах, що містять, ST2-антигензв'язувальний білок, можна застосовувати вільні амінокислоти як об'ємоутворювальні агенти, стабілізатори і антиоксиданти, а також для інших стандартних застосувань. Лізин, пролін, серин і аланін можна використовувати для стабілізації білків у препаратах. Гліцин є прийнятним для застосування в ліофілізації для того, щоб гарантувати правильну структуру і властивості пігулок. Аргінін можна застосовувати для пригнічення агрегації білка, як у рідких, так і в ліофілізованих препаратах. Метіонін є прийнятним як антиоксидант.

Поліоли охоплюють цукри, наприклад, маніт, цукрозу і сорбіт, і багатоатомні спирти, такі як, наприклад, гліцерол і пропіленгліколь, і, з метою обговорення у цьому описі, поліетиленгліколь (ПЕГ) і споріднені сполуки. Поліоли є космотропними. Вони є прийнятними стабілізуючими агентами як у рідких, так і в ліофілізованих препаратах, для захисту білка від фізичних і хімічних процесів деградації. Також поліоли застосовні для регулювання тонічності препаратів.

Серед поліолей, що застосовуються у вибраних варіантах реалізації, можна назвати маніт, який зазвичай використовують для гарантії структурної стабільності пігулки в ліофілізованих препаратах. Він забезпечує структурну стабільність пігулки. Як правило, його використовують разом з ліопротектантом, наприклад, цукрозою. Сорбіт і цукроза є одними з переважних агентів для регулювання тонічності і як стабілізатори для захисту при заморожуванні-розморожуванні під час транспортування або при виготовленні великих об'ємів препаратів під час процесу виробництва. Відновні цукри (які містять альдегідні або кетоніві групи), такі як глюкоза і лактоза, можуть глікувати поверхневі залишки лізину і аргініну. Отже, у загальному випадку вони не є переважними поліолями для застосування згідно винаходу. Додатково, цукри, які утворюють такі реактивні сполуки, такі як цукроза, яка в кислотних умовах гідролізується до фруктози і глюкози, і, отже, стимулює глікування, також не є в даному відношенні переважними поліолями згідно винаходу. ПЕГ застосовують для стабілізації білків і як кріопротектант, і він також може бути в цьому відношенні застосований у винаході.

Варіанти реалізації фармацевтичних композицій, що містять ST2-антигензв'язувальні білки, додатково включають поверхнево-активні речовини. Білкові молекули можуть адсорбуватися на поверхнях і денатурувати з подальшою агрегацією на поверхнях розділу повітря-рідина, тверде тіло-рідина і рідина-рідина. У загальному випадку ці ефекти є зворотно пропорційними концентрації білка. Ці шкідливі взаємодії, як правило, є зворотно пропорційними до концентрації білка і зазвичай посилюються при фізичній дії, такій як та, що виникає під час транспортування і експлуатації продукту.

Поверхнево-активні речовини зазвичай використовують для запобігання, мінімізації або зниження фізичної адсорбції. Корисні у цьому відношенні поверхнево-активні речовини згідно винаходу охоплюють полісорбат 20, полісорбат 80, інші ефіри жирних кислот поліетоксилатів сорбітану і полксамер 188.

Поверхнево-активні речовини зазвичай використовують для контролю конформаційної стабільності білка. У зв'язку з цим використання поверхнево-активних речовин є специфічним для білка, оскільки будь-яка задана поверхнево-активна речовина, як правило, стабілізує одні білки і дестабілізує інші.

Полісорбати сприйнятливі до окислювальної деградації і часто, у тому вигляді, в якому вони поставляються, містять достатню кількість пероксидів для того, щоб призвести до окислення бічних ланцюгів білкових залишків, особливо, метіоніну. Отже, застосовувати полісорбати слід обережно, і використовувати при найнижчій ефективній концентрації. У даному відношенні полісорбати відображують загальне правило, що допоміжні речовини слід застосовувати при найнижчих ефективних концентраціях.

Варіанти реалізації фармацевтичних композицій, що містять ST2-антигензв'язувальні білки, додатково охоплюють один або більше антиоксидантів. Шкідливому ефект від окислення білків у фармацевтичних препаратах можна у деякій мірі запобігти за допомогою підтримки належного рівня атмосферного кисню і температури і за допомогою запобігання окислювальній деградації білків. Серед корисних у цьому відношенні антиоксидантів можна назвати відновні агенти, акцептори кисню/вільних радикалів і хелатуючі агенти. Антиоксиданти для застосування у терапевтичних білкових препаратах згідно винаходу переважно є водорозчинними і зберігають свою активність упродовж терміну зберігання продукту. В цьому відношенні ЕДТК є переважним антиоксидантом згідно винаходу.

Антиоксиданти можуть пошкодити білки. Наприклад, відновні агенти, такі як, зокрема, глутатіон, можуть руйнувати внутрішньомолекулярні дисульфідні зв'язки. Отже, антиоксиданти для застосування у цьому винаході вибирають так, щоб, серед іншого, усунути або істотно знизити можливість пошкодження ними білків у препаратах.

Препарати згідно винаходу можуть містити іони металів, які є кофакторами білка і необхідні для утворення білкових координаційних комплексів, такі як цинк, який необхідний для одержання визначених інсулінових суспензій. Іони металів також можуть пригнічувати деякі процеси, в ході яких відбувається деградація білка. При цьому іони металів також каталізують фізичні і хімічні процеси, у ході яких відбувається деградація білка.

Іони магнію (10-120 мМ) можна застосовувати для пригнічення ізомеризації аспарагінової кислоти до ізоаспарагінової кислоти. Іони Ca^{+2} (до 100 мМ) можуть збільшувати стабільність людської дезоксирибонуклеази. Mg^{+2} , Mn^{+2} і Zn^{+2} , при цьому, можуть дестабілізувати рлДНКазу. Аналогічно, Ca^{+2} і Sr^{+2} можуть стабілізувати фактор VIII, але він може бути дестабілізований Mg^{+2} , Mn^{+2} і Zn^{+2} , Cu^{+2} і Fe^{+2} , а його агрегація може бути посилена іонами Al^{+3} .

Варіанти реалізації фармацевтичних композицій, що містять ST2-антигензв'язувальні білки, додатково охоплюють один або більше консервантів. Консерванти необхідні при розробці парентеральних препаратів, розрахованих на багаторазове дозування, яке має на увазі неодноразове використання препарату з одного і того самого контейнера. Їх первинною функцією є пригнічення мікробного росту і гарантія стерильності продукту упродовж терміну зберігання або терміну використання лікарського продукту. Зазвичай консерванти, що використовуються, містять бензиловий спирт, фенол і м-крезол. Хоча консерванти мають довгу історію спільного застосування з низькомолекулярними парентеральними препаратами, розробка білкових препаратів, які містять консерванти, може бути ускладнена. Консерванти практично завжди надають дестабілізуючий ефект (агрегації) на білки, і це стало основним чинником, що обмежує їх застосування у препаратах, розрахованих на багаторазове дозування. У даний час більшість білкових лікарських препаратів виготовляють лише для одноразового застосування. Проте, у тих випадках, коли можливі препарати, розраховані на багаторазове дозування, вони мають додаткову перевагу, що полягає у зручності для пацієнта, і підвищену конкурентоспроможність на ринку продажів. Хорошим прикладом є людський гормон росту (hGH), для якого розробка препаратів, що містять консерванти, призвела до комерційної реалізації зручнішого багаторазового шприца-ручки. Щонайменше чотири таких пристрої-ручки, що містять препарати hGH з консервантами, доступні на цей момент на ринку продажів. Нордитропін (рідина, Novo Nordisk), нутропін AQ (рідина, Genentech) і генотропін (ліофілізований, з двокамерним картриджем, Pharmacia & Upjohn) містять фенол, тоді як соматроп (Eli Lilly) виготовлений з додаванням м-крезолу.

При виготовленні і розробці дозованих форм, що містять консерванти, потрібно брати до уваги деякі аспекти. Ефективна концентрація консерванта в лікарському продукті має бути оптимізованою. Це вимагає дослідження заданого консерванта у формі дозування в діапазоні концентрацій, який забезпечує протимікробну дію без зниження стабільності білка.

Слід чекати, що розробка рідких лікарських препаратів, що містять консерванти, є важчим завданням, ніж у випадку ліофілізованих препаратів. Сублімовані продукти можна ліофілізувати без консервантів і відновити у розчиннику, що містить консервант, перед використанням. Це знижує час контакту консерванта і білка, що істотно мінімізує пов'язаний з таким контактом ризик дестабілізації. У випадку рідких лікарських препаратів ефективність консерванта і стабільність повинні підтримуватися упродовж всього терміну зберігання продукту (близько від 18 до 24 місяців). Важливим моментом є те, що консервант повинен проявляти ефективність у кінцевому препараті, що містить активну лікарську речовину і всі допоміжні компоненти.

У загальному випадку препарати ST2-антигензв'язувальних білків повинні розроблятися з

урахуванням визначених способів і методів застосування, для визначених дозувань, що застосовуються, і частоти застосування, для визначених видів лікування визначених захворювань і у визначених діапазонах біологічної доступності і стійкості серед іншого. Отже, лікарські препарати згідно цього винаходу можна розробити для доставки будь-яким відповідним способом, зокрема, але не обмежуючись цим, пероральним, внутрішньовушним, офтальмологічним, ректальним і вагінальним, а також парентеральними способами, зокрема внутрішньовенну і внутрішньоартеріальну ін'єкцію, внутрішньом'язову ін'єкцію і підшкірну ін'єкцію.

Після виготовлення фармацевтична композиція можна зберігати в стерильних флаконах у вигляді розчину, суспензії, гелю, емульсії, у твердому стані, в кристалічному стані або у вигляді дегідратованого або ліофілізованого порошку. Такі препарати можна зберігати як у готовій для застосування формі, так і у формі (наприклад, ліофілізованої), яка відновлюється перед застосуванням. Також у винаході запропоновані набори для одержання одноразової дози препарату. Набори, що є об'єктами за цим винаходом, можуть містити перший контейнер, що містить сухий білок, і другий контейнер, що містить водний препарат. У окремих варіантах реалізації цього винаходу запропоновані набори, що містять мультикамерні заздалегідь наповнені шприци (наприклад, шприци з рідиною або шприци з ліофілізатом).

Застосована терапевтично ефективна кількість фармацевтичного складу, що містить ST2-антигензв'язувальний білок, залежить, наприклад, від терапевтичного контексту і обставин. Для фахівця у цій галузі техніки зрозуміло, що прийнятні рівні дозування для лікування частково залежать від молекули, що доставляється, у ролі якої використовується ST2-антигензв'язувальний білок, способу застосування і параметрів (маса тіла, площа поверхні тіла і розмір органів) і стану (віку і загального здоров'я) пацієнта. В окремих варіантах реалізації лікар, який лікує, може титрувати дозування і модифікувати спосіб застосування для одержання оптимального терапевтичного ефекту. Типовий діапазон дозувань складає від близько 0,1 мкг/кг до близько 30 мг/кг або більше залежно від вищезазначених чинників. У конкретних варіантах реалізації діапазон дозувань може складати від 1,0 мкг/кг до близько 20 мг/кг, у деяких випадках – від 10 мкг/кг до близько 100 мкг/кг або від 100 мкг/кг до близько 5 мг/кг.

Застосування терапевтично ефективної кількості ST2-антигензв'язувального білка переважно призводить до зниження міри важкості симптомів захворювання, збільшення частоти або тривалості періодів відсутності симптомів захворювання або запобігання появі патологій або інвалідності внаслідок ураження хворобою.

Фармацевтичні композиції можна вводити за допомогою медичних інструментів. Приклади медичних інструментів для введення фармацевтичних композицій описані в патентах США № 4,475,196; 4,439,196; 4,447,224; 4,447, 233; 4,486,194; 4,487,603; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 5,064,413; 5,312,335; 5,312,335; 5,383,851; і 5,399,163, які всі включені у цей опис шляхом посилання.

Способи діагностики або лікування захворювань і порушень, пов'язаних з ST2

ST2-антигензв'язувальні білки, що є об'єктами за цим винаходом, застосовні, зокрема, для детектування ST2 у біологічному зразку. В окремих варіантах реалізації біологічний зразок, одержаний від пацієнта, приводять у контакт з ST2-антигензв'язувальним білком. Потім детектують зв'язування ST2-антигензв'язувального білка з ST2, щоб визначити наявність відносної кількості ST2 у зразку. Такі способи можуть бути корисні для діагностики або виявлення пацієнтів, які сприйнятливі до лікування ST2-антигензв'язувальним білком.

У окремих варіантах реалізації ST2-антигензв'язувальний білок, що є об'єктом за цим винаходом, застосовують для діагностики, детектування або лікування аутоімунних або запальних захворювань. При лікуванні аутоімунних або запальних захворювань ST2-антигензв'язувальний білок може бути націлений на експресуючі ST2 клітини імунної системи для їх руйнування та/або може блокувати взаємодію ST2 і IL-33.

Захворювання, які пов'язані і опосередкованою IL-33 передачею сигналу, виключно сприйнятливі до лікування одним або більше ST2-антигензв'язувальними білками, розкритими у цьому описі. Такі захворювання охоплюють, але не обмежуються цим, запалення, аутоімунне захворювання, паранеопластичні аутоімунні захворювання, запалення хрящової тканини, фіброзуючі хвороби та/або руйнування кісткової тканини, артрит, ревматоїдний артрит, ювенільний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит, пауциартикулярний ювенільний ревматоїдний артрит, поліартикулярний ювенільний ревматоїдний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит з системним початком, ювенільний анкілозуючий спондиліт, ювенільний ентевропатичний артрит, ювенільний реактивний артрит, ювенільний синдром Рейтера, SEA-синдром (синдром серонегативної ентевропатії і артропатії), ювенільний дерматоміозит, ювенільний псоріатичний артрит, ювенільну склеродермію, ювенільний системний червоний вовчак, ювенільний васкуліт, пауциартикулярний ревматоїдний артрит, поліартикулярний ревматоїдний артрит, ревматоїдний артрит з системним початком, анкілозуючий спондиліт, ентевропатичний артрит, реактивний артрит, синдром Рейтера, SEA-синдром (синдром серонегативної ентевропатії і артропатії), дерматоміозит, псоріатичний артрит, склеродермію, системний червоний вовчак, васкуліт, мієліт, поліомієліт, дерматоміозит,

вузликовий поліартеріїт, гранулематоз Вегенера, артеріїт, ревматичну поліміалгію, саркоїдоз, склеродерму, склероз, первинний склероз жовчних проток, склерозуючий холангіт, синдром Шегрена, псоріаз, плямистий псоріаз, каплевидний псоріаз, псоріаз складок, псоріаз пустули, еритродермічний псоріаз, дерматит, atopічний дерматит, атеросклероз, вовчак, хворобу Стілла, системний червоний вовчак (ВКВ), міастенію гравіс, запальне захворювання кишечника (ЗЗК), хворобу Крону, виразковий коліт, глютену хворобу, множинний склероз (МС), астму, ХОЗЛ, риносинусит, риносинусит з поліпами, еозинофільний езофагіт, еозинофільний бронхіт, хвороба Гійєна-Барре, цукровий діабет типу I, тиреоїдит (наприклад, хвороба Грейвса), хвороба Адісона, феномен Рейно, аутоімунний гепатит, хронічна БТПХ, відторгнення при трансплантації, пошкодження нирок і тому подібне.

У переважних варіантах реалізації аутоімунним або запальним захворюванням є астма, хронічне обструктивне захворювання легенів, легеневий фіброз, сепсис і травми, ВІЛ-інфекція, системний червоний вовчак, запальне захворювання кишечника, ревматоїдний артрит, склероз, гранулематоз Вегенера, хвороба Бехчета, серцевосудинне захворювання, риносинусит, назальний поліпоз і еозинофільний бронхіт.

У окремих варіантах реалізації ST2-антигензв'язувальний білок, що є об'єктом за цим винаходом, застосовують для діагностики, детектування або лікування раку або пухлинного захворювання. При лікуванні раку або пухлинного захворювання ST2-антигензв'язувальний білок може бути націлений на клітини, що експресують ST2, для їх руйнування і може блокувати взаємодію ST2 і IL-33, тим самим знижуючи опосередковану IL-33 передачу сигналу. Наприклад, висока експресія розчинного ST2 пов'язана з підвищенням виживаності серед пацієнтів з раком молочної залози. (Prechtel et al, Lab Invest (2001) 81:159-165). Оскільки розчинний ST2 зв'язує і блокує опосередковану IL-33 передачу сигналу, передбачається, що ST2-антигензв'язувальні білки, які блокують опосередковану IL-33 передачу сигналу, виявляться ефективними, сприяючи підвищенню виживаності серед пацієнтів з раком молочної залози. Рак або пухлинні захворювання, які можна діагностувати, детектувати або лікувати за допомогою ST2-антигензв'язувального білка, охоплюють, але не обмежуються цим, тверді пухлини в цілому, рак легенів, рак яєчників, рак молочної залози, рак простати, рак ендометрію, рак нирок, рак стравоходу, рак підшамкової залози, плоскоклітинну карциному, увеальну меланому, рак шийки матки, колоректальний рак, рак сечового міхура, мозку, підшамкової залози, голови, шиї, печінки, лейкемію, лімфому і хворобу Ходжкіна, множинну мієлому, меланому, рак шлямково-кишкового тракту, астроцитому, рак шлунку і аденокарциному легені.

Антигензв'язувальні білки можна використовувати для пригнічення росту пухлин, прогресу та/або метастазу. Таке пригнічення можна відстежувати за допомогою різних способів. Наприклад, пригнічення може призвести до зниження розміру пухлини та/або зниження метаболічної активності всередині пухлини. Обидва ці параметри можна визначити, наприклад, за допомогою МРТ- або ПЕТ-сканування. Також пригнічення можна відстежувати за біопсією для того, щоб встановити рівень некрозу, загибелі пухлинних клітин і рівня васкулярності усередині пухлини. Ступінь метастазу можна відстежувати за допомогою відомих способів.

Приклади

Наступні приклади, практичні і теоретичні, наведені для того, щоб проілюструвати конкретні варіанти реалізації або відмітні ознаки цього винаходу, але при цьому не обмежують його обсяг.

Приклад 1: Антитіла до ST2 ефективні у мишачій моделі астми

Цей приклад демонструє, що введення антитіл, які зв'язують ST2 і пригнічують IL-33-опосередковану передачу сигналу, є ефективним у тваринній моделі запального захворювання, тобто, астми. Нейтралізуюче мишаче ST2 mAb (ST2-сурогатне mAb) пригнічувало активність IL-33, що вводилося екзогенно *in vivo*. Мишам інтраназально вводили 200 нг рекомбінантного мишачого IL-33 через дві години після внутрішньовенної ін'єкції 100 мкг анти-ST2 mAb. Наступного дня визначали концентрації IL-5 у рідині бронхоальвеолярного лаважа (РБАЛ) за допомогою ELISA. Контрольні концентрації IL-5 отримували з РБАЛ мишей, оброблених сольовим розчином перед введенням сольового розчину. Максимальні концентрації IL-5 у РБАЛ були одержані для ізотипічних контрольних оброблених мишей Ig, яким вводили IL-33. Порівняно з ізотипічною контрольною обробкою Ig, обробка ST2 mAb призвела до істотного пригнічення IL-33-індукованого IL-5 у РБАЛ обох мишачих штамів – BALB/c і C57BL/6 (Фіг. 1).

ST2-сурогатне mAb проявило ефективність в індукованій алергеном (CRA) таргана моделі астми, при цьому в РБАЛ мишей, оброблених антитілами до ST2, містилося істотно менше еозинофілів, ніж в ізотипічних контрольних оброблених мишей Ig. Мишам BALB/c вводили 100 мкг CRA на 1, 3, 6, 8, 10 і 13 днів. Мишам робили ін'єкцію 250 мкг або анти-ST2 mAb або ізотипічного контрольного Ig на 0, 7 і 13 днів, причому на 13 день ін'єкцію антитіл проводили перед останнім інтраназальним введенням CRA. На 14 день мишей анестезували і проводили лаваж легенів. Клітинні популяції РБАЛ оцінювали кількісно, а обробка анти-ST2 mAb призвела до істотно меншої загальної кількості клітин РБАЛ, при цьому еозинофіли складали незначну частину клітинної популяції (Фіг. 2).

Приклад 2: Одержання антитіл до ST2 з використанням платформи Xenomouse®

Дослідження генерації повністю людських антитіл, направлених проти людського ST2, проводили, використовуючи технологію XENOMOUSE® (патенти США № 6,114,598; 6,162,963; 6,833,268; 7,049,426; 7,064,244, які у повному обсязі включені у цей опис шляхом посилання; Green et al., 1994, *Nature Genetics* 7:13-21; Mendez et al., 1997, *Nature Genetics* 15:146-156; Green and Jakobovitis, 1998, *J. Ex. Med.* 188:483-495, Kellermann and Green, 2002, *Current Opinion in Biotechnology*, 13:593–597).

Імунізацію XMG2K, XMG4K і XMG4KL XENOMOUSE® тварин проводили як поліпептидом, що містить позаклітинний домен людського ST2, зшитий з Fc-доменом людського антитіла, так і людським гібридним білком ST2-Fc, комплексованим з людським IL-33. Прийнятну кількість імуногена (тобто, десять мкг/миша розчинного ST2) використовували для первинної імунізації XENOMOUSE® тварин згідно зі способами, описаними у патентній заявці США, серійний № 08/759,620, зареєстрованої 3 грудня 1996 р., і міжнародних патентних заявках № WO 98/24893, опублікованій 11 червня 1998 р., і WO 00/76310, опублікованій 21 грудня 2000 р., описи яких включені у цей опис шляхом посилання. Після первинної імунізації проводили послідовні бустерні імунізації імуногена (п'ять мкг/миша розчинного ST2 або комплексу ST2/IL33) згідно схеми і впродовж терміну, необхідного, щоб індукувати необхідний титр антитіл до ST2 у мишей. Титри визначали прийнятним способом, наприклад, ELISA або за допомогою сортування флуоресцентно-активованих клітин (FACs).

Визначали тварин з прийнятними титрами і лімфоцити, одержані з дренуючих лімфатичних вузлів, і, за необхідності, об'єднані для кожної групи. Лімфоцити виділяли з лімфоїдної тканини за допомогою розмелювання у прийнятному середовищі (наприклад, середовищі Ігла, модифікованому за способом Дульбекко; DMEM, що надається Invitrogen, Carlsbad, CA) для вивільнення клітин із тканин і суспендували в DMEM. В-клітини відбирали та/або збагачували прийнятним способом і зшивали з прийнятними партнерами по злиттю, наприклад, клітинами P3X63Ag8.653 несекреторної мієломи (Американська колекція типових культур CRL 1580; Kearney et al, *J. Immunol.* 123, 1979, 1548-1550), за допомогою відомих у цій галузі техніки способів.

В одному способі злиття лімфоцити змішували з клітинами-партнерами по злиттю у співвідношенні 1:4. Клітинну суміш акуратно пелетували за допомогою центрифугування при 400 x g упродовж 4 хвилин, супернатант зціджували, а клітинну суміш акуратно перемішували (наприклад, за допомогою 1 мЛ піпетки). Злиття індукували ПЕГ/ДМСО (поліетилєнглїколь/диметилсульфоксид; Sigma-Aldrich, що надається, St. Louis, MO; 1 мЛ на мільйон лімфоцитів). ПЕГ/ДМСО додавали повільно, акуратно струшували через одну хвилину з подальшим перемішуванням впродовж однієї хвилини. Потім через 2 хвилини додавали IDMEM (DMEM без глутаміну; 2 мЛ на мільйон В-клітин), акуратно струшуючи, з подальшим додатковим додаванням IDMEM (8 мЛ на мільйон В-клітин) через 3 хвилини.

Злиті клітини акуратно пелетували (400 x g, 6 хвилин) і перерозчиняли в 20 мЛ селекційного середовища (DMEM, що містить азасерин і гіпоксантин [HA] і інші допоміжні речовини у випадку потреби) на мільйон В-клітин. Клітини інкубували упродовж 20-30 хвилин при 37°C і потім перерозчиняли в 200 мЛ селекційного середовища і культивували від трьох до чотири днів у колбах T175 перед висіванням у 96-ямкові планшети.

Клітини розподіляли по 96-ямкових планшетах, використовуючи стандартні способи для максимізації клональності одержаних у результаті колоній. Після декількох днів культивування супернатанти збирали і проводили скринінгове дослідження. Скринінг гібридомних супернатантів, одержаних з мишей, імунізованих комплексом ST2-Fc/IL33, проводили способом на основі ELISA, використовуючи 96-ямкові планшети полістиролів ELISA, пасивно покриті на ніч при 4°C 0,5 мкг/мЛ ST2-Flag/his, комплексованим до людського IL-33. Для визначення специфічного зв'язування ST2 проводили другий ELISA-скринінг, використовуючи 96-ямкові планшети полістиролів, пасивно покриті на ніч при 4°C 10 мкг/мЛ нейтравідину. Потім планшети відмивали і завантажували 0,5 мкг/мЛ біотинільованого людського IL33. За допомогою цього ELISA-скринінгу ідентифікували більше 1200 анти-ST2 специфічних зв'язувальних елементів.

Скринінг гібридомних супернатантів, одержаних із мишей, імунізованих розчинним ST2-Fc, для виявлення ST2-антигенспецифічних антитіл здійснювали способом флуоресцентного мікрооб'ємного дослідження (FMAT), проводячи скринінг відносно рекомбінантних клітин HEK293T, тимчасово трансфікованих повнорозмірним людським ST2, і контрскринінг відносно хибнотрансфікованих клітин HEK293T. Коротко, клітини висівали у 384-ямкові планшети FMAT в об'ємі 40 мкл/ямку зі густиною 6,000 ST2-позитивних клітин/ямку і 14,000 хибнотрансфікованих ST2-негативних клітин/ямку. Потім додавали гібридомний супернатант і залишали для зв'язування на 1 годину при кімнатній температурі з подальшим відмиванням і вторинною детекцією з використанням вторинного антитіла до людського Fc- γ 5. За допомогою даного FMAT-скринінгу ідентифікували більше 2200 анти-ST2 специфічних зв'язувальних елементів з гібридом, одержаних з мишей, імунізованих позаклітинним доменом ST2.

Потім цю комбіновану панель з 3400 анти-ST2 специфічних гібридомних супернатантів

додатково досліджували на предмет здатності функціонально протидіяти передачі сигналу ST2, застосовуючи аналіз вивільнення цитокіна інтерферон- γ . Коротко, очищені людські мононуклеарні клітини периферійної крові (ОМКПК) або очищені людські NK-клітини висівали у 96-ямкові планшети для тканинного культивування і стимулювали людськими IL-33 і IL-12, індуючи вивільнення інтерферону-гамма в супернатант. Проводили кількісну оцінку рівнів інтерферону-гамма в супернатанті, і виявили, що вони прямо корелюють з IL-33/ST2-залежною передачею сигналу. За допомогою цього біоаналізу зразки гібридом досліджували на предмет здатності блокувати вивільнення інтерферону-гамма за допомогою блокування сигнального шляху ST2. За допомогою цього скринінгу ідентифікували 578 гібридомних супернатантів, одержаних унаслідок імунізації ST2-Fc, які пригнічують вивільнення інтерферону-гамма більше ніж на 80%. Додатково, ідентифікували 505 гібридомних супернатантів, одержаних унаслідок імунізації комплексом ST2Fc/IL-33, які пригнічують вивільнення інтерферону-гамма більше ніж на 70%.

Потім цю панель з 1083 гібридомних супернатантів додатково досліджували на предмет перехресно-реактивного зв'язування з ST2 мишей і яванських макак, на предмет градації відносної афінності за допомогою обмеженого способу ELISA для антигенів, на предмет біохімічного блокування рецепторів/лігандів за допомогою ELISA, і на предмет ендogenous зв'язування за допомогою FACs, використовуючи клітинні лінії. Дані, одержані у цих вторинних дослідженнях, використовували для розділення великої панелі на 2 групи по 40 гібридомних ліній, які потім субклонували, нарощували їх клітинну масу і очищали.

Приклад 3: Визначення K_D

У цьому прикладі визначали афінність ST2-зв'язувальних антитіл. Проводили оцінку способом поверхневого плазмонного резонансу, використовуючи оптичний біосенсор Proteon XPR-36, обладнаний сенсорним чіпом GLC (Bio-Rad). Біосенсорний аналіз проводили при 25°C у буферній системі HBS-EP+ (1X) (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3,0 mM EDTA, 0,05% сурфактанту P20, GE Healthcare). До ін'єкції всі реагенти зберігали при 8°C.

Козячий антилюдський IgG (специфічний до Fc-фрагмента, Jackson ImmunoResearch) іммобілізували на поверхні сенсора у вертикальному напрямку шляхом стандартного сполучення аміну на лініях 1-6 (~4000 к.е.), а потім блокували етаноламіном. Антитіла іммобілізували (~40–100 к.е.) у вертикальному напрямку на лініях 1-5. Вертикальну лінію 6 залишали порожньою і використовували як контроль. Дані отримували для груп, що містять по 15 антитіл (три підгрупи по 5).

Реагенти ST2 (людини або яванської макаки) доводили в робочому буфері до концентрації 25 нМ, а потім 3-кратно розбавляли до 309 нМ. За допомогою одиначної ін'єкції в горизонтальному напрямку доставляли серії молекул ST2, що містять їх повну концентрацію, використовуючи буфер для того, щоб укомплектувати ряд з шести зразків і забезпечити наявність потокового подвійного контролю для даних у відповідь. Швидкості асоціації (3 хв) і дисоціації (30 хв) фіксували при швидкості потоку 100 мкл/хв.

Поверхню відновлювали при швидкості потоку 100 мкл/хв., використовуючи 10 mM гліцину (pH 1,5, 30 мкл).

Дані коректували відносно базису, відбирали необхідні, вибудовували в ряд, віднімали контроль (interspot), а потім описували 1:1 моделлю зв'язування за допомогою ProteOn Manager (версія 2.1.2.05). Результати наведені в Таблиці 4.

Таблиця 4

Антитіло	Аналіт	k_a	k_d	K_D (нМ)	Антитіло	Аналіт	k_a	k_d	K_D (нМ)
Ab12	ST2 яв. мак.	2,50E+06	5,60E-05	22,5	Ab12	ST2 люд.	2,35E+06	3,41E-05	14,5
Ab13	ST2 яв. мак.	1,40E+06	1,80E-04	128,0	Ab13	ST2 люд.	1,30E+06	9,12E-05	70,3
Ab14	ST2 яв. мак.	3,57E+06	1,59E-03	445,0	Ab14	ST2 люд.	4,22E+06	2,57E-05	6,1
Ab15	ST2 яв. мак.	2,67E+06	6,23E-05	23,4	Ab15	ST2 люд.	1,83E+06	5,38E-05	29,3
Ab16	ST2 яв. мак.	2,61E+06	2,18E-04	83,7	Ab16	ST2 люд.	1,28E+06	1,47E-04	115,0
Ab17	ST2 яв. мак.	3,38E+06	1,43E-04	42,2	Ab17	ST2 люд.	2,86E+06	1,04E-04	36,4
Ab18	ST2 яв. мак.	3,16E+06	1,44E-04	45,7	Ab18	ST2 люд.	2,67E+06	1,19E-04	44,5
Ab19	ST2 яв. мак.	3,07E+06	1,59E-04	51,8	Ab19	ST2 люд.	2,81E+06	1,25E-04	44,5
Ab20	ST2 яв. мак.	2,61E+06	6,64E-05	25,5	Ab20	ST2 люд.	2,41E+06	5,68E-05	23,5
Ab21	ST2 яв. мак.	3,21E+06	4,92E-05	15,3	Ab21	ST2 люд.	2,83E+06	3,07E-05	10,8
Ab22	ST2 яв. мак.	2,87E+06	5,33E-05	18,6	Ab22	ST2 люд.	2,50E+06	4,05E-05	16,2
Ab23	ST2 яв. мак.	3,29E+06	3,23E-04	98,2	Ab23	ST2 люд.	2,70E+06	2,24E-04	83,1
Ab24	ST2 яв. мак.	2,03E+06	1,54E-04	75,9	Ab24	ST2 люд.	2,89E+06	1,50E-04	51,7
Ab25	ST2 яв. мак.	6,42E+06	5,75E-04	89,6	Ab25	ST2 люд.	4,00E+06	5,44E-04	136,0
Ab26	ST2 яв. мак.	5,65E+06	3,08E-04	54,5	Ab26	ST2 люд.	5,22E+06	2,97E-04	56,9
Ab27	ST2 яв. мак.	1,63E+06	3,75E-04	230,0	Ab27	ST2 люд.	1,35E+06	3,12E-04	230,0
Ab28	ST2 яв. мак.	2,97E+06	1,35E-05	4,5	Ab28	ST2 люд.	2,37E+06	1,98E-05	8,4
Ab29	ST2 яв. мак.	3,97E+05	9,45E-05	238,0	Ab29	ST2 люд.	3,76E+05	8,96E-05	238,0

Таблиця 4

Антитіло	Аналіт	ka	kd	KD (пМ)	Антитіло	Аналіт	ka	kd	KD (пМ)
Ab30	ST2 яв. мак.	3,09E+06	3,17E-05	10,2	Ab30	ST2 люд.	2,79E+06	2,71E-05	9,7
Ab31	ST2 яв. мак.	1,07E+06	2,08E-04	194,0	Ab31	ST2 люд.	8,78E+05	2,43E-04	277,0
Ab32	ST2 яв. мак.	4,81E+06	2,69E-04	55,8	Ab32	ST2 люд.	4,37E+06	2,63E-04	60,2
Ab33	ST2 яв. мак.	4,26E+06	3,31E-04	77,6	Ab33	ST2 люд.	4,04E+06	3,41E-04	84,4
Ab34	ST2 яв. мак.	2,78E+06	4,60E-05	16,5	Ab34	ST2 люд.	2,61E+06	3,19E-05	12,3
Ab35	ST2 яв. мак.	9,76E+05	1,00E-04	103,0	Ab35	ST2 люд.	8,17E+05	1,15E-04	141,0
Ab36	ST2 яв. мак.	4140000	0,000278	67,1	Ab36	ST2 люд.	4,12E+06	2,80E-04	68,1

Афінність додаткових антитіл визначали, використовуючи трохи змінений протокол для плазмонного резонансу. Оцінку антитіл Ab1, Ab2, Ab3 і Ab4 за допомогою поверхневого плазмонного резонансу проводили при 25°C, використовуючи вимірювальний прилад Biacore 3000 (Biacore International AB, Uppsala, Sweden), обладнаний сенсорним чіпом CM5. Специфічні до Fcγ захоплюючі антитіла ковалентно іммобілізували у двох проточних вічках на чіпі CM4, використовуючи стандартну реакцію сполучення аміну з HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЕДТК, 0,05% сурфактанту P20, GE Healthcare) як робочий буфер. Коротко, кожне проточне вічко активували 1:1 (o/o) сумішшю з 0,1 M NHS і 0,4 M ЕДК. Козячий антилюдський IgG AffiniPure, специфічне до Fcγ-фрагмента антитіло (Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA), іммобілізували при 30 мкг/мл у 10 mM ацетаті натрію, pH 5,0, із заданим рівнем у 3,000 к.е. на двох проточних вічках. Поверхні із залишковою активністю дезактивували за допомогою ін'єкції 1 M етаноламіну. Потім робочий буфер міняли на HBS-EP + 0,1 мг/мл БСА на всі етапи, що залишилися.

Всі антитіла готували в робочому буфері в потрібному екземплярі, 3-кратно розбавляли і ін'єктували так, щоб трихвилинна ін'єкція при 10 мкл/хв через випробувальне проточне вічко призводила до появи близько 75-90 одиниць відповіді антитіл, захоплених на поверхні випробувального проточного вічка. На поверхні контрольного проточного вічка захоплення антитіл не відбувалося. Потім ST2 людини або яванської макаки при різних концентраціях (200 нМ - 0,0914 нМ) разом з порожнім буфером проводили через два проточні вічка. Використовували швидкість потоку 50 мкл/хв. і двохвилинну фазу асоціації, за якою слідувала чотирихвилинна фаза дисоціації. Після кожного циклу поверхні відновлювали 50 мкл ін'єкцією 10 mM гліцину, pH 1,5. Потім свіжі антитіла іммобілізували на поверхні випробувального проточного вічка, щоб підготувати до наступного циклу. Окремий тривалий експеримент по дисоціації (60 хв.) проводили у трьох екземплярах при концентрації у 200 нМ.

Дані двічі коректували, віднімаючи спочатку контрольну поверхневу відповідь, щоб виключити зміну об'ємного коефіцієнта заломлення, а потім віднімаючи усереднену відповідь контрольного буфера, щоб виключити систематичні артефакти для експериментальних проточних вічок. Дані по ST2 обробляли і описували у загальному випадку 1:1 моделлю взаємодії з локальним R_{max} за допомогою BIA evaluation Software v 4.1. (Biacore International AB, Uppsala, Sweden). Визначали константи швидкості асоціації (k_a) і дисоціації (k_d) і використовували ці дані для розрахунку рівноважної константи дисоціації (K_D). Константи швидкості дисоціації і рівноважні константи дисоціації для Ab1, Ab2, Ab3 і Ab4 наведені у Таблиці 5.

Таблиця 5

Антитіло	ST2	K _a (1/Mc)	k _d (1/c)	D (nM)
b1	Людина	1,43E+06	1,11E-04	77,7
b1	Макака	1,69E+06	1,97E-04	117
b2	Людина	3,33E+05	1,13E-05	33,9
Ab2	Макака	3,60E+05	1,16E-05	32,2
b3	Людина	4,00E+05	9,50E-05	238
b3	Макака	6,74E+05	8,55E-05	127
b4	Людина	2,35E+06	7,06E-04	301
b4	Макака	2,50E+06	1,29E-03	516

Приклад 4: pH-чутливе зв'язування антитіл

Терапевтичні антитіла, які при низьких значеннях pH зв'язуються зі зниженою афінністю зі своїми мішенями, можуть мати посилені ФК властивості, які дозволяють здійснювати їх доставку менш часто або у нижчих дозуваннях. (Nat Biotechnol. 2010 28(11):1203-7 T. Igawa et al Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization). Це відбувається унаслідок вивільнення мішені антитілом при низькому рівні pH лізосоми з подальшою деградацією мішені і поверненням у цикл антитіла.

Проводили біосенсорний аналіз pH-чутливого зв'язування антитіл Ab1, Ab2, Ab3 і Ab4 за допомогою Biacore 4000. Установка була аналогічною такій у Прикладі 3, в якому проводили визначення K_D для цих антитіл, за винятком того, що дані відповідали подвійній ін'єкції одиничної концентрації в 2,46 нМ антитіла α-ST2. Фіксували швидкість асоціації (5 хв.) при pH 7,4 і дисоціації (10 хв.) при pH 5,5 і 7,4 при швидкості потоку 30 мкл/хв. Дані з урахуванням віднятого контролю описували 1:1 моделлю за допомогою Scrubber. Деякі з антитіл демонстрували набагато вищі швидкості дисоціації при нижчому рівні pH, як показано у Таблиці 6.

Таблиця 6

Антитіло	pH	Розрахункова	Кратність зміни pH 7,4/pH 5,5 kd
		$k_d (1/c)^*$	
Ab1	7,4	0,000134	88,1
Ab1	5,5	0,0118	
Ab2	7,4	0,0000298	8,0
Ab2	5,5	0,000238	
Ab3	7,4	0,0000273	2,9
Ab3	5,5	0,0000791	
Ab4	7,4	0,000632	16,9
Ab4	5,5	0,0107	

Приклад 5: Перехресне конкурування антитіл

Проведення експериментів по конкуруванню є стандартним способом характеристики епітопів. Антитіла, які конкурують один з одним, можна вважати такими, які зв'язують одну і ту саму ділянку на мішені. У цьому Прикладі описаний спосіб визначення конкурування за зв'язування ST2 і наведені результати, одержані згідно цього способу при його застосуванні до описаних у цьому описі антитіл.

Експерименти по сортуванню можна проводити різними способами, а спосіб, що застосовується, може чинити вплив на результати аналізу. Стандартним для даного способу є те, що ST2 зазвичай зв'язується одним контрольним антитілом, а зондується іншим. У випадку, якщо контрольне антитіло запобігає зв'язуванню зондуемого антитіла, вважається, що антитіла належать одному сорту. Важливий порядок, в якому застосовують антитіла. Якщо антитіло А застосовується як контрольне антитіло і блокує зв'язування антитіла В, то зворотне не завжди є справедливим: антитіло В, що застосовується як контрольне антитіло, не обов'язково блокуватиме антитіло А. Існує багато чинників, які відіграють роль у цьому випадку: зв'язування антитілом може викликати конформаційні зміни мішені, які запобігають зв'язуванню другим антитілом, або епітопи, які перекриваються, але не повністю екранують один одного, можуть залишати можливість високоафінної взаємодії з мішенню для другого антитіла, що призводить до зв'язування. У загальному випадку, якщо конкурування спостерігається при будь-якому порядку, вважається, що антитіла належать одному сорту, і якщо обидва антитіла можуть блокувати один одного, то існує вірогідність того, що епітопи перекриваються у повнішій мірі.

У цьому Прикладі використовували модифікацію мультиплексного методу сортування, описаного в Jia, et al (J. Immunological Methods, 288 (2004) 91-98). Використовували розчинний ST2-FLAG His. Для мічених різним кодом покритих стрептавідином гранул Lumindex (Lumindex, #L100-L1XX-01, XX визначає код гранули) проводили інкубацію в 100 мкл розчину, що містить 6 пг/гранула біотинільованих моновалентних мишачих антилюдських захоплюючих антитіл IgG (BD Pharmingen, #555785), упродовж 1 години при кімнатній температурі у темряві, потім відмивали 3х ФСБА – фосфатно-сольовим буфером (ФСБ) плюс 1% бичачий сироватковий альбумін (БСА). Гранули, що несуть різні мітки, окремо інкубували з 100 мкл 1:10 розчину антитіл до ST2 (покриваючі антитіла) упродовж 1 години, а потім відмивали. Гранули збирали, потім розподіляли в 96-ячковому фільтрувальному планшеті (Millipore, #MSBVN1250). У лунки до половини додавали 100 мкл 2 мкг/мл ST2, а в половину, що залишилася, – буфер, і інкубували впродовж 1 години, а потім відмивали. 100 мкл 1:10 розчину антитіл до ST2 (детекторні антитіла) додавали в одну ямку з ST2 і однією ямкою без ST2, інкубували впродовж 1 години, а потім відмивали. Як негативний контроль використовували нерелевантний людський IgG (Jackson, #009-000-003), а також умову, що відповідає відсутності антитіл (контроль). У кожен ямку додавали 20 мкл PE-кон'югованого моновалентного мишачого антилюдського IgG (BD Pharmingen, #555787), інкубували впродовж 1 години, а потім відмивали. Гранули перерозчиняли в 75 мкл ФСБА і за допомогою установки BioPlex (BioRad) отримували щонайменше 100 сигналів/код.

Середню інтенсивність флуоресценції (СІФ) пари антитіл у відсутність ST2 віднімали від сигналу відповідної реакції за участю ST2. Для пари антитіл, для яких приймається, що вони зв'язуються одночасно і, відповідно, належать різним сортам, величина реакції повинна відповідати двом критеріям: 1) величини мають бути у 2 рази більше, ніж для покриваючого антитіла, спареного з самим собою, нерелевантним або контрольним антитілом, залежно від того, яка з цих трьох величин є найбільшою, і 2) величини мають бути більше, ніж сигнал від детекторного антитіла, яке пов'язане з гранулою, покритою нерелевантними або контрольними антитілами. Було виявлено як мінімум три сорти антитіл, як показано у Таблиці 7, що наведена нижче.

Таблиця 7

Сорт	Антитіло	Сорт	Антитіло
Сорт 1	Ab23	Сорт 2	Ab9
	Ab17		Ab10
	Ab24		Ab11
	Ab25	Сорт 3	Ab29
	Ab12		
	Ab36		
	Ab14		
	Ab18		
	Ab19		
	Ab20		
	Ab33		
	Ab34		
	Ab1		
	Ab7		
	Ab3		
	Ab15		
	Ab16		
	Ab27		
	Ab5		
	Ab2		
	Ab8		
	Ab13		
	Ab30		
	Ab35		
	Ab28		

Приклад 6: Аналіз блокування IL-33

Досліджували механізм дії антитіл до ST2 за допомогою двох AlphaScreens. Ці два способи застосовували в комбінації для того, щоб визначити, чи можуть антитіла пригнічувати зв'язування IL-33 з ST2 або, навпаки, чи можуть антитіла специфічно блокувати зв'язування корецепторів ST2 і АсР і у той же час не перешкоджати зв'язуванню IL-33 з ST2. AlphaScreen є аббревіатурою Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay screen (посилений люмінесцентний гомогенний аналіз).

У першому дослідженні оцінювали здатність антитіл блокувати зв'язування між IL-33 і ST2. У цьому аналізі визначали здатність антитіл до ST2 блокувати зв'язування біотинільованого людського IL-33 (спареного із стрептавідиною до donorною гранулою) з 6 х гістидин-міченим людським ST2 (спареним з Ni-хелатною акцепторною гранулою). AlphaScreen-аналіз IL-33/ST2 проводили, використовуючи 40 мкл реакції у 96-ямковому планшеті з половинним об'ємом ямок (Perkin Elmer). Буфер для аналізу, який використовували для обох AlphaScreens, містив 40 мМ HEPES (pH=7,4), 1 мМ CaCl₂, 0,1% БСА, 0,05% Твін-20 і 100 мМ NaCl. Кожна ямка для аналізу містила 0,3 нМ біотинільованого людського IL-33, 0,3 нМ людського ST2-FH (FH є скороченням від FLAG- і 6 х Гістидин-міток), 10 мкг/мл покритих стрептавідином donorних гранул (Perkin Elmer, Waltham, MA), 10 мкг/мл покритих Ni-хелатом акцепторних гранул (Perkin Elmer) і 12,5 мкг/мл антитіл до ST2. Після додавання всіх компонентів аналізу планшети інкубували протягом ночі в темряві при кімнатній температурі. Наступного дня планшети зчитували на мультирідері 2103 Envision (Perkin Elmer). Лазерне збудження donorних гранул на 680 нм використовували для генерування активного кисню, який може ініціювати люмінесцентний/флуоресцентний каскад в акцепторних гранулах, які знаходяться в безпосередній близькості внаслідок взаємодії зв'язаних з гранулою білків, що призводить до випромінювання світла, що реєструється на 570 нм.

У другому дослідженні оцінювали здатність антитіл пригнічувати IL-33-опосередковане зв'язування ST2 з ко-рецептором АсР. У цьому аналізі визначали здатність антитіл до ST2 блокувати IL-33-опосередковане зв'язування біотинільованого людського ST2-Fc (спареного із стрептавідиною до donorною гранулою) з міченим 6 х гістидином людським АсР (спареним з Ni-хелатною акцепторною гранулою). AlphaScreen-аналіз ST2/АсР проводили в 8 мкл реакціях у 384-ямковому планшеті (optiplat, Perkin Elmer). Кожна ямка для аналізу містила 5 нМ людського IL-33, 5 нМ біотинільованого людського ST2-Fc, 5 нМ людського АсР-FH, 10 мкг/мл покритих стрептавідином donorних гранул, 10 мкг/мл покритих Ni-хелатом акцепторних гранул і 12,5 мкг/мл антитіл до ST2. Після додавання всіх компонентів аналізу планшети інкубували протягом ночі в темряві при кімнатній температурі. Наступного дня планшети зчитували на мультирідері 2103 Envision (Perkin Elmer), використовуючи ті самі параметри, які наведені вище для першого дослідження.

Результати два AlphaScreens наведені нижче у Таблиці 8. Пригнічення для кожного з антитіл

наведене у вигляді процентної долі пригнічення сигналу в AlphaScreen при застосуванні заданого антитіла в концентрації 12,5 мкг/мл відносно сигналу, отриманого у випадку, коли у лунці для аналізу не було антитіл. Деякі антитіла пригнічували взаємодію ST2 і IL-33 у повнішій мірі, ніж вони пригнічували взаємодію ST2/IL-33/АсР, а деякі антитіла пригнічували взаємодію ST2/IL-33/АсР у повнішій мірі, ніж вони пригнічували взаємодію ST2 і IL-33. Всі антитіла пригнічували взаємодію IL-33 з ST2 щонайменше на 50%.

Таблиця 8

Назва	% пригніч. ST2-IL33 AS 12,5 мкг/мл	% пригніч. ST2-АсР AS 12,5 мкг/мл
Ab6	98,5	71,2
Ab4	98,4	77,8
Ab9	75,9	93,1
Ab10	51,8	73,2
Ab1	98,1	86,9
Ab7	98,9	75,7
Ab3	98,8	68,7
Ab11	75,8	93,6
Ab5	96,3	33,8
Ab2	99,2	96,4

Приклад 7: In Vitro біоаналіз людського IL-33

Приклади людських ST2 mAbs досліджували у ході людського біоаналізу із застосуванням очищених Т-клітин CD4+, що одержані від різних донорів і стимульованих людським IL-33 і людським IL-2. Процедура аналізу полягає у наступному. Клітини висівають у кількості 250.000 клітин на ямку у 60 мкл об'єм у 96-ямковий планшет з круглим дном. Після попередньої інкубації в кожному ямку додають 30 мкл 4х суміші huIL-2 + huIL-33. Загальний об'єм у 96-ямковому планшеті з круглим дном складає 120 мкл. Починають із концентрації антитіл у 20 мкг/мл і проводять розбавлення в пропорції 1:3, щоб одержати 10-точкову криву. Процедуру проводять 4х у 30 мкл. Після попередньої інкубації антитіл з клітинами в кожному ямку додають 30 мкл 4х суміші з huIL-2 + huIL-33. Витримують при 37°C, 5% CO₂ упродовж 48 годин. Супернатанти збирають. Аналізують пригнічення IL-5 huIL-5 за допомогою ELISA.

На Фігурі 3 показано пригнічення ST2 mAbs IL-33-індукованого вироблення IL-5 CD4+ Т-клітинами, отриманими від різних донорів. Лінія (—) відповідає значенню позитивного контролю людського IL-33 у комбінації з людським IL-2 у відсутність пригнічення. (••••) відповідає значенню позитивного контролю людського IL-2. Лінія (- -) відповідає середньому контрольному значенню. Людські Т-клітини CD4+ заздалегідь інкубували впродовж 30 хвилин з анти-ST2 mAbs, а потім стимулювали впродовж 48 годин людським IL-33 (4 нг/мл) і людським IL-2 (10 нг/мл). На Фіг. 3 показано, що антитіла до ST2 здатні пригнічувати індуковану людським IL-33 активацію ST2, що визначене по виробленню IL-5 CD4+ Т-клітинами. Антитіла до ST2 виявилися здатні протидіяти індукованому IL-33 виробленню IL-5 CD4+ Т-клітинами з величинами IC₅₀, що становлять близько <100 нМ. У Таблиці 9 наведені типові величини для IC₅₀.

Таблиця 9

Ab	IC ₅₀ (нМ)
2	5,25
8	6,90
10	6,90
1	10,68
9	62,01
5	64,54
11	479,86

Приклад 8: Аналіз вивільнення IFN γ CD4+ Т-клітинами яванських макак

Мононуклеарні клітини периферійної крові (МКПК) яванських макак збагачували з нормальної донорської периферійної крові, обробленої кислотою цитрат-декстрозою (КЦД), за допомогою градієнтного центрифугування ISOLYMPH (Gallard-Schlesinger Industries, Plainview, NY). Подальше виділення CD4+ Т-клітин яванських макак проводили за допомогою набору для виділення CD4+ Т-клітин яванських макак від Miltenyi Biotec. Виділені CD4+ Т-клітини макак (2x10⁵ клітин/ямку в 96-

ямкових планшетах) інкубували з очищеними моноклональними антитілами при різних концентраціях упродовж 30 хвилин при кімнатній температурі, а потім стимулювали IL-33 (10 нг/мЛ), IL-2 (10 нг/мЛ) і IL-12p70 (50 нг/мЛ) упродовж вісімдесяти чотирьох годин. Потім одержані в результаті безклітинні супернатанти культури CD4⁺ Т-клітин яванських макак аналізували на предмет присутності IFN γ яванських макак за допомогою ELISA (приклади даних наведені у Таблиці 10). Ефективність очищених моноклональних антитіл визначали в процесі дослідження вивільнення IFN γ CD4⁺ Т-клітинами яванських макак, узятими від трьох різних донорів.

Таблиця 10

Величини IC-50	пМ
Ab1	15,82
Ab2	79,5
Ab3	15,15
Ab4	4,03
Ab5	12,9
Ab6	47,1
Ab7	40,01
Ab8	158,07

Приклад 9: Аналіз вивільнення IL-8 еозинофілами людини

Людські еритроцити і гранулоцити збагачували з гепаринізованої нормальної донорської периферійної крові за допомогою градієнтного центрифугування ISOLYMPH (Gallard-Schlesinger Industries, Plainview, NY). Еритроцити видаляли, використовуючи лізуючий буфер, ACK (Gibco, Carlsbad, CA). Подальше виділення еозинофілів проводили за допомогою набору для виділення еозинофілів від Miltenyi Biotec. Виділені еозинофіли (2×10^5 клітин/ямку у 96-ямкових планшетах) інкубували з неклональними або клональними супернатантами з різною мірою розведення або з очищеними моноклональними антитілами при різних концентраціях упродовж 30 хвилин при кімнатній температурі, а потім стимулювали IL-33 (2 нг/мЛ) і IL-3 (100 нг/мЛ) упродовж трьох днів. Потім одержані в результаті безклітинні супернатанти культури еозинофілів аналізували на предмет присутності IL-8 за допомогою ELISA. Приклади даних наведені у Таблиці 11. Ефективність очищених моноклональних антитіл визначали в процесі дослідження вивільнення IL-8 еозинофілами, взятими від трьох різних донорів.

Таблиця 11

IC-50	пМ
Ab1	51,45
Ab2	52,75
Ab3	50,38
Ab4	14,12
Ab5	73,27
Ab6	63,02
Ab7	40,68
Ab8	3120

Приклад 10: Ефективність антитіл до ST2 порівняно з комерційно доступними антитілами

Дослідження залежності доза-ефект для людського IL-33 у людських NK-клітинах

Первинні CD56-позитивні людські NK-клітини (5×10^4 клітин) обробляли людським IL-12 (1 нг/мЛ), додаючи кількості людського IL-33, що збільшуються, як показано на Фіг. 4. Через двадцять чотирьох годин безклітинні супернатанти збирали і вимірювали концентрацію IFN- γ , використовуючи комерційний спосіб аналізу (R&D Systems). 10 нг/мЛ IL-33 використовували як стимулюючу дозу для пригнічення активності IL-33 антитілами

Пригнічення активності IL-33 антитілами

Людські NK-клітини стимулювали як описано вище. За тридцять хвилин до додавання IL-33 і IL-12 у клітини додавали антитіла до ST2 у концентраціях, наведених на Фіг. 5. Через двадцять дві години після обробки IL-33 безклітинні супернатанти збирали і вимірювали концентрацію IFN- γ , використовуючи комерційний метод аналізу (R&D Systems). Назви клонів вказані для комерційно доступних антитіл. Лише Ab2 повністю пригнічувало IL-33-залежна IFN- γ -відповідь і виявилось істотно ефективнішим, ніж будь-яке з комерційно доступних антитіл huST2. Величини IC₅₀, що відповідають кожному антитілу, наведені в Таблиці 12.

Таблиця 12

Антитіло	IC50 (мкг/мл)
2A5	~608
HB12	7,700
B4E6	~43,54
FB9	~498,4
97203	0,3851
Ab2	0,04123

Приклад 11: Аланін/аргінін скануючий мутагенез ST2

Цей приклад характеризує антитіла до ST2 на основі дії мутагенезу ST2 на їх здатність зв'язувати мішень. Попередні дані по зв'язуванню вказують на те, що за зв'язування антитіл відповідають головним чином домени 1 і 2 ST2 у випадку панелі антитіл, яку аналізували за допомогою скануючого мутагенезу ST2 у цьому Прикладі. Таким чином, у випадку повнорозмірного ST2 при конструюванні мутаційних ділянок у структурному відношенні враховували лише домени 1 і 2 (D1D2) ST2.

Координати комплексної моделі ST2 і IL-33 отримали з Lingel et al., Structure (London, England: 1993). Elsevier Ltd 17, 1398–410. Сприйнятливості до розчинника, що доводиться на кожен залишок бічного ланцюга ST2, розраховували за допомогою Molecular Operating Environment (Molecular Operating Environment (MOE), 2011.10; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2011.). Потім ці значення сприйнятливості до розчинника використовували при виборі поверхневих залишків D1D2 для мутагенезу, вибираючи спочатку всі залишки D1D2, що мають відкриті ділянки бічного ланцюга з площею у щонайменше 10 Å², або залишки гліцину із загальною відкритою площею у щонайменше 10 Å². Залишки гліцину, що мають позитивне значення кута Фі, видаляли, як і залишки проліну, оскільки існує висока вірогідність того, що мутації у цих позиціях призведуть до спотворення локальної білкової структури. Залишки цистеїну також видаляли з вибірки для збереження дисульфідних зв'язків. Залишок A82 видалили після візуальної перевірки. За допомогою даного методу отримали перелік із 140 залишків для мутагенезу. Всі залишки були замінені аргініном за винятком залишків аргініну і лізину, які були замінені аланіном.

Всі конструкції мутантів батьківського His-Avi-міченого позаклітинного домену (ВКД) ST2 у векторі pTT5 експресували у тимчасово трансфікованих суспензійних клітинах 293-6E (NRCC) у 24-ямкових планшетах. In-vivo біотинілювання здійснювали за допомогою котрансфекції BR A у вектор pTT5. Для видалення надлишку біотину супернатанти діалізували з ФСБ.

Для визначення зв'язування антитіл до ST2 з точковими мутаціями в ST2 використовували аналіз зв'язування BioPlex. Біотинілювані мутанти зв'язували з 80 міченими різним кодом покритими стрептавідином гранулами (Luminex, #L100-L1XX-01, XX визначає код гранули). Наявність 80 різних код для гранул надає можливість об'єднати дві групи по 70 мутантів у загальну групу з 140. Кожна група містила 6 батьківських контрольних проб, 3 контрольних проби, що містять нерелевантний білок, і одну порожню контрольну пробу. Зв'язування антитіл з білком мутанта порівнювали зі зв'язуванням антитіл з батьківським білком.

100 мкл 1:7 розчину мутантів ST2, батьківських і контрольних проб, заздалегідь зв'язаних з гранулами, або розчину, що не містить білка, відмивали 5X ФСБ +1% БСА, збирали і розділяли на аліквоти у 96-ямковому фільтрувальному планшеті (Millipore), а потім знову відмивали. Додавали по 100 мкл 3-кратного розчину антитіл до ST2, щоб втричі збільшити об'єм ямок, інкубували упродовж 1 години при 4°C і відмивали. У кожну ямку додавали 100 мкл 1:500 розчину PE-кон'югованого антилюдського IgG Fc (Jackson, #109-116-170), інкубували впродовж 0,5 годин і відмивали. Гранули перерозчиняли у 75 мкл, струшували протягом щонайменше 3 хвилин і зчитували на BioPlex.

Перед проведенням аналізу зв'язування проводили валідаційний експеримент, щоб визначити варіабельність “ділянки гранули” до “ділянки гранули” (Г-Г). У цьому валідаційному експерименті всі гранули кон'югували з одним і тим самим контрольним білком дикого типу. Отже, відмінності між ділянками гранул були пов'язані виключно з мінливістю Г-г, а не викликані відмінностями між білками дикого типу і мутантами. Титрування антитіл проводили для дванадцяти реплік у різних лунках.

Метою даного статистичного аналізу була оцінка Г-Г варіабельності розрахункової величини EC50 для кривих зв'язування. Розрахункове стандартне відхилення (CO) для Г-Г потім використовували для побудови довірчих інтервалів величини EC50 для білків дикого типу і мутантних у ході експериментів по порівнянню кривих.

Дані по зв'язуванню для кожної ділянки гранули описували логістичною моделлю з чотирма параметрами. Результуючий файл “sumout.xls”, що містить результати контролю якості (КЯ) і оцінки

параметрів для найбільшого значення (max), найменшого значення (min), кута нахилу (slope) і натурального логарифма EC50 (xmid) для кривих, використовували як вихідні дані для аналізу. Потім оцінювали Г-Г варіабельність для кожного з параметрів за допомогою моделі зі змішаними ефектами, використовуючи процедуру SAS PROC MIXED. В аналіз були включені лише ті криві, які мали “хороший” КЯ-статус. Кінцева модель із змішаними ефектами містила як випадковий ефект лише залишок (тобто, окремі ділянки гранул). Межа середнього (MC) для кожного параметра також оцінювали за допомогою моделі із змішаними ефектами. CO для Г-Г розраховували, витягаючи квадратний корінь з Г-Г варіації. Також розраховували кратність зміни між $MC + 2CO$ і $MC - 2CO$, яка відповідає близько верхньому і нижньому 97,5-му процентилу популяції.

Для визначення мутантів, які порівняно з контролем дикого типу не демонстрували значної відповіді, визначали і позначали як Hitmax мутантів, для яких максимальне значення (MFI) складає менше 30% від максимального значення (MFI) для контролю дикого типу.

Порівнювали величини EC50 кривих зв'язування мутантів і кривих зв'язування білків дикого типу. Статистично значні відмінності визначали як результати для подальшого розгляду. Криві з мітками “nofit” і “badfit” виключили з цього аналізу.

При порівнянні розрахункових величин EC50 враховували два джерела варіацій – варіацію з підбору кривої і варіацію гранула-гранула. Білки дикого типу і білки мутантів поєднували з різними гранулами, оскільки їх відмінності обумовлені відмінностями гранула-гранула. Варіацію підбору кривої оцінювали за допомогою стандартної погрішності розрахункових величин $\log EC50$. Варіацію гранула-гранула визначали експериментально, проводячи експеримент, в якому контрольні білки дикого типу зв'язували з кожною з гранул. Пов'язану з гранулами варіацію у розрахункових величинах EC50 кривих зв'язування білків дикого типу у цьому експерименті використовували для розрахунку варіації гранула-гранула у поточному експерименті по картуванню.

Порівняння двох значень EC50 (у логарифмічній шкалі) проводили, використовуючи t-критерій Стюдента. t-статистику визначали як співвідношення між дельтою (абсолютна різниця між розрахунковими величинами EC50) і стандартним відхиленням дельта. Дисперсію дельта оцінювали по сумі з трьох компонентів – оцінкової дисперсії EC50 для кривих білків мутантів і білків дикого типу, що характеризуються нелінійною регресією, і подвійної дисперсії гранула-гранула, визначеною в окремому експерименті. Множення на дві дисперсії гранула-гранула відбувається внаслідок припущення, що гранули мутантів і гранули дикого типу мають однакову дисперсію.

Ступені свободи стандартного відхилення дельти розраховували, використовуючи апроксимацію Саттертвайта (1946).

Індивідуальні р-значення і довірчі інтервали (95% і 99%) отримували на основі розподілу Стюдента для кожного порівняння.

У випадку великої кількості контролів дикого типу використовували консервативний підхід, в якому вибирали контроль дикого типу, який був найбільш схожий з мутантом, тобто, вибирали ті зразки, які мали найбільші р-значення.

Множинні коректування важливі для того, щоб контролювати псевдопозитивні результати при одночасному проведенні великої кількості досліджень. У даному аналізі застосовували два види множинних коректувань: контроль помилки з поправкою на ефект множинних порівнянь (FWE) і контроль долі псевдопозитивних результатів (FDR). У підході FWE контролюється можливість того, що один або більше результатів є помилковими; у підході FDR контролюється очікуваний вміст псевдопозитивних результатів серед вибраних результатів. Перший підхід є консервативнішим і менш ефективнішим, ніж останній. Існує множина методів, доступних для обох підходів; для цього дослідження ми вибрали метод Хохберга (1988) для аналізу FWE і FDR-метод Бенджаміні-Хохберга (1995) для аналізу FDR. Скоректовані р-значення для обох підходів розраховували як для кожного антитіла, так і для аналізу в цілому.

Мутант вважали таким, що чинить вплив, за наступними критеріями: 1) якщо для цього мутанта одержували погане узгодження або не отримували узгодження результатів, 2) якщо мутант був вибраний за критерієм hitmax, 3) якщо р-значення для помилки з поправкою на ефект множинних порівнянь склало менше 0,01 або 4) якщо значення Bmax склало більше, ніж 200% від батьківського. Результат визначали як інгібітор, якщо його вплив призводив до зниження Bmax або збільшенню значення EC50, результат визначали як активатор, якщо він призводив до збільшення Bmax або зниженню значення EC50. 8 мутацій виключили із списку збігів через їх вплив на >90% досліджуваних антитіл, серед них: K37A, R46A, D63R, V71R, G106R, K112A, N132R, Q137R і Y141R.

Результати аналізу наведені к Таблицях 13 і 14.

Таблиця 13

Ab	Co rt	Інгібуючі мутанти	Активу ючі мутан ти
----	----------	-------------------	------------------------------

Таблиця 13

Ab	Co pt	Інгібуючі мутанти	Активу ючі мутант и
Ab 2	1	L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R, V176R	L53R, R72A, S73R
Ab 3	1	S3R, E10R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, F76R, T79R, D92R, D97R, V104R, T124R, K131A, Q134R, G138R, F147R, V176R, V184R	D29R, L53R, V61R, R72A, T162R
Ab 32	1	S3R, I15R, Y32R, S33R, E43R, V47R, S50R, K55A, A62R, G65R, T79R, D92R, V95R, D97R, V104R, E128R, Q134R, G138R, S146R, F147R, V176R	D29R, R72A
Ab 33	1	S3R, I15R, Y32R, S33R, T35R, E43R, V47R, S50R, K55A, A62R, G65R, T79R, D92R, V95R, D97R, V104R, E128R, Q134R, G138R, S146R, F147R, N152R, V176R	D29R, R72A
Ab 30	1	S3R, L14R, Y26R, S33R, T35R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, V104R, G138R, A143R, F147R, N152R, V176R, V184R	R72A
Ab 11	2	S50R, S175R	W7R, E10R, L14R, Q21R, E43R, T79R, N110R , T177R , V184R , K185A
Ab 10	2	A49R, S50R, I70R, S175R, S181R	K4A, Q5R, W7R, E10R, L14R, I15R, Q21R, Y26R, E43R, T79R, M100 R, K109A , N110R , T124R , K145A , T177R , V184R , K185A

Таблиця 13

Ab	Co pt	Інгібуючі мутанти	Активу ючі мутан ти
Ab 29	3	N11R, V47R, S50R, Y67R, N83R, V104R, L120R, G138R, S139R, S146R, F147R, A172R	

Таблиця 14

Ab	Мутанти, що не здійснюють впливу
Ab2	K1A, F2R, S3R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, S50R, G51R, Q52R, K55A, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, V95R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, S146R, F147R, V149R, D151R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R
Ab3	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, N11R, E12R, A13R, L14R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, Y31R, Y32R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, S50R, G51R, Q52R, K55A, L57R, E60R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, V95R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, E128R, F130R, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, S146R, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, K185A, D186R, E187R
Ab32	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, L14R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, Y31R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, G51R, Q52R, L53R, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, F130R, K131A, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R
Ab33	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, L14R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, Y31R, Q34R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, G51R, Q52R, L53R, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, F130R, K131A, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, V149R, D151R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R
Ab30	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, I15R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, Q34R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, S50R, G51R, Q52R, L53R, K55A, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, V95R, D97R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, S139R, R140A, R142A, H144R, K145A, S146R, V149R, D151R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, K185A, D186R, E187R

Таблиця 14

Ab	Мутанти, що не здійснюють впливу
Ab11	K1A, F2R, S3R, K4A, Q5R, S6R, L9R, N11R, E12R, A13R, I15R, V16R, R17A, R20A, K23A, S25R, Y26R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, S33R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, V47R, A49R, G51R, Q52R, L53R, K55A, L57R, E60R, V61R, A62R, S64R, G65R, I66R, Y67R, T68R, I70R, R72A, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, D92R, N94R, V95R, D97R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, V104R, S107R, E108R, K109A, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, G138R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, S146R, F147R, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, V176R, R180A, S181R, T183R, D186R, E187R
Ab10	K1A, F2R, S3R, S6R, L9R, N11R, E12R, A13R, V16R, R17A, R20A, K23A, S25R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, S33R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, V47R, G51R, Q52R, L53R, K55A, L57R, E60R, V61R, A62R, S64R, G65R, I66R, Y67R, T68R, I70R, R72A, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, D92R, N94R, V95R, D97R, Y98R, Y101R, S102R, T103R, V104R, S107R, E108R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, G138R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, S146R, F147R, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, A172R, N173R, Y174R, V176R, R180A, T183R, D186R, E187R
Ab29	K1A, F2R, S3R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, E12R, A13R, L14R, I15R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, S33R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, E43R, R44A, N45R, A49R, G51R, Q52R, L53R, K55A, L57R, E60R, V61R, A62R, S64R, G65R, I66R, T68R, I70R, R72A, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, T79R, G80R, Y81R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, D92R, N94R, V95R, D97R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, N173R, Y174R, S175R, V176R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R

Приклад 12: Аналіз воднево-дейтерієвого обміну (HDX)

У цьому Прикладі Ab2 зв'язували з ST2 і визначали ефект від зв'язування за допомогою HDX.

Розчинний білок ST2 (домени 1-3, що містять амінокислоти 19-322 з SEQ ID NO:1) з FLAG-міткою і His-міткою у С-кінці тимчасово експресували в клітинах 293-6E ссавців, очищали за допомогою IMAC (афінній хроматографії на іммобілізованих іонах металу) і додатково очищали за допомогою препаративної SEC (ексклюзійної хроматографії). Потім білок концентрували до 3,5 мг/мЛ, використовуючи ультра-фільтрацію. Антитіло до ST2 – Ab2 експресували у сконструйованих клітинах CHO-CS9 і очищали за допомогою афінної хроматографії з протеїном А і послідовною препаративною SEC. Аналітичні SEC використовували для визначення того, що молярне співвідношення антитіло:антиген 0,75:1,00 є оптимальним, щоб гарантувати повне зв'язування білка ST2 антитілом. Вільний білок ST2 і комплекс антиген-антитіло зберігали у ФСБ-буфері, pH 7,2.

HDX експеримент проводили за допомогою автоматизованої HDX-системи (Zhang, Zhang et al. 2012). Коротко, процес обміну H/D починається з розведення 5 мкЛ розчину вільного білка ST2 (3,5 мг/мЛ) або комплексу ST2-антитіло (з концентрацією jST2 у 3,5 мг/мЛ, співвідношенням антиген:антитіло 1:0,75) у 25 мкЛ буфера D₂O в 100 мМ ФСБ, pH 7,2, який готували, розчиняючи пігулку ФСБ у D₂O воді при 25°C. Реакцію обміну інкубували упродовж різного часу мічення (30 секунд, 2, 8, 30 хвилин і 2, 8 годин) для кожного HDX експерименту, а реакцію мічення завершували за допомогою змішування 20 мкЛ розчину, що містить, з 80 мкЛ завершуючого/денатуючого/відновлювального буфера (7,25 М сечовини і 625 мМ трис(2-карбоксіетил) фосфіна (ТКЕФ), 0,45 М гліцину, pH 2,7) при 1°C.

40 мкЛ аліквоту отриманого розчину переносили в 120 мкЛ розчин, що містить 0,4 мг/мЛ свиного пепсину (Sigma, St. Louis, MO). Розщеплюючий розчин негайно ін'єктували у пробовідбірну петлю при 1°C і залишали на 6 хв для повного розщеплювання. Далі гідролізат розділяли колонками C18 (3 колонки у ряду, BEH C18, 2,1 ммх5 мм, Waters Corp., Milford, MA). HPLC-сепарацію проводили при 1°C з 5-хв. градієнтом ACN у 1-40%. Елюент LC аналізували за допомогою мас-спектрометра Orbitrap Elite (Thermo Scientific, San Jose, CA) у залежному від даних LC-MS/MS експерименті.

Введення дейтерієвої мітки, завершення реакції, протеолітичне розщеплювання і ін'єктування проводили за допомогою системи LEAP HD-X PAL, керованою LEAP Shells (LEAP Technologies,

Carrboro, NC).

Експерименти повторювали тричі, а в кожному експерименті вимірювання для кожної часової точки проводили двічі. У зразки додавали стандартну пептидну суміш, щоб відстежувати і коректувати варіабельність, пов'язану із зворотним обміном. Суміш містить три пептиди: брадикинін, ангіотензин I і лейцин-енкефалін. Спеціально сконструйований тетрапептид PPPI (синтезований AnaSpec, Fremont, CA) використовували як другий внутрішній стандарт для мінімізації варіабельності, пов'язаною з проведенням великої кількості експериментів. Також як контроль аналізували розщеплювання білка ST2 у відсутність H/D обміну.

Файли, що містять результуючі дані, обробляли за допомогою програми MassAnalyzer (Zhang, Zhang et al. 2012). Це програмне забезпечення дозволяє визначати пептиди з продуктів розщеплювання антигена, розраховувати швидкість обміну для кожного пептиду, коректувати дані з урахуванням інформації по зворотному обміну, отриманої за допомогою внутрішніх стандартів, і описувати дані моделлю, яка кожному залишку присвоює фактор захисту.

Порівняння змінних профілів для вільного ST2 і зв'язаного антитілом ST2 виявило дві ділянки, що представляють інтерес, які потенційно можуть бути епітопами. Дві ділянки у послідовності ST2 були визначені як IVRCPRQGKPSY (амінокислоти 33-44 з SEQ ID NO:1, відповідні амінокислотам 15-26 зрілого ST2) і IVRSPTF (амінокислоти 88-94 з SEQ ID NO:1, відповідні амінокислотам 70-76 зрілого ST2) за допомогою великої кількості пептидів, що перекриваються. Ці ділянки були менш захищені, коли ST2 знаходився у вільному стані, при цьому швидкість обміну різко падала при зв'язуванні ST2 і антитіла. Більше того, на основі гомологічної структурної моделі ST2, наведеної на Фігурі 6, можна зробити висновок, що обидві ці ділянки послідовності займають аналогічне просторове положення на зовнішній поверхні білка. Ці результати дозволяють зробити висновок, що ці два пептиди беруть участь у зв'язуванні між Ab2 і білком ST2.

Приклад 13: Рентгеноструктурна кристалографія

У цьому Прикладі кристалічна структура комплексу з sc-dsFv фрагмента Ab2 і ST2 забезпечує наявність визначених амінокислотних залишків у ділянці взаємодії.

Ab2 sc-dsFv експресували у клітинах BL21(DE3) Star. Коротко, Ab2 sc-dsFv містить варіабельний домен важкого ланцюга, зв'язаний з варіабельним доменом легкого ланцюга за допомогою лінкера (G₄S)₃. Для додаткової стабілізації молекули в структуру молекули додавали дисульфідний зв'язок за допомогою заміни на цистеїн у позиції 44 варіабельної ділянки важкого ланцюга і у позиції 101 варіабельної ділянки легкого ланцюга. Білок експресували у вигляді тіла включення. Тіло включення розчиняли і проводили рефолдинг. Білок додатково очищали на ексклюзійній колонці (SEC) і іонообмінній колонці MonoQ, а потім шліфували за допомогою SEC.

ST2 експресували в клітинах 293S. Білок очищали за допомогою Ni-афінної колонки і деглікозилювали з ENDON. Білок додатково очищали за допомогою SEC.

Комплекс з Ab2 sc-dsFv і ST2 отримували, змішуючи Ab2 sc-dsFv з надлишковою кількістю ST2. Комплекс очищали за допомогою SEC і концентрували до 12 мг/мл для кристалізації. Білковий комплекс кристалізували у 32-36% ПЕГ400 і 0,1 М HEPES, pH 7,5-8,5, при 16°C, застосовуючи спосіб дифузії пари у сидячій краплі.

Масив даних із дозволом 1,9 Å отримували з Advanced Light Source, Lawrence Berkeley National Lab (Berkeley, California). Дані обробляли за допомогою MOSFLM (Leslie, 1992) і оцінювали за допомогою SCALA у програмному пакеті CCP4 (Collaborative Computational Project, No 4. (1994)). Структуру розшифровували за способом молекулярного заміщення в програмі PHASER (McCoy et al., 2007), використовуючи як пошукові моделі домен D1D2 з відомої структури IL-1RII (pdb code: 3O4O) і варіабельний домен із структури Fab Ab2. Уточнення структури, що повторюється, і побудову моделі здійснювали за допомогою REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) і COOT (Emsley and Cowtan, 2004).

Аналіз ділянки контакту проводили за допомогою програм PISA, AREAMOL і NCONTACT з програмного пакету CCP4. Фігури будували за допомогою PyMol (The PYMOL Molecular Graphics System. Schrödinger).

Кристалічну структуру комплексу ST2/Ab2 sc-dsFv розшифровували до дозволу в 1,9 Å. В асиметричному вічку знаходяться дві незалежні пари комплексів ST2/Ab2 sc-dsFv (Фіг. 7). Кожен комплекс складається з молекули ST2 і одного фрагмента sc-dsFv Ab2. Молекула ST2 складається з двох IgG-подібних доменів (домени D1 і D2). Fv-домен Ab2 задіює всі шість петель CDR важкого ланцюга і легкого ланцюга для взаємодії з молекулою ST2 (Фіг. 8). У молекулі ST2 дві петлі (петля BC і петля FG) і N-кінець ST2 прямо взаємодіють з антитілом. Загальна внутрішня доступна для розчинника площа поверхні між ST2 і Ab2 sc-dsFv складає 1803 Å².

Ділянка контакту між ST2 і Ab2 є високзарядженою. ST2 містить кластер з основних залишків (Lys і Arg) у домені D1. Ця позитивно заряджена ділянка поверхні доповнює негативно заряджену ділянку на Ab2, утворений кластерами з кислотних залишків (Asp і Glu) у CDR-ділянках (Фіг. 9).

Для визначення залишків ділянки контакту застосовували два різні способи. У першому способі залишки ділянки контакту визначали за допомогою різниці у площі поверхні, доступної для розчинника. Для кожного залишку у ST2 (або Ab2 sc-dsFv) у комплексі розраховували площу

поверхні, доступну для розчинника, і порівнювали з площею поверхні, доступної для розчинника, відповідних залишків у ST2 (або Ab2 sc-dsFv) поза комплексом. Усі амінокислоти з різницею більше 10% перераховані у Таблиці 15 і Таблиці 16, відповідно, для ST2 і Ab2. Різниця у площі поверхні, доступної для розчинника, для Arg72 і Tyr81 в ST2 складає менше 10%. При цьому дослідження структури комплексу виявило, що обидва залишки утворюють водно-опосередковані водневі зв'язки із залишками важкого ланцюга Ab2 і тому вони включені у перелік.

Таблиця 15

Залишки, що складають епітоп, визначені за допомогою різниці у площі поверхні, доступної для розчинника: ST2. Номери залишків відповідають позиціям амінокислот у зрілому ST2, тобто, амінокислота 1 відповідає амінокислоті 19 з SEQ ID NO:1.

Залишок	Номер залишку	ДПП у комплексі	ДПП без комплексу	Співвідношення	відсоткова зміна (%)
LYS	1	68,5	196,9	0,348	65,2
PHE	2	48,4	106,2	0,456	54,4
PRO	19	7,9	10,8	0,731	26,9
ARG	20	0	79,6	0,000	100,0
GLN	21	81,7	98,1	0,833	16,7
GLY	22	17,8	59,3	0,300	70,0
LYS	23	51,5	130,6	0,394	60,6
TYR	26	32,4	56,6	0,572	42,8
ILE	70	16,6	30,9	0,537	46,3
VAL	71	1,7	5,3	0,321	67,9
ARG	72	52,2	56,9	0,917	8,3
SER	73	18	22,2	0,811	18,9
PRO	74	70,9	106,8	0,664	33,6
THR	75	3,8	84,6	0,045	95,5
PHE	76	0	134,3	0,000	100,0
ASN	77	2,8	47,6	0,059	94,1
ARG	78	1,1	83,6	0,013	98,7
THR	79	7	37	0,189	81,1
TYR	81	78,3	80,8	0,969	3,1
ASN77-NAG	502	148,2	249	0,595	40,5

Таблиця 16

Залишки, що складають паратоп, визначені за допомогою різниці у площі поверхні, доступної для розчинника: Ab 2

Залишки ПП	номер залишку	ДППу комплексу	ДПП без комплексу	співвідношення	відсоткова зміна
TRP	33	1,9	32,2	0,059	94,1
ILE	50	0	8,3	0,000	100,0
ASP	57	52,8	59,6	0,886	11,4
ARG	59	60,4	89,5	0,673	32,5
HIS	99	2	6,6	0,303	69,7
GLY	100	3,6	5,5	0,655	34,5
THR	101	27,5	35,9	0,766	23,4
SER	102	48,8	97,6	0,500	50,0
SER	103	45,3	111,8	0,405	59,5
ASP	104	23,1	93	0,248	75,2
TYR	105	1,9	75,4	0,025	97,5
TYR	106	36,8	64,6	0,570	43,0

Залишки ДП	номер залишку	ДПП у комплексі	ДПП без комплексу	співвідношення	відсоткова зміна
ASP	28	85,1	105,2	0,809	19,1
SER	30	11,9	50,9	0,234	76,6
ASN	31	12,5	47,1	0,265	73,5
TYR	32	1,1	109,9	0,010	99,0
TYR	49	8,4	58,1	0,145	85,5
ASP	50	8,1	51,5	0,157	84,3
ASN	53	20,2	59,5	0,339	66,1
GLU	55	27,5	38,4	0,716	28,4
THR	56	116,9	127,4	0,918	8,2
ASP	91	2	27,4	0,073	92,7
ASP	92	2,3	54,1	0,046	95,4
ASN	93	50,5	69,5	0,727	27,3
PHE	94	54,9	110,9	0,495	50,5
LEU	96	2,8	7,8	0,373	62,8

У другому способі вибирали залишки ділянки контакту, які містять щонайменше один атом у межах зумовленої відстані до свого парного білка. На основі різних граничних відстаней були визначені дві оболонки.

Внутрішня оболонка містить усі залишки на відстані до 5,0 Å.

Гранична оболонка містить усі залишки на відстані більше 5,0 Å, але менше 8,0 Å.

Повний перелік амінокислотних залишків у кожній оболонці для ST2, важкому і легкому ланцюзі Ab2 наведений у Таблицях 17, 18 і 19, відповідно. Для тих залишків, які утворюють водневий зв'язок або соляні містки зі своїми парними білками тип специфічної взаємодії вказаний у дужках після назви залишку (B3 для водневого зв'язку і CM для соляного містка).

Таблиця 17

Залишки, що складають епітоп, визначені за граничною відстанню: ST2. Номери залишків відповідають позиціям амінокислот у зрілому ST2, тобто, амінокислота 1 відповідає амінокислоті 19 з SEQ ID NO:1.

Внутрішні (0 - 5 Å)	Граничні (5 - 8 Å)
1(LYS) (B3/CM)	3(SER)
2(PHE)	4(LYS)
19(PRO)	18(CYS)
20(ARG) (B3/CM)	24(PRO)
21(GLN)	27(THR)
22(GLY)	28(VAL)
23(LYS) (B3/CM)	31(TYR)
26(TYR) (B3)	68(THR)
70(ILE)	69(CYS)
71(VAL)	80(GLY)
72(ARG)	81(TYR)
73(SER)	
74(PRO)	

75(THR) (B3)	
76(PHE)	
77(ASN) (B3)	
78(ARG) (B3/CM)	
79(THR) (B3)	
502(NAG)-77(ASN)	

Таблиця 18

Залишки, що складають паратоп, визначені за граничною відстанню: важкий ланцюг Ab2

внутрішні (0 - 5 Å)	граничні (5 - 8 Å)
33(TRP)	31(ASN)
50(ILE)	32(TYR)
57(ASP)	34(ILE)
59(ARG)	47(TRP)
99(HIS)	52(TYR)
100(GLY)	55(ASN)
101(THR)	58(THR)
102(SER) (B3)	98(ARG)
103(SER) (B3)	107(GLY)
104(ASP) (B3/CM)	108(LEU)
105(TYR) (B3)	109(ASP)
106(TYR)	

Таблиця 19

Залишки, що складають паратоп, визначені за граничною відстанню: легкий ланцюг Ab2

внутрішні (0 - 5 Å)	граничні (5 - 8 Å)
28(ASP) (B3)	2(ILE)
29(ILE)	27(GLN)
30(SER)	33(LEU)
31(ASN) (B3)	34(ASN)
32(TYR)	46(LEU)
49(TYR)	52(SER)
50(ASP) (B3/CM)	54(LEU)
53(ASN)	67(SER)
55(GLU) (B3/CM)	68(GLY)
56(THR)	89(GLN)
91(ASP) (B3/CM)	90(GLN)
92(ASP) (B3/CM)	95(PRO)
93(ASN)	96(LEU)
94(PHE)	
96(LEU)	

Залишки, що складають епітоп, визначені за допомогою різниці у площі поверхні, доступної для розчинника, збігалися із залишками з внутрішніх груп взаємодії, визначених за граничною відстанню. У Таблиці 20 перераховані всі пари у межах ділянки контакту, що містять водневі зв'язки або соляні містки.

Таблиця 20

Взаємодіючі пари у ділянці контакту

Легкий ланцюг Ab2-ST2

Важкий ланцюг Ab2-ST2

Висновки: xx'xxxx									

##		Структура 1		Відстань		Структура 2			

1	L:ASP 33	[NH2]	3.4	A:ASP 29	[O]				
2	L:ASP 35	[OH2]	2.7	A:LYS 1	[NH]				
3	L:ASP 40	[OH2]	2.8	A:ASP 30	[NH]				
4	L:ASP 50	[OH1]	3.0	A:ASP 20	[NH2]				
5	L:ASP 29	[O]	2.8	A:LYS 23	[NH]				
6	L:ASP 32	[OH1]	2.9	A:LYS 23	[NH]				
7	L:ASP 32	[OH1]	3.3	A:TYR 24	[OH]				
8	L:ASP 31	[O]	2.7	A:TYR 75	[OH1]				
9	L:ASP 31	[O]	3.0	A:ASP 76	[NH]				
10	L:ASP 31	[OH2]	3.0	A:ASP 76	[NH2]				

Окремі залишки									

##		Структура 1		Відстань		Структура 2			

1	H:ASP 105	[NH]	3.3	A:ASP 77	[O]				
2	H:ASP 102	[O]	2.8	A:ASP 77	[NH2]				
3	H:ASP 103	[O]	2.7	A:TYR 79	[OH1]				
4	H:ASP 104	[OH1]	2.7	A:LYS 1	[NH]				
5	H:ASP 104	[OH2]	2.8	A:TYR 79	[NH]				
6	H:ASP 104	[OH2]	2.9	A:ASP 20	[NH1]				
7	H:TYR 105	[O]	2.8	A:ASP 20	[NH2]				

Окремі залишки									

##		Структура 1		Factor		Структура 2			

1	L:ASP 33	[NH2]	2.7	A:LYS 1	[NH]				
2	L:ASP 35	[OH2]	2.8	A:LYS 1	[NH]				
3	L:ASP 50	[OH1]	2.9	A:ASP 20	[NH]				
4	L:ASP 50	[OH2]	2.8	A:ASP 20	[NH]				
5	L:ASP 50	[OH1]	3.0	A:ASP 20	[NH2]				
6	L:ASP 50	[OH2]	3.4	A:ASP 20	[NH2]				
7	L:ASP 32	[OH1]	3.4	A:LYS 23	[NH]				
8	L:ASP 32	[OH1]	2.8	A:LYS 23	[NH]				
9	L:ASP 31	[OH2]	3.0	A:ASP 76	[NH2]				

Ділянки, що відповідають епітопам ST2, визначені за допомогою HDX-MS аналізу, описаного у Прикладі 12, підтверджуються кристалографічними даними. Два епітопи (15-26 і 70-76) згідно HDX були ідентифіковані як епітопи згідно тим кристалографічним даним, що мають вищий дозвіл. Зокрема, було виявлено, що Arg20, Gly22, Lys23 і Tyr26, а також Thr75 розташовані близько до антитіла на відстані менше 3,4 Å. Додаткові залишки, для яких визначена відстань до антитіла, склали між 3,4 і 5 Å (Pro19, Gln21, Ile70, Val71, Arg72, Ser73 Pro74 і Phe76), також входили до складу епітопу згідно з HDX.

У загальному випадку результати підтверджують, що ділянки, що відповідають епітопам ST2, визначені за допомогою HDX-MS і кристалографії, збігаються. Основними ділянками взаємодії є ВС-петля і FG-петля Домену 1 (див. кристалографічні дані).

Посилання

- Ali, M., G. Zhang, et al. (2009). "Investigations into the role of ST2 in acute asthma in children." *Tissue Antigens* 73(3): 206-212.
- Beltran, C. J., L. E. Nunez, et al. (2010). "Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease." *Inflamm Bowel Dis* 16(7): 1097-1107.
- Brunner, M., C. Krenn, et al. (2004). "Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma." *Intensive Care Med* 30(7): 1468-1473.
- Buysschaert, I. D., V. Grulois, et al. (2010). "Genetic evidence for a role of IL33 in nasal polyposis." *Allergy* 65(5): 616-622.
- Castano R, B. Y., Mfuna Endam L, Desrosiers M (2009). "Evidence of association of Interleukin 1 receptor-like 1 gene polymorphisms with surgery unresponsive Chronic Rhinosinusitis." *American Journal of Rhinology in press(NA): NA*.
- Gudbjartsson, D. F., U. S. Bjornsdottir, et al. (2009). "Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction." *Nat Genet* 41(3): 342-347.
- Hacker, S., C. Lambers, et al. (2009). "Increased soluble serum markers caspase-cleaved cytokeratin-18, histones, and ST2 indicate apoptotic turnover and chronic immune response in COPD." *J Clin Lab Anal* 23(6): 372-379.
- Kuroiwa, K., T. Arai, et al. (2001). "Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases." *Biochem Biophys Res Commun* 284(5): 1104-1108.
- Manetti, M., L. Ibba-Manneschi, et al. (2009). "The IL-1-like cytokine IL-33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis." *Ann Rheum Dis*.
- Marvie, P., M. Lisbonne, et al. (2009). "Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans." *J Cell Mol Med*.
- Matsuyama, Y., H. Okazaki, et al. (2010). "Increased levels of interleukin 33 in sera and synovial fluid from patients with active rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 37(1): 18-25.
- Miyagaki, T., M. Sugaya, et al. (2011). "High Levels of Soluble ST2 and Low Levels of IL-33 in Sera of Patients with HIV Infection." *J Invest Dermatol* 131(3): 794-796.
- Moffatt, M. F., I. G. Gut, et al. (2010). "A large-scale, consortium-based genomewide association

study of asthma." *N Engl J Med* 363(13): 1211-1221.

Mok, M. Y., F. P. Huang, et al. (2010). "Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus." *Rheumatology (Oxford)* 49(3): 520-527.

Neill, D. R., S. H. Wong, et al. (2010). "Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity." *Nature* 464(7293): 1367-1370.

Oshikawa, K., K. Kuroiwa, et al. (2001). "Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation." *Am J Respir Crit Care Med* 164(2): 277-281.

Oshikawa, K., K. Kuroiwa, et al. (2001). "Acute eosinophilic pneumonia with increased soluble ST2 in serum and bronchoalveolar lavage fluid." *Respir Med* 95(6): 532-533.

Palmer, G., D. Talabot-Ayer, et al. (2009). "Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis." *Arthritis Rheum* 60(3): 738-749.

Pastorelli, L., R. R. Garg, et al. (2010). "Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(17): 8017-8022.

Plager, D. A., J. C. Kahl, et al. (2010). "Gene transcription changes in asthmatic chronic rhinosinusitis with nasal polyps and comparison to those in atopic dermatitis." *PLoS ONE* 5(7): e11450.

Prefontaine, D., S. Lajoie-Kadoch, et al. (2009). "Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells." *J Immunol* 183(8): 5094-5103.

Prefontaine, D., J. Nadigel, et al. (2010). "Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma." *J Allergy Clin Immunol* 125(3): 752-754.

Pushparaj, P. N., H. K. Tay, et al. (2009). "The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(24): 9773-9778.

Reijmerink, N. E., D. S. Postma, et al. (2008). "Association of IL1RL1, IL18R1, and IL18RAP gene cluster polymorphisms with asthma and atopy." *J Allergy Clin Immunol* 122(3): 651-654 e658.

Sakashita, M., T. Yoshimoto, et al. (2008). "Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis." *Clin Exp Allergy* 38(12): 1875-1881.

Shah, R. V. and J. L. Januzzi, Jr. (2010). "ST2: a novel remodeling biomarker in acute and chronic heart failure." *Curr Heart Fail Rep* 7(1): 9-14.

Shimizu, M., A. Matsuda, et al. (2005). "Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis." *Hum Mol Genet* 14(19): 2919-2927.

Sponheim, J., J. Pollheimer, et al. (2010). "Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts." *Am J Pathol* 177(6): 2804-2815.

Tajima, S., K. Oshikawa, et al. (2003). "The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis." *Chest* 124(4): 1206-1214.

Theoharides, T. C., B. Zhang, et al. (2010). "IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(9): 4448-4453.

Verri, W. A., Jr., A. T. Guerrero, et al. (2008). "IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(7): 2723-2728.

Wu, H., I. Romieu, et al. (2010). "Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans." *J Allergy Clin Immunol* 125(2): 321-327 e313.

Xu, D., H. R. Jiang, et al. (2008). "IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(31): 10913-10918.

Yanaba, K., A. Yoshizaki, et al. (2011). "Serum IL-33 levels are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis." *Clin Rheumatol*.

Zhang, Z.; Zhang, A. and Xiao, G.; "Improved Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Platform with Fully Automated Data Processing", *Analytical Chemistry*, 2012, 84(11), 4942-9

Zhang Z, Smith DL. *Protein Sci.* 1993; 2: 522.

Engen JR, Smith DL. *Anal. Chem.* 2001; 73: 256A.

Codreanu SG, Ladner JE, Xiao G, Stourman NV, Hachey DL, Gilliland GL, Armstrong RN. *Biochemistry* 2002; 41: 15161.

Hamuro Y, Coales SJ, Morrow JA, Molnar KS, Tuske SJ, Southern MR, Griffin PR. *Protein Sci.* 2006; 15: 1.

Baerga-Ortiz A, Hughes CA, Mandell JG, Komives EA. *Protein Sci.* 2002; 11: 1300.

Coales, SJ. et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009; 23: 639-647.

CCP4 (Collaborative Computational Project, No 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50, 760-763.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.

Leslie, A.G.W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* 26.

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* 40, 658-674.

- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 240-255.
- The PyMOL Molecular Graphics System. Schrödinger, L.
- Baerga-Ortiz, A., C. A. Hughes, J. G. Mandell and E. A. Komives (2002). "Epitope mapping of a monoclonal antibody against human thrombin by H/D-exchange mass spectrometry reveals selection of a diverse sequence in a highly conserved protein." *Protein Sci.* 11(6): 1300-1308.
- Coales, S. J., S. J. Tuske, J. C. Tomasso and Y. Hamuro (2009). "Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry." *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23(5): 639-647.
- Codreanu, S. G., J. E. Ladner, G. Xiao, N. V. Stourman, D. L. Hachey, G. L. Gilliland and R. N. Armstrong (2002). "Local Protein Dynamics and Catalysis: Detection of Segmental Motion Associated with Rate-Limiting Product Release by a Glutathione Transferase." *Biochemistry* 41(51): 15161-15172.
- Engen, J. R. and D. L. Smith (2001). "Investigating protein structure and dynamics by hydrogen exchange MS." *Anal. Chem.* 73(9): 256A-265A.
- Hamuro, Y., S. J. Coales, J. A. Morrow, K. S. Molnar, S. J. Tuske, M. R. Southern and P. R. Griffin (2006). "Hydrogen/deuterium-exchange (H/D-Ex) of PPAR γ LBD in the presence of various modulators." *Protein Sci.* 15(8): 1883-1892.
- Zhang, Z. and D. L. Smith (1993). "Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: A new tool for protein structure elucidation." *Protein Sci.* 2(4): 522-531.
- Zhang, Z., A. Zhang and G. Xiao (2012). "Improved Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Platform with Fully Automated Data Processing." *Analytical Chemistry* 84(11): 4942-4949.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> AMGEN INC.

SMITH, Dirk E

POLTZ, Ian

KING, Chadwick T

LIM, Ai Ching

CLARK, Rutilio

COMEAU, Michael R

KETCHUM, Randal R

MIN, Xiaoshan

SHI, Donghui

WANG, Zhulun

<120> ST2-АНТИГЕНЗВ'ЯЗУВАЛЬНІ БІЛКИ

<130> A-1712-WO-PCT

<140> - Буде заповнено після надання -

<141> 2013-05-17

<150> US 61/792,619

<151> 2013-03-15

<150> US 61/649,147

<151> 2012-05-18

<160> 175

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 556

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<220>

<221> примітка

<222> (78)..(78)

<223> Хаа в позиції 78 є Glu або Ala

<400> 1

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr

1 5 10 15

Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu

20 25 30

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

35 40 45

2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu
210 215 220

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

Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr
245 250 255

Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln³ Gln Glu Glu Gly Gln
 260 265 270

Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg
 275 280 285

Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu
 290 295 300

Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 570

<212> B120K

<213> Homo sapiens

<400> 2

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 25 30

Arg Gln Ile Gln Val Phe Gln Asp Gln 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
 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 5
 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
 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
 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
 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
 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
 305 310 315 320

6

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

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

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

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

Leu Glu Leu Lys Ala Gly Leu Gln 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

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 7
 Ala Met Pro Val Lys Lys Ser Pro Arg Arg Ser Ser Ser Asp Glu Gln
 545 550 555 560
 Gly Leu Ser Tyr Ser Ser Leu Lys Asn Val
 565 570
 <210> 3
 <211> 270
 <212> Binok
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Met Lys Pro Lys Met Lys Tyr Ser Thr Asn Lys Ile Ser Thr Ala Lys
 1 5 10 15
 Trp Lys Asn Thr Ala Ser Lys Ala Leu Cys Phe Lys Leu Gly Lys Ser
 20 25 30
 Gln Gln Lys Ala Lys Glu Val Cys Pro Met Tyr Phe Met Lys Leu Arg
 35 40 45
 Ser Gly Leu Met Ile Lys Lys Glu Ala Cys Tyr Phe Arg Arg Glu Thr
 50 55 60
 Thr Lys Arg Pro Ser Leu Lys Thr Gly Arg Lys His Lys Arg His Leu
 65 70 75 80
 Val Leu Ala Ala Cys Gln Gln Gln Ser Thr Val Glu Cys Phe Ala Phe
 85 90 95
 Gly Ile Ser Gly Val Gln Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp Ser Ser
 100 105 110
 Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Gln Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Thr
 115 120 125
 Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu
 130 135 140

Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys⁸ Lys Asp Lys Val Leu
 145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4

<211> 556

<212> Биток

<213> Macnea fascicularis

<400> 4

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

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

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

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

9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Gly Ala Gln Phe Leu Ala Thr Val Gln Trp Gln Leu Asn Gly Asn
245 250 255

Lys Ile Thr Asp Phe Ser Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln
260 265 270

Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Val Asn Thr Val Leu Arg

275 280 285 10
 Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Arg Tyr Asp Cys Leu
 290 295 300
 Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Ile Arg Leu Ser Arg
 305 310 315 320
 Lys Asn Pro Ile Asp His Gln Ser Thr Tyr Cys Ile Ile Ala Val Cys
 325 330 335
 Ser Val Leu Leu Met Leu Ile Asn Ile Leu Val Ile Ile Leu Lys Thr
 340 345 350
 Phe Trp Ile Glu Ala Thr Leu Leu Trp Arg Asp Ile Ala Lys Pro Tyr
 355 360 365
 Lys Thr Arg Asn Asp Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Val Ile Tyr Pro
 370 375 380
 Arg Asn Tyr Thr Ser Ser Ala Asp Gly Ala Ser Arg Val Glu Tyr Phe
 385 390 395 400
 Val His Gln Ile Leu Pro Asp Val Leu Glu Asn Lys Cys Gly Tyr Thr
 405 410 415
 Leu Cys Ile Tyr Gly Arg Asp Met Leu Pro Gly Glu Asp Val Val Thr
 420 425 430
 Ala Val Glu Thr Asn Ile Arg Lys Ser Arg Arg His Ile Phe Ile Leu
 435 440 445
 Thr Pro Gln Ile Thr His Ser Glu Glu Phe Ala Tyr Glu Gln Glu Val
 450 455 460
 Ala Leu His Ser Ala Leu Ile Gln Asn Asp Ser Lys Val Ile Leu Ile
 465 470 475 480
 Glu Met Glu Ala Leu Ser Glu Leu Asp Met Leu Gln Ala Glu Ala Leu
 485 490 495

11

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

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

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

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

<210> 5

<211> 570

<212> Binox

<213> Macaca fascicularis

<400> 5

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 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
 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

Thr Cys Met Leu Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro
 115 120 125

12

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
 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

Glu Gly Met Asn Leu Ser Phe Leu Ile Ala Phe 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
 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

Leu Met Asp Ser Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys
 275 280 285

Pro Asp Asp Ile Pro 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
 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 Thr Val Lys Gln Lys Val Pro
 340 345 350 13

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

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

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

Leu Glu Leu Lys Ala Gly Leu Glu Asn Met Ala Ser Gln 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

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

14

Gly Leu Ser Tyr Ser Ser Leu Lys Asn Val
565 570

<210> 6

<211> 270

<212> Biorok

<213> Macaca fascicularis

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Ser Glu Ser Gly Asp Gly

165 170 175 15
Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe
180 185 190

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

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

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

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

Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Ile
260 265 270

<210> 7
<211> 1332
<212> JHK
<213> Homo sapiens

<400> 7
caggccaac tggtagcgc tgggctgag gtaagaagc ctggggccctc agtgaaggc 60
tcctgcaagg ttccggata caccctcact gaattatcca tacactgggt ggcacaggt 120
cctggaaaag gcttgagtg gatgggggt ttggtcctg aagatggta aacaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtaccatg accgaggaca caletacaga cacagcciac 240
atggagctga gcagctgag aictaggac acggccgtgt attactgtac aacagaggt 300
agcagtgccc tcttgacta ctggggccag ggaacctgg taccgtctc ctgagctagc 360
accaagggcc catcggtctt cccctggcg ccttgctcca ggagcaetc cgagagcaca 420
ggggccctgg gctgctggt caaggactac tcccagaac cggtagcgt gtgtgggaac 480
tcaggegtc tgaccagcgg cgtgcacacc tcccagctg tctacagtc ctgaggactc 540
tactcctca gcagctggt gaccgtgcc tccagcaact tgggaccca gacctacac 600
tgcacgtag atcacaagc cagcaacac aaggtggaca agacagtga ggcacatgt 660

16

tgggicgagi gccaccggg cccagcacca ccgtgggcag gaccgtcagt cttctcttc 720
 cccccaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggacce ctgaggtcac gtgcgggtg 780
 gtggacgiga gccacgaaga ccccagggtc cagltcaact ggtacgttga cggcgtggag 840
 gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gaggcgttca acagcacgti ccgtgtgttc 900
 agcgtcttca ccgtgtgtca ccaggacigg ctgaacggca aggagfacaa gtgcaaggtc 960
 tccaacaaag gccctccage ccccatgag aaaacctct ccaaaaccaa agggcagccc 1020
 cgagaaccac aggtgtacac ccgtcccca tcccggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080
 agcctgacct gccgtgtcaa aggtctctac cccagcgaca tcccggttga gtggagagag 1140
 aatgggcage cggagaacaa ctacagacc acacctcca tctctgactc cgacggctcc 1200
 ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaactcttc 1260
 tcatctccg tgaatcatg ggcctgtcac aacctata cgcagaagag cctctccctg 1320
 tctcgggta aa 1332

<210> 8
 <211> 1341
 <212> JHK
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 gaggtgcagc tgggtcagtc tggagcagag gtgaaaaagc cgggggagtc tctgaagatc 60
 tctgtlaagg gtctggata cagctttacc aactacttga tctggtgggt gcgccagatg 120
 cccggpaaag gcttggagtg gatggggatc atctactctg gtaacttga taccagatc 180
 agcccgctct tcaaggcca ggtaccatc tccgagaca agtccatcac caccgctac 240
 ctgcagtgtg gcagcctgaa ggctcggac accgcatgt attactgtc gagacatgt 300
 acctgtctc actactacg tctggaagtc tggggccaag ggaccacgtt caccgtctc 360
 tcatgtagca ccaagggcc atcggtctc cccctgggc cctgtctag gacacctcc 420
 gagagcacag cggccctggg ctgctgttc aaggactact tcccgaacc ggtgacgggt 480
 tctgtgaact caggcgtct gaccagcggc gtgcacacct tccagctgt cctacgtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtgtg accgtgctt ccagcaact cggcaccag 600
 acctacact gcaacgtaga tcaaaagcc agcaaacaca aggtggacaa gacagttag 660

17

cgcaaatgtt gfgicgagtg cccaccgfgc ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc 720

ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgact cccggacccc tgaggtaacg 780

tgcgtgtgtg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agtcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc 900

cggtgtgtca ggcgtctcac cgtgtgtcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960

tgaagggtct ccaacnaagg cctccacgcc cccatcgaga aaacctctc caaaacnaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1080

aaaccaggta gccagacctg cctgtgtcaa ggctctacc ccaggacat cggcgtggag 1140

tggagagca atgggcagcc ggagaacaac taagagaca cactctccat gctggactcc 1200

gacggctctc tctctctca cagcaagtc accgtggaca agagcaggig gcagcagggg 1260

aaagtctct catgtccgt gatgcatgag gctctgcata accactaac gcagaagagc 1320

cctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 9

<211> 1344

<212> JHK

<213> Homo sapiens

<400> 9

gaggtgcage tgggtggagc tggggggagg ttgttacgc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactctcagt acctacgaca tgcactggat ccgccaaagt 120

ccaggaaaaa atctggagtg ggtctcagct atgacttg ctggtgacac atactatcca 180

ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaagatg ccaagaacte ctgtatctt 240

caaatgaaca gctgagagc cgggggacaag gctgtgtatt actgtgcaag agggggagut 300

ggctacatt acgactacta cgttatagac gctgggggct aagggaccac ggtcacctgc 360

ttctagctca gcaacagggt cctctgggtc ttccctctgg cgcctctctc caggagcacc 420

tccgagagca cagcggccct gggtgtcctg gtcaaggact acitcccca accggtgaag 480

gfgicgltga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ccttccagc tglctacag 540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgacctgc cctccagcaa ctccggcacc 600

cagacctaca cctgcaactg agatcacaag ccagcaaca ccaagggtga caagacagtt 660

gagcgaatat gttgtgtga ggtccacccg tgcacagcac caoctgtgac aggaccttca 720

18

gtcttccctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac cctgaggic 780
 acgtgcgtgg tggtagacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 840
 gacggcggtg aggtgcataa tgcacagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 900
 ttccgtgtgg tcagcgtctt caccgttgtg caccaggact ggcgzaacgg caaggagtae 960
 aagtgcgaagg tctcaacaa aggcctccca gcccccatcg agaaaacct ctcacaaacc 1020
 aaagggcage cccgagaacc acagggtgtc acctgcctcc cctcccgga ggagatgacc 1080
 aagaacacgg tcagcgtgac ctgcctgttc aaaggcttct accccagcga catgcctgtg 1140
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaae aactacaaga ccacacctcc catgtggac 1200
 tccgaaggct ccttctctt ctacagcaag ctcccggtg acaagagcag gtggcagcag 1260
 gggaaagtct tctcatgctc cgtgatgat gaggtctgc acaaccacta cagcagaag 1320
 agcctctccc tcttccggg taaa 1344

<210> 10

<211> 1329

<212> JHK

<213> Homo sapiens

<400> 10

caggltccage tggacagtc tgggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggic 60
 tcttgcgagg ttccggatt cctctcact gaattatccg tgaactgggt ggcacaggct 120
 cctggaaaag ggttgagtg gatggaggt ttgatctg aagatgtaa acaatctac 180
 gcacagaagt tccaggcag agtcccttg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag aictgaggac accgccgtgt attactctgc aacatggtg 300
 gucttccat ttactctg gggccaggga acctggica ccgtctctc agctagcacc 360
 aaggccccat cgtcttccc cctgcgcce tctccagga gcacctcga ggcacagcg 420
 gccctgggt gccctgtcaa ggactactt ccgaaccgg tgacgggtc gtggaactca 480
 gggtcttga ccagggcgt gcaacacct ccagctgctc tacagctctc aggaactctac 540
 tccctacga gggtgtgac cgtgcctcc agcaacttc gcaaccagac ctacacctgc 600
 aacgtagatc acaagccag caacaccaag gggacaaga cagttagcg caaatgtgt 660
 gtctagtgcc caccgtccc agcaccact gtggcaggac cgtcagttt ccttctccc 720

19
 ccaaaaccca aggaacacct catgatctcc cggacacctg aggtacgtg cgtgtgtgtg 780
 gacgtgagcc acgaagacct cgaggfcccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 840
 catatgccca agacaagacc acggggaggag cagttaaca gcacgttccg tgtgttcage 900
 gtctcaccg ttgtcaaca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggctcc 960
 aacaaagcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaacaaagg gcagcccccga 1020
 gaaccacagg tctacacct gcccctatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcage 1080
 ctgacctgcc ttgtcaagg ctctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1140
 gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctccatgc tggactccga cggctccttc 1200
 ttctctaca gcaugctac cgtggacaag agcagggtgc agcaggggaa cgtctctca 1260
 tctccgtga tgcattaggg tctgcacaac cactacacgc agaagacct ctccctgtct 1320
 ccgggtana 1329

<210> 11
 <211> 1341
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 gaggtgcagt tggggagtc tgggggagge tgggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tctgtgcag cctctggatt caccitcagt agttatgaca tptactgggt ccgccaagct 120
 acagggaag gtctggagtg ggtctcaggt attgatctg ttggggacac atattatcca 180
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaaag ccaagaactc cgtgtatct 240
 caaatgaaca ccttgagagc cggggacacg gcctgtatt actgtgtaag aggcattctac 300
 ggtgaacttt attattacgg ttggacgtc tggggccacg ggacacaggt caccgtctcc 360
 tcagctaga ccaaggggcc atcggcttc cccctggcgc cctgtccag gacacctcc 420
 gagagcacag cggccctggg ctgctgggc aaggactact tcccgaacc ggtgacgggtg 480
 tcgtggaaat caggcctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtgtg accgtgccct ccagcaact cggcaccag 600
 acctacacct gcaagttaga tcaaaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttag 660
 cgcanaatgt gtgtgagtg ccacacctgc ccagaccac ctgtggcagg accgtcagtc 720
 ttctctctcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgact cccggacccc tgaggtcacg 780

20

tgcgfggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgagggtc agtcaactg gtacgtggac 840
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc 900
 cgtgtggta cggctctcac cgtgtgcac caggactggc tgaacggcaa gtagtacaag 960
 tgcagggtct ccaacaagg cctcccagcc cccatcgaga aaacatctc caaaaccaaa 1020
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacac ctgccccat cccgggagga gatgaocaag 1080
 aaccaggta ggcgtaccct cctgtcaaa ggtcttacc ccagcgacat cgcgtggag 1140
 tggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cactcccat gctggactcc 1200
 gacggctct tcttctcta cagcaagctc acctggaca agagcaggag gcagcaggag 1260
 aactcttct catgctcgt gatgcagag gctctgcaca accactaac gcagaagagc 1320
 ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 12

<211> 1344

<212> JHK

<213> Homo sapiens

<400> 12

gaggtgcagc tgggtggagc tgggggaggc ttgtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tctgtgcag cctctggatt cacttcagt acctacgaca tgcactgggt cgcctaaact 120
 acaggaaaag gtctggagtg ggctcagct atgactctg ctgggacac atactatcca 180
 ggctccgiga agggccgatt caccatctcc agagaagatg ccaagaactc ctgtatctt 240
 caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agggggagat 300
 ggctacaatt acgactacta cgggtatagc gtctggggcc aagggaaccac ggtaaccgtc 360
 tcttcagcta gcaccaaggc cccatcggtc tccccctgg cgcctgtctc caggagcacc 420
 tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtaaggact actccccga acccgtgacg 480
 gtgtcttga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca cctcccagc tgtctacag 540
 tctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa ctctggcacc 600
 cagacctaca cctgaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaagggtga caagacagti 660
 gaggcgaat gttgtgicga gtgcccaacc tgcctcagac cactgtggc aggacctca 720
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac acctcatga tctccggac cctgaggtc 780

21

acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctgtgtacgtg 840
gacggcggtgg aggtggcataa tgcgaagaca aagccacggg agggagcagt caacagcacg 900
tccgtgtgg tcagctgtct caccgtgtg caccaggact ggcgaacgg caaggagtac 960
aagtccaagg tctcaacaa aggcctccca gcccctatg agaaaaccat ctcaaaacc 1020
aaaggcgacg cccgagaacc acagggttac accctgcccc catcccgga ggagatgacc 1080
aagaaccagg tcagctgtac ctgctgtgt aaaggtctt accccagcga catgctgtg 1140
gagtggtgaga gcaatggga gccggagac aactacaaga ccacacctcc catgtgtgac 1200
tccgacggct cctctctct ctacagcaag ctacacgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctatgtct cgtgatgat gaggtctgc acaaccacta cagcgagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg taaa 1344

<210> 13

<211> 1344

<212> JHK

<213> Homo sapiens

<400> 13

gaggtgcagc tgggtggagc tgggggaggg ttgtacagc ctgggggggc cctgagacac 60
tctgtgtcag cctgtgtgt cacttcagt acctacgaca tgcactgggi ccgcnaact 120
acaggaaaag gtctggagt ggtctcagct attgatctt cgtgtacac atactaacc 180
ggctccgta agggccgatt caccactcc agagaagatg ccaagaaac ctgtatctt 240
caaatgaaca gctgtgagc cggggacacg gctgtgtat actgtgcaag agggggagat 300
ggctacaati acgactacta cgttatagac gtcgggggc aagggaacc ggtaccgic 360
tctcageta gcaccaagg cccatggic tccccttg cgcctgtct caggagacc 420
tcggagagca cagggccct gggctggctg gtcaaggact acttcccca accggtgacg 480
gtgtgtgga actcagggc tctgaccag ggtgtgcaca cctccagc tgtctacag 540
tctcaggac tctactcct cagcagctg gtgaccgtg cctccagcaa ctccggacc 600
cagactaca cctgcaact agatcacaag cccagcaaca ccaaggtga caagacagt 660
gagtgcaatt gtgtgtgga gtgcccacc tgcacagc cactgtggt aggaccgtc 720
gtctctct tccccaaa accuaggac accctcatg tctccggac cctgaggic 780
acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctgtgtacgtg 840

22

gacggcggtg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagti caacagcacg 900
 ticcgtgtgg icagcgtcct caccgtgtg caccaggact ggcigaacgg caaggagtac 960
 aagtgcaagg tctcaacaa aggcctccca gcccctatg agaaaacct ctcnaaaacc 1020
 aaaggcgagc cccgagaacc acagggttac accctgcccc cctcccgga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tcagcgtgac ctgcctgggc aaaggcttct accccagcga cctgcctgt 1140
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacacctc catgctggac 1200
 tccgacggct ccttctct ctaacagaa ctaacctgg acaagagcag gtggcagcag 1260
 gggaaagct tctcagctc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccaata caagcagaag 1320
 agcctctccc tgcctcggg taac 1344

<210> 14
 <211> 1341
 <212> JHK
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 gaggtgcagc tgggtgagtc tggggaggc ttgtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
 tectgtgcag cctctggatt cacttcagt agctacgaca tgtactgggt cggccaagct 120
 acaggaaaag gtctggatg ggtctcagct atgatactg ttgtgacac atactatcca 180
 ggtctcgtga agggccgatt caccatccc agaganaatg ccaagaactc ctgtatctt 240
 caaatgaaca gctgagagc cggggacacg gctgtgatt actgtccag aggcgggtgac 300
 taagactact ctattacgg tatggacgc tggggccaag ggaccacggt caccgtctc 360
 taagctagca ccaaggcccc ateggtctt cctgtgggc cctgtccag gacacctcc 420
 gagagcacag cggccctggg ctgcctggc aaggactact tcccgaaac ggtgacggg 480
 tcttggaact caggcgtct gaccagcggc gtgcacact tccagctgt cctacagtc 540
 tcaggactct acfcccag cagcgggtg accgtgcct ccagcaacti cggcaccag 600
 acctacacct gcaactaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag 660
 cgcgaatgtt gtgtgagtg ccaacgtgc ccagcaacc ctgtggcagg accgtcagtc 720
 ttcctctcc cccnaaacc caaggacac ctatgatct cccgacccc tgaggtcacg 780
 tctgtgtggt tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtc agtcaactg gtacgtggac 840

23

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc 900
 cgtgtggtta ggttctctac cgttgttcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
 tgcagggtct ccacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc cnaaaccaaa 1020
 gggcagcccc gagaaecaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1080
 aaccaggta gcttgacctg cctgttcaaa ggttctacc ccagcgacat cgcgtggag 1140
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacac tacaagacca caccctccat gctggacttc 1200
 gacggctctt tctctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggig gcagcagggg 1260
 aacgtctctt catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactaac gcagaagagc 1320
 cctccctgt ctcgggtta a 1341

<210> 15
 <211> 1326
 <212> JHK
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 cagggtcagc tgggtgagtc tgggggaggc gtgttcacgc ctgggaggtc cttgagactc 60
 tctgtgcag cgtctggatc cacttcagt agctatgga tgcactgggt cggccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagti atatggtatg gtggaagica taaatactat 180
 gcagaactcc tgaaggccg attacacatc tccagagaca attcnaagaa cagctgttat 240
 ctgcaattga acagctcgag agccgaagac acggctgtct attactgtgc gagagacaag 300
 ggcgagttg actactgggg ccagggaacc ctgttcaccg tctctcagc tagcaceaa 360
 ggcccatcgg tcttccccf ggcccccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 420
 ctgggtctgc tggtaagga ctacttccc gaaccggta cgggtctgtg gaactcaggc 480
 gctctgacca gcggcggtca caacttccc gctgtctac agtctcagg actctactcc 540
 ctccagcagc tgggaacctg gccctccagc aacttcggca cccagaceta cactgcac 600
 gtagatcaca agccagcaa caccuaggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgttc 660
 gagtgcacac cgtgcccagc accacctgtg gcaggacctg cagtctctct ctccccca 720
 aaaccaagg acacctcat gatctccgg accctgagg tcacgtgcgt ggtgtgtgac 780
 gtgagccacg aagacccga ggtccagtc aactggtac tggacggcgt ggaggtgcat 840
 aatgccuaga caagccacg ggaggagcag tcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 900

24

ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctcaac 960
 aaaggcctcc cagcccccac cgagaaaaacc atctccaaaa ccaaaggga gccccgagna 1020
 ccacagggtg acuccctgcc cccatcccg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1080
 acctgcttg tcaaaaggtt ctacccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140
 cagccggaga acaactacaa gaccacacct ccatgctgg actccgacgg ctctcttte 1200
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt ctctctatgc 1260
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tscacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1320
 ggtaaa 1326

<210> 16
 <211> 1326
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 cagggtcagc tgggtgagtc tgggggagcc gtggccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tctgtgcag cgtctggait cacttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggtcggagtg gggtggcagt atatggata ctggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attaccatc tcagagaca attcaagaa cacttgcat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccaggac acggctgtgt attactgtgc gagagataaa 300
 gggtaacttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctctcagc tagcaccag 360
 ggccatcagg tcttccctct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 420
 ctgggctgac tggtaagga ctacttccc gaaccggta cgggtcgtg gaactcagcc 480
 gctctacca gcggcggtga cacttccca gctgtctac agtctcagg actctactcc 540
 ctcagcagcg tggtaaccgt gccctcagc aacttggca ccagaceta cacttgcac 600
 giagatcaca agcccagcaa caacaaggcg gacaagacag ttgagcgcaa atgtgtgtc 660
 gaggccccac cgtgccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttct ctccccca 720
 aaaccaagg acacctcat gattcccg accctgagg tcaactgctg ggtgtggac 780
 gtgagccagc aagaccaga ggtccagtc aactgttac tggacggcgt ggaggtgcct 840
 aatccaaga caagccagc ggaggagcag ttaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 900

<210> 17
 <211> 1326
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 17	
caggatgcage tggdggagtc tgggggaggc ggggkccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
tcctgfgcag cgtctggatt caacttcagt agctatggca tgcactgggt cctccaggct	120
ccaggcaagg ggcctggagt ggtggcagtt atattglat ggggaagtca taataactat	180
gcagaactcc tgaagggccg attaccatc tcagagaca attcaagaa cacgtgtat	240
ctgcaattga acagcttgag agccgaagac acggctgtct attactgtc gagagacaag	300
ggcgagittg actactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctctcagc tagcaccaag	360
ggcccatcgg tctctccctt ggcggcctgc tccaggagca ctctcgagag cacagcggcc	420
ctgggctgcc tggtaagga ctactcccc gaaccggta cgtctctgtg gaactcaggc	480
gctctgacca ggggggtgca cacttccca cgtgtctat agtctcagg actctactcc	540
ctcagcagcg tggtagacct gcccctcagc aacttggca cccagacctt caactgcaac	600
gtagatcaca agcccgagca caccaggtg gacaagacag ttgagcgca atgttgtgtc	660
gagtgccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggacctt cagttctct ctctccccca	720
aaaccacaag acuccctcat gatctccgg accctgagg tcactgtctt ggtgggggac	780
gtgagccaag aagaccctga ggtccagtt aactggtac tggacggcgt ggaggtgcat	840
aatgccaa gaagaccacg ggaggagcag ttcaacagca cgctcgtgt ggtagcgtc	900
ctaacctgtg tgaaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtcga pyctccaac	960

26

```

aaaggectcc cagcctccat cgagaaaacc atctcaaaa ccaaagggea gccccgagaa 1020
ccacagggtg acaccctgcc cccatccgg gaggagatga ccaagaacca ggtragectg 1080
acctgcctgg tcaaaagcct ctaccctcag gacatcgccg tggagtgagg gagcaatggg 1140
cagccggaga actactacaa gaccacacct ccatgctgg actccgacgg ctctctctc 1200
ctctacagca agctacacct ggacaagagc aggtggcagc aggggaacct ctctctatgc 1260
tcctgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgaga agagctctc cctgtctccg 1320
ggtaaa 1326

```

<210> 18

<211> 444

<212> Biosx

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

27

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

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

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

28
340 345 350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 19

<211> 447

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

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

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

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

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

29
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Gly Thr Ser Ser Asp Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
 210 215 220
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Gln Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 290 295 300

30

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 20

<211> 448

<212> Binox

<213> Homo sapiens

<400> 20

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 Thr Tyr
20 25 30

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

35 40 45 31
 Ser Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln 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
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Gln Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
 210 215 220
 Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

32

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

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

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 21

<211> 443

<212> Блок

<213> Homo sapiens

33

<400> 21

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 Glu Val Ser Gly Phe Ile Leu Thr Glu Leu
20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Trp Trp Asp Phe His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

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

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

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

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn
180 185 190

Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro
 210 215 220 34

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285

Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
 325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Gln
 370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

35

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 22

<211> 447

<212> Enok

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

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

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

Ser Gly Ile Asp Thr Val Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95

Arg Gly Ile Tyr Gly Asp Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly
 100 105 110

His Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175 36
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
 210 215 220
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

37

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 23

<211> 448

<212> Biorok

<213> Homo sapiens

<400> 23

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 Thr Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Thr Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

38

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
210 215 220

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Gln Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350 39

Pro Pro Ser Arg Glu Gln Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Gln Trp Glu Ser
 370 375 380

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

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 24

<211> 448

<212> B1a0k

<213> Homo sapiens

<400> 24

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 Thr Tyr
 20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Thr Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

40

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

Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln 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
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
210 215 220

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val

290 295 300 41
 Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 25
 <211> 447
 <212> Bior
 <213> Homo sapiens
 <400> 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 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45 42

Ser Ala Ile Asp Thr Val Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Arg Gly Gly Asp Tyr Asp Tyr Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
 210 215 220

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

43

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Gln Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 26

<211> 442

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

44

<400> 26

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
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Gly Gly Ser His 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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

45

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
 290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 305 310 315 320

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

420 425 430 46
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

 <210> 27
 <211> 442
 <212> Binok
 <213> Homo sapiens

 <400> 27
 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
 35 40 45

 Ala Val Ile Trp Tyr Thr 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 His
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175 47

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
 290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 305 310 315 320

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

48

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 28

<211> 442

<212> Sinok

<213> Homo sapiens

<400> 28

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
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Gly Gly Ser His 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

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

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

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

49

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

50

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 29

<211> 118

<212> Binor

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
20 25 30

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

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

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

51

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 30

<211> 121

<212> Бизон

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 31

52

<211> 122
 <212> Binok
 <213> Homo sapiens
 <400> 31

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 Thr Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32
 <211> 117
 <212> Binok
 <213> Homo sapiens

<400> 32

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 Glu Val Ser Gly Phe Ile Leu Thr Glu Leu
 20 25 30

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

35 40 45 53
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Lys Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Trp Trp Asp Phe His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 33
 <211> 120
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 33

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

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

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

Ser Gly Ile Asp Thr Val Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95

Arg Gly Ile Tyr Gly Asp Phe Tyr Tyr Tyr Gly 54
 100 105 110 Leu Asp Val Trp Gly

His Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120

<210> 34
 <211> 122
 <212> Black
 <213> Homo sapiens

<400> 34

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 Thr Tyr
 20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Thr Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 122
 <212> Black
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15 55

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Thr Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 36

<211> 121

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 36

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 Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Asp Thr Val Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
 50 55 60

56

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Gly Gly Asp Tyr Asp Tyr Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37

<211> 116

<212> Eiaox

<213> Homo sapiens

<400> 37

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
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Gly Gly Ser His 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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

57

<210> 38
 <211> 116
 <212> B1a0k
 <213> Homo sapiens
 <400> 38

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
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Thr 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 His
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 39
 <211> 116
 <212> B1a0n
 <213> Homo sapiens
 <400> 39

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

58

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

Ala Val Ile Trp Tyr Gly Gly Ser His 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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 40
 <211> 5
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 40

Glu Leu Ser Ile His
 1 5

<210> 41
 <211> 5
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 41

Asn Tyr Trp Ile Gly
 1 5

<210> 42
 <211> 5
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 42

39

Thr Tyr Asp Met His

1 5

<210> 43

<211> 5

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

<400> 43

Glu Leu Ser Val Asn

1 5

<210> 44

<211> 5

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

<400> 44

Ser Tyr Asp Met Tyr

1 5

<210> 45

<211> 5

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

<400> 45

Thr Tyr Asp Met His

1 5

<210> 46

<211> 5

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

<400> 46

Thr Tyr Asp Met His

1 5

<210> 47

<211> 5

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

60

<400> 47

Ser Tyr Asp Met Tyr

1 5

<210> 48

<211> 5

<212> Biorok

<213> Homo sapiens

<400> 48

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 49

<211> 5

<212> Biorok

<213> Homo sapiens

<400> 49

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 50

<211> 5

<212> Biorok

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 51

<211> 17

<212> Biorok

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gly Phe Gly Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

61

<210> 52
 <211> 17
 <212> Biохим
 <213> Homo sapiens

<400> 52

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

Gly

<210> 53
 <211> 16
 <212> Биохим
 <213> Homo sapiens

<400> 53

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

<210> 54
 <211> 17
 <212> Биохим
 <213> Homo sapiens

<400> 54

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

Gly

<210> 55
 <211> 16
 <212> Биохим
 <213> Homo sapiens

<400> 55

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

<210> 56
 <211> 16

62

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

<210> 57

<211> 16

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

<210> 58

<211> 16

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

<400> 58

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

<210> 59

<211> 17

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

Gly

<210> 60

<211> 17

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

<400> 60

Val Ile Trp Tyr Thr Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15 63

Gly

<210> 61
 <211> 17
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 61

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

Gly

<210> 62
 <211> 9
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 62

Glu Asp Ser Ser Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 63
 <211> 12
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 63

His Gly Thr Ser Ser Asp Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 64
 <211> 14
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 64

Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val
 1 5 10

64

<210> 65
 <211> 8
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 65

Trp Trp Asp Phe His Phe Asp Phe
 1 5

<210> 66
 <211> 13
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 66

Gly Ile Tyr Gly Asp Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 67
 <211> 14
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 67

Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val
 1 5 10

<210> 68
 <211> 14
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 68

Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val
 1 5 10

<210> 69
 <211> 13
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 69

Gly Gly Asp Tyr Asp Tyr Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

65

<210> 70
 <211> 7
 <212> Билор
 <213> Homo sapiens

<400> 70

Asp Lys Gly Gln Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 71
 <211> 7
 <212> Билор
 <213> Homo sapiens

<400> 71

Asp Lys Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 72
 <211> 7
 <212> Билор
 <213> Homo sapiens

<400> 72

Asp Lys Gly Gln Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 73
 <211> 660
 <212> JHK
 <213> Homo sapiens

<400> 73

gacctctgga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctcggggcga gagggccact 60

atcaactgca agtcagcca gactcttita tacagctcca acaataagga ctacttagct 120

tgttaccagc agaagccggg acagccttct aaactgcica ttactgggc atctaccgg 180

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagatt cactctcacc 240

atcagcagcc tgcaggtgga agatgtggca gttattact gtcaccaata ttataatact 300

ccgtggacgt tggccaagg gaccaagggt gaaatcaaac gtacgatggc tgcaccatct 360

gtcttcactt tcccgccatc tgaagagcag ttgaatatgt gaactgcctc tgttgtgtgc 420

66

ctgtctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgcctc 480
 caatcgggtu actcccagga gagtgtaca gacaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
 ctacagaca cctgaagct gageaanga gactacaga aacacaaat ctacgcctgc 600
 gaagtcacc atcagggect gagctgcce gtcacaaag gettcuacag gggagaggt 660

<210> 74
 <211> 642
 <212> JHK
 <213> Homo sapiens

<400> 74
 gacatccaga tgaccagtc tccatctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcactgccc aggcgagtc ggcattagt aactatcaa atgggtaca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctacgtctc gatctacat gcatcaatt tggaaacag ggcccacac 180
 aggttcagt gaagtggatc tgggacagat ttacttca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagataat caacatatta ctgtcacag gatgataat tccctctac ttccggcgga 300
 gggaccaagg tgagataca acgtacagt gctgcacat ctgtctcat ctcccacca 360
 tctgatgagc agttgaaac tggaaactgc tctgtgtgt cctgtctgaa taactctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtcgaagggt gataacgcc tcaatcggg taactccag 480
 gagagtgca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gctcagcag caccctgac 540
 ctgagcaag cagactaca gaaacacaa gctacgctt gcaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctgc cctcacaaa gagctcaac aggggagagt gt 642

<210> 75
 <211> 654
 <212> JHK
 <213> Homo sapiens

<400> 75
 gataatgaa tgaactagtc tccactctc ctgcacctc cctctggaga gccggctcc 60
 atctctgca ggtctagtc gagcctctg catagtgaig gataaccaat ttggattgg 120
 tacttcaga agccaggga gctccacag ctctgactt attgggttc taatcgggce 180
 tccgggtcc ctgacaggt cactggcagt ggacagga cagatttac actgaaaac 240
 agcagagtg aggcagga tctggggtt taactgca tcaagctc acaattctc 300

67

acttccggcg gagggaccaa ggtagagatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360
 atctcccgcc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgi gtgcctgctg 420
 aataacttct atcccagaga gggcaaatga cagtggaaagg tggataacgc cctcraatcg 480
 ggtaactccc aggagaggtg cacagagcag gacagcaagg acagcaacta cagcctcagc 540
 agcaacctga cgtgagcga agcagactac gagaacaca aggtctacgc ctgcgaagtc 600
 accatcagg gccgagctc gcccgtcaca sagagctica acaggggaga gtgt 654

<210> 76
 <211> 657
 <212> JHK
 <213> Homo sapiens

<400> 76
 gatttttga tgaccragac tccactctct ctgcccga cccctggaga gccggcctcc 60
 atctctgta agtctagta gagcctctg catagtaatg gaaagacctt ttgtattgg 120
 ttctgcaga agccaggcca gctccacaa ctcctgatct atgaagttc caaccggttc 180
 tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagattcac actgaaaatc 240
 agccgggtgg aggtctgaga tgttgggggt tattiactga tgcaaatat acagcttct 300
 ctactttcg gccgagggaac caaggtggag atcaaacgta cggtggtgc accatctgtc 360
 ttactctcc cgcctatga tgagcagttg aaacttgaa ctgctctgt tgggtgctg 420
 ctgaataact tctatccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cggcctccaa 480
 tgggtaact cccaggagag tgcacagag caggacagca aggacagcac ctacagctc 540
 agcagcaacc tgacgtgag caagcagac tacgagaaac acaagctta cgcctggaa 600
 gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 77
 <211> 654
 <212> JHK
 <213> Homo sapiens

<400> 77
 gatatttga tgactcagtc tccactctcc ctgcccga cccctggaga gccggcctcc 60
 atctctgta ggtctagta gagcctctg tatagtatg gaaacaacta ttgtattgg 120
 ttctgcaga agccaggcca gctccacac ctcctgatct attgggtc taatcgggc 180

68

tccggggicc ctgacagggt cagtggcagt ggaicaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggcigagga tgttgggtt tattactgca tgcgaagctc acaaactctc 300
 acttctggcg gaggagacaa ggtggagatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360
 atctcccgcc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgtgtg gtgctgtctg 420
 aataacttct atccagaga ggcctaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
 agcaccctga cgtgagacaa agcagactac gagaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
 acccatcagg gccigagctc gccctgcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 78

<211> 654

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 78

gataatgtaa tgactcagtc tcaactctcc ctgcctcgca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctctgca ggtctagta gagcctctcg catagtatg gatacacta ttggattgg 120
 taactgcaga agccagggca gctctacag ctctgtctt atttgggtc taatggggcc 180
 tccggggicc ctgacagggt cagtggcagt ggaicaggca cagattttac actgaacatc 240
 agcagagtgg aggcigagga tgttgggtt tattactgca tgcgaagctc acaaactctc 300
 acttctggcg gaggagacaa ggtggagatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360
 atctcccgcc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgtgtg gtgctgtctg 420
 aataacttct atccagaga ggcctaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
 agcaccctga cgtgagacaa agcagactac gagaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
 acccatcagg gccigagctc gccctgcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 79

<211> 654

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 79

gataatgtaa tgactcagtc tcaactctcc ctgcctcgca cccctggaga gccggcctcc 60

69

atctctctga ggtctagta gagctctctg catagtagt gatatacta ttggatgg 120
 tacttcaga agccaggga gtctccacag ctctgact atttgggtc taatggggc 180
 tccggggcc ctgacaggt cagtggcagt ggtcaggca cagatttac actgaacac 240
 agcagatgg aggcagga tctgggggt tattactga tgaagctct acaactctc 300
 acttcggcg gagggaaca ggaggagat aaactacgg tggctgacc atctgtctc 360
 atctccgc catctgata gcatgaaa tctggaact cctctgtgt gtgctgtct 420
 aataactct atccagaga ggccaagta cagtgaagg tggataacg cctccaatg 480
 ggtaactcc aggagagtgt cacagagcag gacagcagg acagcaccia cagctcagc 540
 agcaccctga cgtgagca agcagactac gagaacaca aagctacgc ctggaagtc 600
 accatcagg gctgagctc gccctgaca aagagctca acagggaga ggt 654

<210> 80

<211> 654

<212> JHK

<213> Homo sapiens

<400> 80

gatattgga tgaactagc tcaactctc ctgcccgca cccctggaga gccggctcc 60
 atctctgta ggtctggta gagctctctg catagtagt gatatacta ttggatgg 120
 tacttcaga agccaggga gtctccacag ctctgact atttgggtc taatggggc 180
 tccggggcc ctgacaggt cagtggcagt ggtcaggca cagatttac actgaaate 240
 agcagatgg aggcagga tctgggggt tattactga tgaagctct acaactatc 300
 acttcggcg aagggaacg actggagat aaactacgg tggctgacc atctgtctc 360
 atctccgc catctgata gcatgaaa tctggaact cctctgtgt gtgctgtct 420
 aataactct atccagaga ggccaagta cagtgaagg tggataacg cctccaatg 480
 ggtaactcc aggagagtgt cacagagcag gacagcagg acagcaccia cagctcagc 540
 agcaccctga cgtgagca agcagactac gagaacaca aagctacgc ctggaagtc 600
 accatcagg gctgagctc gccctgaca aagagctca acagggaga ggt 654

<210> 81

<211> 645

<212> JHK

70

<213> Homo sapiens

<400> 81

gaaattgtga tgacgcagtc tccaggcacc ctgtcttgt ctcaggggga aagagccacc 60
 ctctctgca gggccagica gagtgttagc agcagccact taggtcggta tcagcagaaa 120
 cctggccagg ctccaggct cctcatctat ggtgcacca acaggggcac tggcaccaca 180
 gacaggtica gggcagtggt gctcgggaca gactcactc tcaccatcag caaacaggag 240
 ccgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagtatggt gctcaccgtg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtct catctcccg 360
 ccatctgatg agcagtigaa atctggaact gctctgttg ttgacctgt gaataactc 420
 tatccagag aggcacaaat acagtggag gtggataacg cctccacac gggttaactc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcact acagccctag cagcaccctg 540
 aegctgagca aagcagacta cgagaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
 ggcttgagct cgcctgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 82

<211> 645

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 82

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtcttgt ctcaggggga aagagccacc 60
 ctctctgca gggccagica gagtgttagt agcagccact tagcttggt ttacagagaaa 120
 cctggccaga ctccagggt cctcatctat gctgcacca gcaggggcac cggcatcca 180
 gacaggtica gggcagtggt gctcgggaca gactcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaggatt ttgcagtgt ttactgtcag cagtatggt gctcaccgtg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtct catctcccg 360
 ccatctgatg agcagtigaa atctggaact gctctgttg ttgacctgt gaataactc 420
 tatccagag aggcacaaat acagtggag gtggataacg cctccacac gggttaactc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcact acagccctag cagcaccctg 540
 aegctgagca aagcagacta cgagaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
 ggcttgagct cgcctgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

71

<210> 83
 <211> 645
 <212> JHK
 <213> Homo sapiens

<400> 83
 gaattgtga tgacgcagtc tccaggcacc cgtcttftgt ctccagggga aagagccacc 60
 cctctctga gggccagtc gagtgtagc agcagccact taggtctgta tcagcagaaa 120
 cctggccagg ctccagget cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggiteu gggcagtggt gtcggggaca gacttcactc tcaccatcag caaactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgt taactgtcag captatggta gctcaccgtg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaagctacg gtggtgtcac catctgtcti catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagtigaa aictggaaat gccctgttg tgtccctgct gaataacttc 420
 tatccagag aggcctaaagt acagtggaa gggatuaag cctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcaact acagcctcag cagcaccctg 540
 acgtcagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caeccatcag 600
 ggccctgagct cgcctgtcac aaagagcttc aacaggggag agtct 645

<210> 84
 <211> 220
 <212> Binok
 <213> Homo sapiens

<400> 84

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

Pro Pro Lys 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

65 70 75 80 72
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Asn Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 85
 <211> 214
 <212> Elnok
 <213> Homo sapiens

<400> 85

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45 73

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 86

<211> 218

<212> B1A0K

<213> Homo sapiens

<400> 86

74

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 His Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro 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

Asp Arg Phe Thr 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 Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Ile Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

75

210

215

<210> 87

<211> 219

<212> Билос

<213> Homo sapiens

<400> 87

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

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

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

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

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

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

Ile Gln Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val 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

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

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser 76
 180 185 190 Lys Ala Asp Tyr Glu

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

<210> 88
 <211> 218
 <212> Black
 <213> Homo sapiens

<400> 88

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

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

Pro His 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 Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

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

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

77

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 89

<211> 218

<212> Blank

<213> Homo sapiens

<400> 89

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 His Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro 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

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

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

Leu Gln Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

78

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 90

<211> 218

<212> BL00K

<213> Homo sapiens

<400> 90

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 His Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro 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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile

65 70 75 80 79
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 91
 <211> 218
 <212> Бинаок
 <213> Homo sapiens

<400> 91

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45 80

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 Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Thr Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Gln Lys
 180 185 190

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Gln Cys
 210 215

<210> 92

<211> 215

<212> B120K

<213> Homo sapiens

<400> 92

81

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

82

210

215

<210> 93

<211> 215

<212> Elnor

<213> Homo sapiens

<400> 93

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

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

His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Thr Pro Arg Phe Leu
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr 83
 180 185 190 Glu Lys His Lys Val

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 94
 <211> 215
 <212> BLAST
 <213> Homo sapiens

<400> 94

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

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

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

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

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

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

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

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

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

84

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 95

<211> 114

<212> Black

<213> Homo sapiens

<400> 95

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys 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
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Asn Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

85

Lys Arg

<210> 96

<211> 108

<212> B1000

<213> Homo sapiens

<400> 96

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asp Asn Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 97

<211> 112

<212> B1000

<213> Homo sapiens

<400> 97

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 His Ser

20 25 30

86

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro 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

Asp Arg Phe Thr 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 Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Ile Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 98

<211> 113

<212> Elnor

<213> Homo sapiens

<400> 98

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

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

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

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

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

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

Ile Gln Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110 87
 Arg

 <210> 99
 <211> 112
 <212> B1AOK
 <213> Homo sapiens

 <400> 99
 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

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

 Pro His 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 Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

 Leu Gln Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

 <210> 100
 <211> 112
 <212> B1AOK
 <213> Homo sapiens

 <400> 100
 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 His Ser

20 25 30 88
 Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro 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

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

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

Leu Gln Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 101

<211> 112

<212> B1a0k

<213> Homo sapiens

<400> 101

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 His Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro 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

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

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

Leu Gln Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110 89

<210> 102

<211> 112

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 102

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 Gly Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro 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

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 Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Thr Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 103

<211> 109

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 103

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

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

His Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45 90

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

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

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

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

<210> 104

<211> 109

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 104

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

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

His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Thr Pro Arg Phe Leu
 35 40 45

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

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

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

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

91

<210> 105
 <211> 109
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 105

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

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

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

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

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

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

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

<210> 106
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 106

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

Ala

<210> 107
 <211> 11
 <212> Білок

92

<213> Homo sapiens

<400> 107

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 108

<211> 16

<212> Билор

<213> Homo sapiens

<400> 108

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 109

<211> 16

<212> Билор

<213> Homo sapiens

<400> 109

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 110

<211> 16

<212> Билор

<213> Homo sapiens

<400> 110

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Asn Asn Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 111

<211> 16

<212> Билор

<213> Homo sapiens

<400> 111

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 112

<211> 16

93

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

<400> 112

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 113

<211> 16

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

<400> 113

Arg Ser Gly Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 114

<211> 12

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

<400> 114

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser His Leu Gly

1 5 10

<210> 115

<211> 12

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

<400> 115

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser His Leu Ala

1 5 10

<210> 116

<211> 12

<212> B1a0K

<213> Homo sapiens

<400> 116

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser His Leu Gly

1 5 10

<210> 117

94

<211> 7
 <212> БГАОК
 <213> Homo sapiens

<400> 117

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 118
 <211> 7
 <212> БГАОК
 <213> Homo sapiens

<400> 118

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

<210> 119
 <211> 7
 <212> БГАОК
 <213> Homo sapiens

<400> 119

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 120
 <211> 7
 <212> БГАОК
 <213> Homo sapiens

<400> 120

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 121
 <211> 7
 <212> БГАОК
 <213> Homo sapiens

<400> 121

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

95

<210> 122
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 122

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 123
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 123

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 124
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 124

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 125
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 125

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 126
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 126

Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

96

<210> 127
 <211> 7
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 127

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 128
 <211> 9
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 128

His Gln Tyr Tyr Asn Thr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 129
 <211> 9
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 129

Gln Gln Asp Asp Asn Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 130
 <211> 8
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 130

Met Gln Ala Leu Gln Ile Leu Thr
 1 5

<210> 131
 <211> 9
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 131

Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Leu Thr
 1 5

97

<210> 132
 <211> 8
 <212> БГАОК
 <213> Homo sapiens

<400> 132

Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Thr
 1 5

<210> 133
 <211> 8
 <212> БГАОК
 <213> Homo sapiens

<400> 133

Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Thr
 1 5

<210> 134
 <211> 8
 <212> БГАОК
 <213> Homo sapiens

<400> 134

Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Thr
 1 5

<210> 135
 <211> 8
 <212> БГАОК
 <213> Homo sapiens

<400> 135

Met Gln Ala Leu Gln Thr Ile Thr
 1 5

<210> 136
 <211> 9
 <212> БГАОК
 <213> Homo sapiens

<400> 136

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

98

1 5

<210> 137
 <211> 9
 <212> Elnok
 <213> Homo sapiens

<400> 137

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 138
 <211> 9
 <212> Elnok
 <213> Homo sapiens

<400> 138

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 139
 <211> 1335
 <212> JHK
 <213> Homo sapiens

<400> 139

cagggtcagc tgggtgagtc tgggggaggc gtgtgccagc cggggaggtc cctgagactc 60

tcctgtacag cgtctggalt caccctcagt agccatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggtctggagt ggtgacaalt atatggittg atggaataa taaatactat 180

gcagactccg tggaggggccg ctaccaccat tccagagaca atccaagaa cacgtgttt 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac accgcigtct attactgtgc gagagagggg 300

gcggaaacagg gggtcaicga tctctggggc cgtggcacc cgttcaetgt ctcctcagct 360

agcaccacagg gcccatcggt ctcccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 420

acagcggccc tgggtgect ggtcaaggac taccctcccg aaccggggac ggtgtcgttg 480

aaetraggcg ctctgaccag cggcgfgcac aacttccag ctgtcttaca gtctcagga 540

ctctactccc tcagcaggt ggtgaccgtg cctccagca acttcggcac ccagacctac 600

acctgcaacg tagatcaaa gcccgcaac accaaggtg acaagacgt tgagcgcaaa 660

tgtgtgtcg agtgcacac gtgcccagca ccactgtgg caggaccgic agtctctc 720

99

tccccccaa aacccaagga caccctcag atctcccga cccctgaggt cactgctgtg 780
 ggggtgacg tgagccacga agaccocgag gtccagttca actggtactt ggacggcggtg 840
 gagggtcata atcccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gtccgtgtg 900
 gtcagctcc tcaccgtgtt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcag 960
 gttccaaaca aaggctctcc agcccccac gagaaaaaca tctccaaac caaagggcag 1020
 ccccgagaa caccaggtga caccctgcc cctcccggg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagctga cctgctgtgt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtggag 1140
 agcaatggcg agccgggaa caactacaag accacactc ccatgttga ctcgacggc 1200
 tcttcttc ictacagca gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaagtc 1260
 ttctatgt cctgtatga tgaggctct cacaaccact acnccagaa gaggctctc 1320
 ctgtctcgg gtaaa 1335

<210> 140

<211> 1347

<212> JHK

<213> Homo sapiens

<400> 140

gagggtcagc tgggtgagtc tgggggagc ttgtacaac ctgggggtc cctgagactc 60
 tctgtgtag cctgtggtt caccctcagt aacttgaca tgcctgggt cggccaagct 120
 acaggaaaag gtcgtgagtg ggtctcaagt attgatactg aaggagacac atactattca 180
 ggctccgtga agggcggatt caccatctcc agagaaaatg ccaggaaactc ctgtatctt 240
 caaatgaaca gctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtacaag aggcgaggac 300
 tggagcgacg acgactacta ctacgggttg gacgtctggg gccaaaggac caaggtaacc 360
 gtctctctag ctagcaacca gggcctatcg gcttccccc tggcgccctg ctccaggagc 420
 acctcgaga gcacagcggc cctgggtgc ctggtcagg actacttccc cgaaccgtgt 480
 accgtgtctt ggaactcagg cgtctgacc agcgcgctgc acacttccc agctgtcta 540
 cagtcctcag gactctact cctcagcagc ggggtgacc tggcctccag caacttggc 600
 acccagaact acactgcaa cgtatgac aagccagca acaccaaggt ggacaagaca 660
 gttagcgca aatgttgtt cagtgccca cctgcccag caccacctgt ggcaggaccg 720

100
 teagtttcc tcttccccc aaaaaccaag gacacctca tgaictccc gacctctgag 780
 gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagti caactggac 840
 gtggacggcg tggaggigca taatgccaa acaagccac gggaggagca gttaacagc 900
 acgtttcgtg tggtcagcgt cctcaccgti gtgcaccagg actggctgaa cggeaaggag 960
 tacaagtcca aggtctccaa caaaggctc ccagccccc tcagaaaaa catctccaaa 1020
 accaaaggcg agccccaga accacaggtg tacacctgc cccatcccg ggaggagatg 1080
 accaagaacc aggtcagcti gacctgcctg gtcaaaagct tctacccag cgacatgcgc 1140
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacac tccatgctg 1200
 gactccgacg gctctctt cctctacagc aagctcacc tggacaagag cagggtggcg 1260
 caggggaaac tctctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaaca ctacacgag 1320
 aagagctct cctgtctcc ggglaaa 1347

<210> 141

<211> 1347

<212> JHK

<213> Homo sapiens

<400> 141

gaggtgcaac tggggagtc tggggagggc ttggtaacgc ctgggggtc cctgagactc 60
 tctgtgcag cctctggti cacttcagt accttcgaca tgcactgggi ccgccaagt 120
 ccaggaaaag gtctggagt gactcaagi atgatactg aaggagacac atactatca 180
 ggtccgtga agggccgatt cacaatctc agagaaaatg ccaggaaac ctgtatctt 240
 caaatgaaca gcttgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtacaag aggcgaggac 300
 tggagcgacg acgactacta ctacgggtt gacgtctggg gccaaaggac caggttcaac 360
 gtctctcag ctatcaccaa gggcccatcg gtctccccc tggcgccctg ctccaggagc 420
 acctccgaga gcacagcggc cctgggtgc ctggtcaagg actactccc cgaaccggtg 480
 acggtgtctg ggaactcagg cgtctgacc agcggcggtc acacttccc agctgtcta 540
 cagttctcag gactctact cctcagcagc gtgtgaccc tgcctccag caactcggc 600
 accagaccti acactgcac cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacagaca 660
 gttagcgca aatgttgtgt ctagtgccca ccgtgccag caacacctgt ggcaggaccg 720
 teagtttcc tcttccccc aaaaaccaag gacacctca tgaictccc gacctctgag 780

101

gtacagtgcg tggtagtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtag 840
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaagccac gggaggagca gtcaacagc 900
 acgtccgtg tggtagcgt cctcaccgt gtgcaccagg actggtgaa cggcaaggag 960
 tacaagtgcu aggtctccaa caaagccct ccagcccca tggagaaac cactccaaa 1020
 accaaaggcg agcccgaga accacaggcg tacacctgc cccatcccg ggaggagatg 1080
 accaagaacc aggtcagct gacctgcctg gtcaaggtt tctacccag cgaatcgcc 1140
 gtggagtggg agagcaalgg gcagccggag aacactaca agaccacac tccatgctg 1200
 gactccagc gctctctt cctctacag aagctcacc tggacaagag caggtggcag 1260
 cagggaacg tctctcatg ctccgtgat catgagctc tgcacacca ctacacgag 1320
 aagagctct cctgctcc gggtaaa 1347

<210> 142
 <211> 445
 <212> Бляк
 <213> Homo sapiens

<400> 142

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30

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

Thr Ile Ile Trp Phe Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Glu 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 Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ala Glu Gln Gly Phe Ile Asp Leu Trp Gly Arg Gly

100 105 110 102
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

103

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

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 143

<211> 449

<212> Biont

<213> Homo sapiens

<400> 143

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 Thr Phe
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Asp Thr Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Gly Ser Val Lys
 50 55 60

104

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

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

Arg Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
 210 215 220

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285 105

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg 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

Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln 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 Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 144

<211> 449

<212> Binok

<213> Homo sapiens

<400> 144

106

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 Thr Phe
20 25 30

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

Ser Ser Ile Asp Thr Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys

210 215 220 107
 Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Glu 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 Phe Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Gln 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
 Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

108

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 145
 <211> 119
 <212> Бичик
 <213> Homo sapiens

<400> 145

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30

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

Thr Ile Ile Trp Phe Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Glu 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 Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ala Glu Glu Gly Phe Ile Asp Leu Trp Gly Arg Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 146
 <211> 123
 <212> Бичик
 <213> Homo sapiens

<400> 146

109

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 Thr Phe
20 25 30

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

Ser Ser Ile Asp Thr Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Gly Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
100 105 110

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

<210> 147

<211> 123

<212> Bimok

<213> Homo sapiens

<400> 147

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 Thr Phe
20 25 30

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

Ser Ser Ile Asp Thr Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

110

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

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

Arg Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 100 105 110

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

<210> 148
 <211> 5
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 148

Ser His Gly Met His
 1 5

<210> 149
 <211> 5
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 149

Thr Phe Asp Met His
 1 5

<210> 150
 <211> 5
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 150

Thr Phe Asp Met His
 1 5

<210> 151
 <211> 17
 <212> B1a0K

111

<213> Homo sapiens

<400> 151

Ile Ile Trp Phe Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 152

<211> 16

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 152

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

<210> 153

<211> 16

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 153

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

<210> 154

<211> 10

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 154

Glu Gly Ala Glu Gln Gly Phe Ile Asp Leu
 1 5 10

<210> 155

<211> 15

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 155

Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15

112

<210> 156
 <211> 15
 <212> БЛЮК
 <213> Homo sapiens

<400> 156

Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15

<210> 157
 <211> 642
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 157

gacatccaga tgaccacagc tccatctccc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc aggcgagica ggacattagc aactatttaa atgggtatca ccagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctacgat gcatccaatt tggaaacagg ggteccatca 180
 aggttcagtg gaagtggtatc tggacacat ttactttca ccatcagcgg cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaacag catgataatc tcccgctcac ttccggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa gcgaacgggtg gctgcaccat ctgtcttcat ctcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaatgcc tctgttgtgt gctgtctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaagttaca gtggaagggtg gataacgccc tccatcgggg taactcccag 480
 gagagtgica cagagcagga cagcaaggac agcaactaca gctcagcag caaccagacg 540
 ctgagcaaaag cagacttcca gaaacacaaa gtctacgctt gegaagtca ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcac aggggagagt gt 642

<210> 158
 <211> 654
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 158

aataatgtga tgaccacagc tccatctctc ctgtccgten cccctggaca gccggctccc 60
 atctctgca agtctagtca gaggctcctg catagtgaag gaagacctt ttattttgg 120
 taactgcaga agccaggcca gctccacag ctctgactct atggagtttc caaccggttc 180

113

tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggcagga cagattcac actgaaaate 240
 agccgggtgg aggetgaaga tctgggggt tactactgca tgcagaatt acagctatc 300
 acttctggcc ctgggaccaa agtgagatc aagcgacgg tggctgcacc atctgtctc 360
 atctccgc cactgata gcatgaaa tctggaactg cctctgtgt gtgctgctg 420
 aataactct atccagaga ggcacaagta cagtgggaag tggataacgc cctccaatc 480
 gctaactcc aggagaggtg cacagagcag gacagcaagg acagcacta cagctcagc 540
 agcacctga cgtgagcaa agcagactac gagaaacaa aagctacgc ctgcgaagtc 600
 acccafcagg gctgagctc gctgcacaa aagagctca acaggggaga gtgt 654

<210> 159

<211> 657

<212> JHK

<213> Homo sapiens

<400> 159

aataatgta tgaccagac tccactct ctgtccgta cccctggaca gccgctcc 60
 atctctgca agctagta gagctctg catagtgatg gaaagacta ttatttgg 120
 taccgcaga agccaggcca gctccacag cctctgatc atggagtgc caaccgttc 180
 tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggcagga cagattcac actgaaaate 240
 agccgggtgg aggetgaaga tctgggggt tactctgca tgcagaatt acagctatc 300
 acttctggcc ctgggaccaa agtgagatc aaacgagta cgttgctgc accatctgc 360
 tcaactcc cgcactga tgagcagtg aaatctgaa ctgctctgt tctgtgctg 420
 ctgaatanct tctatccag agagcccaa gtcagtgga aggtggataa cgcctccaa 480
 tgggtaact cccaggagag tctcacagag caggacagca aggacagac ctacagctc 540
 agcagaccu tgacgtgag caagcagac tacgagaaac acuaagtcta cgcctcgaa 600
 gtcaccate agggcctgag ctgcctctc acaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 160

<211> 214

<212> BLOW

<213> Homo sapiens

<400> 160

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

1 5 10 15 114
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Asn Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

115

<210> 161
 <211> 218
 <212> Билор
 <213> Homo sapiens

<400> 161

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

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

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

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

Asp Arg Phe 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 Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
 85 90 95

Leu Gln Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

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

116

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 162

<211> 219

<212> Binok

<213> Homo sapiens

<400> 162

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

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

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

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

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

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

Leu Gln Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
 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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160 117
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

<210> 163

<211> 108

<212> B1A0K

<213> Homo sapiens

<400> 163

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Asn Leu Pro Leu
 85 90 95

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

118

<210> 164
 <211> 108
 <212> Elnok
 <213> Homo sapiens

<400> 164

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Asn Leu Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 165
 <211> 113
 <212> Elnok
 <213> Homo sapiens

<400> 165

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

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

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60 119

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

Ser Arg Val Gln Ala Gln Asp Val Gly Val Tyr Ser Cys Met Gln Ser
 85 90 95

Leu Gln Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
 100 105 110

Arg

<210> 166
 <211> 11
 <212> БЗСК
 <213> Homo sapiens

<400> 166

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

<210> 167
 <211> 16
 <212> БЗСК
 <213> Homo sapiens

<400> 167

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Phe
 1 5 10 15

<210> 168
 <211> 16
 <212> БЗСК
 <213> Homo sapiens

<400> 168

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Phe
 1 5 10 15

<210> 169

120

<211> 7
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 169

Asp Ala Ser Asn Leu Gln Thr
 1 5

<210> 170
 <211> 7
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 170

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 171
 <211> 7
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 171

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 172
 <211> 9
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 172

Gln Gln His Asp Asn Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 173
 <211> 8
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 173

Met Gln Ser Leu Gln Leu Phe Thr
 1 5

121

<210> 174
 <211> 8
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 174

Met Gln Ser Leu Gln Leu Phe Thr
 1 5

<210> 175
 <211> 187
 <212> B1a0K
 <213> Homo sapiens

<400> 175

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

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

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

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

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

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

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

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

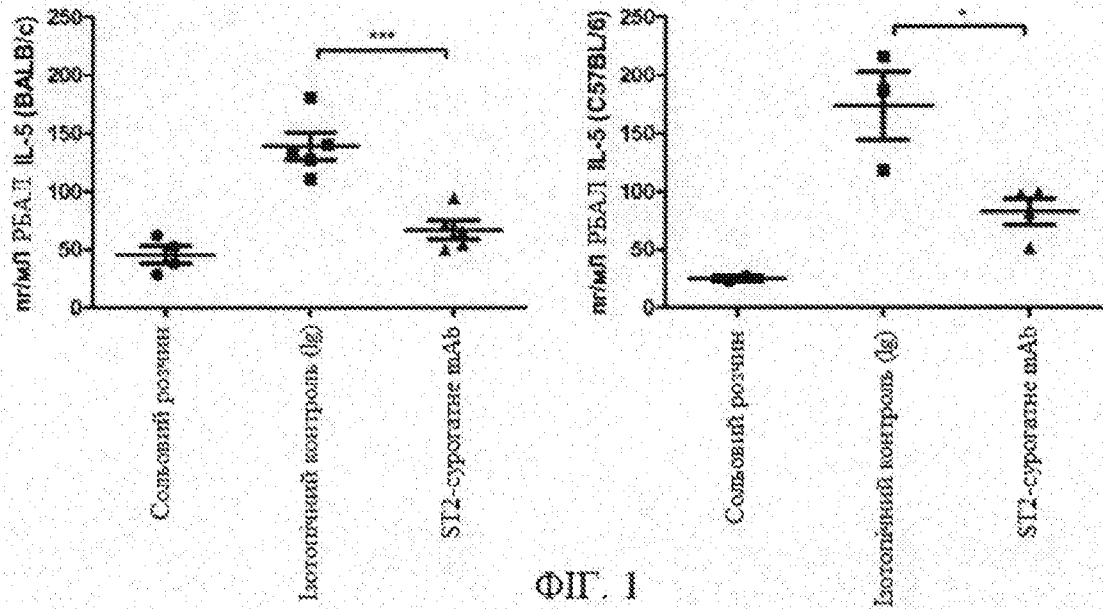
Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala His
 130 135 140

122

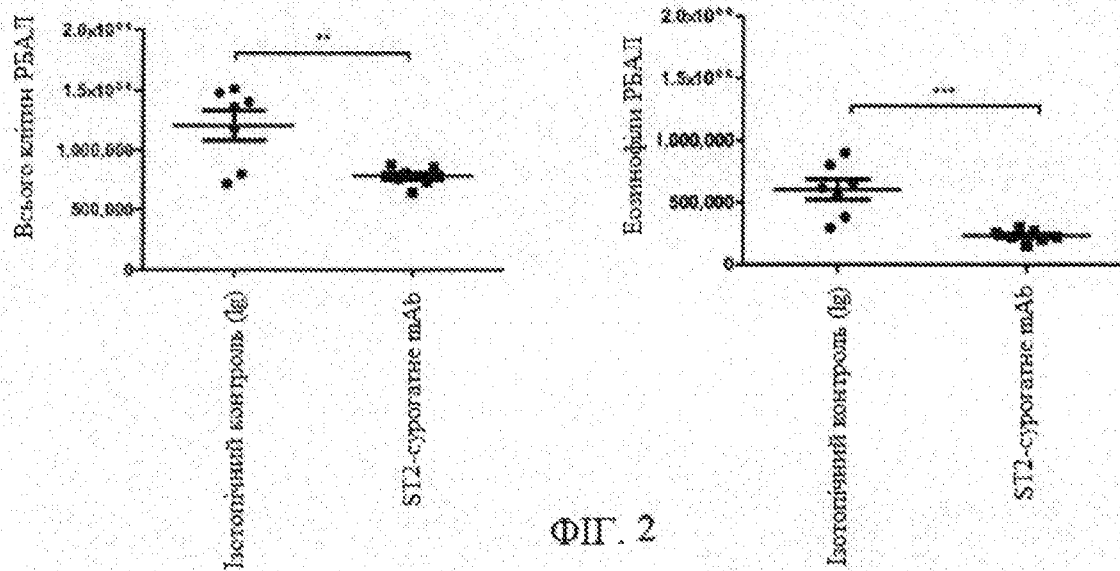
Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala Gly Asp
 145 150 155 160

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

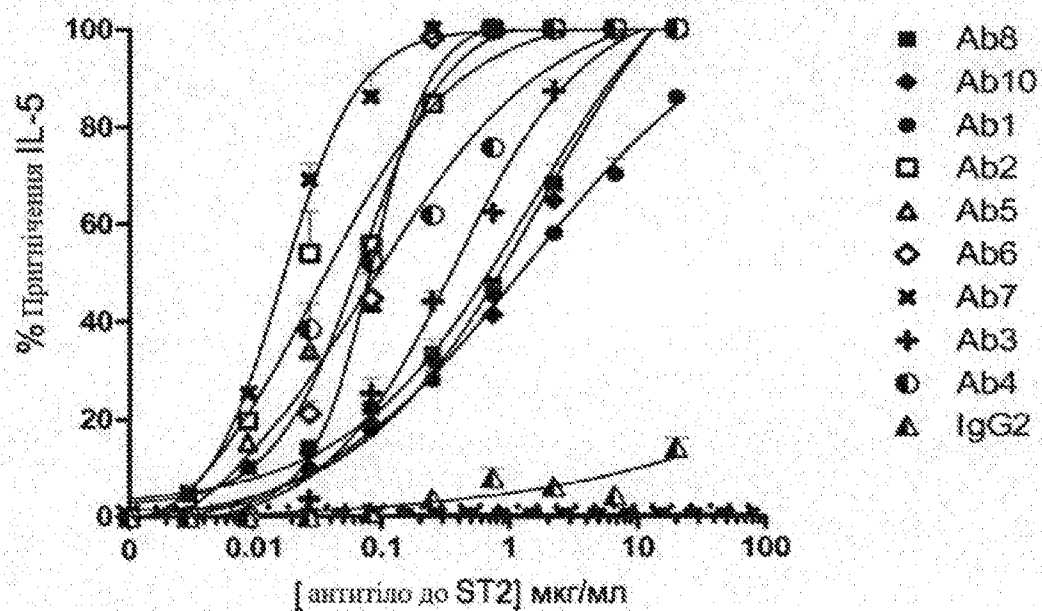
Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu
 180 185



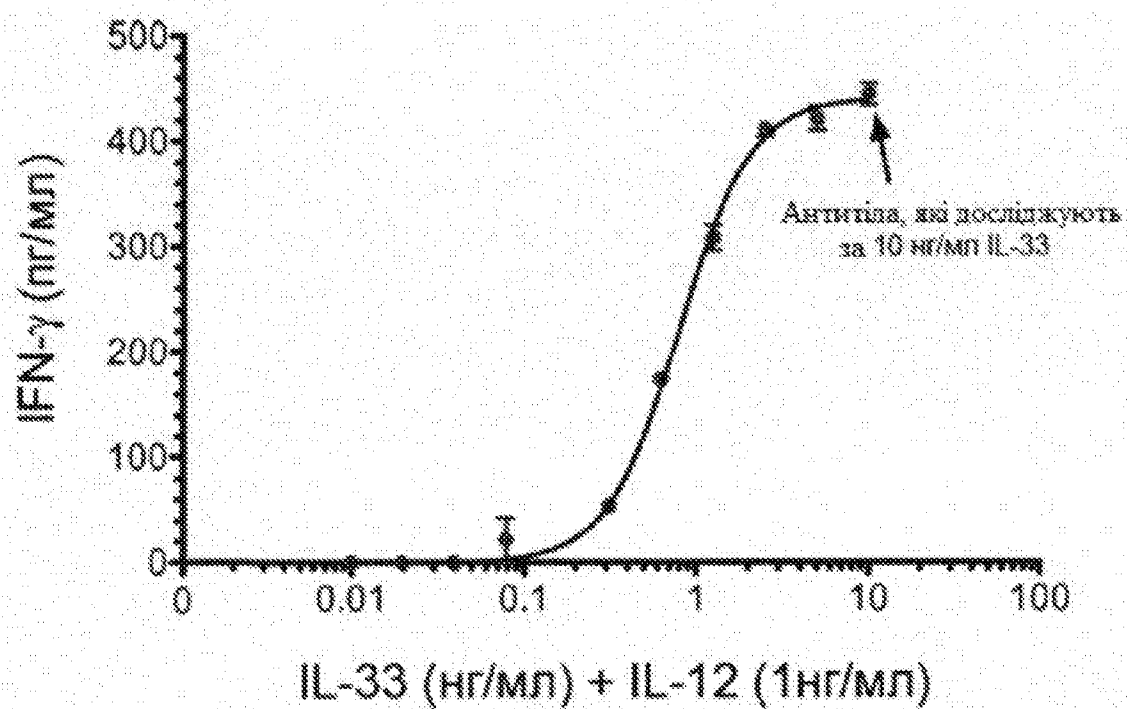
ФІГ. 1



ФІГ. 2

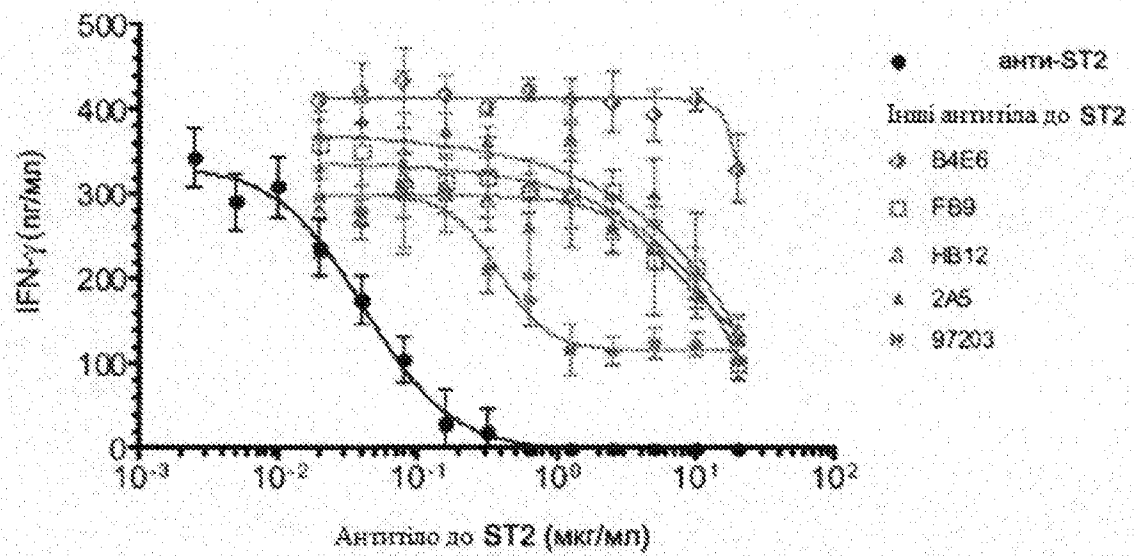


ФІГ. 3

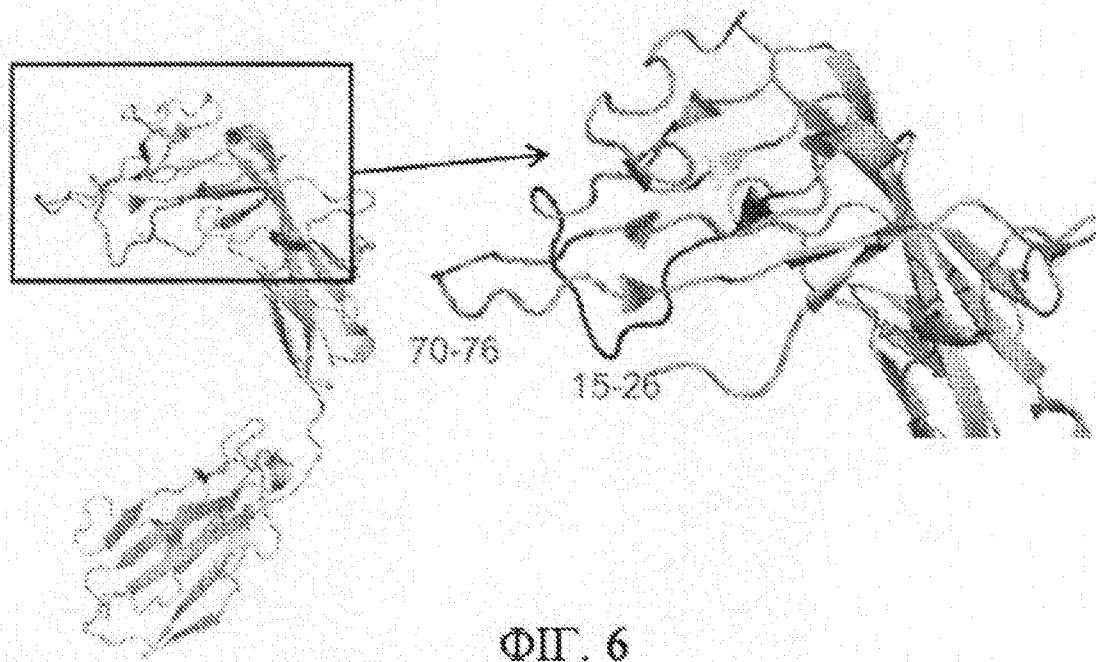


	IL-33 (нг/мл)
EC50	0,7950

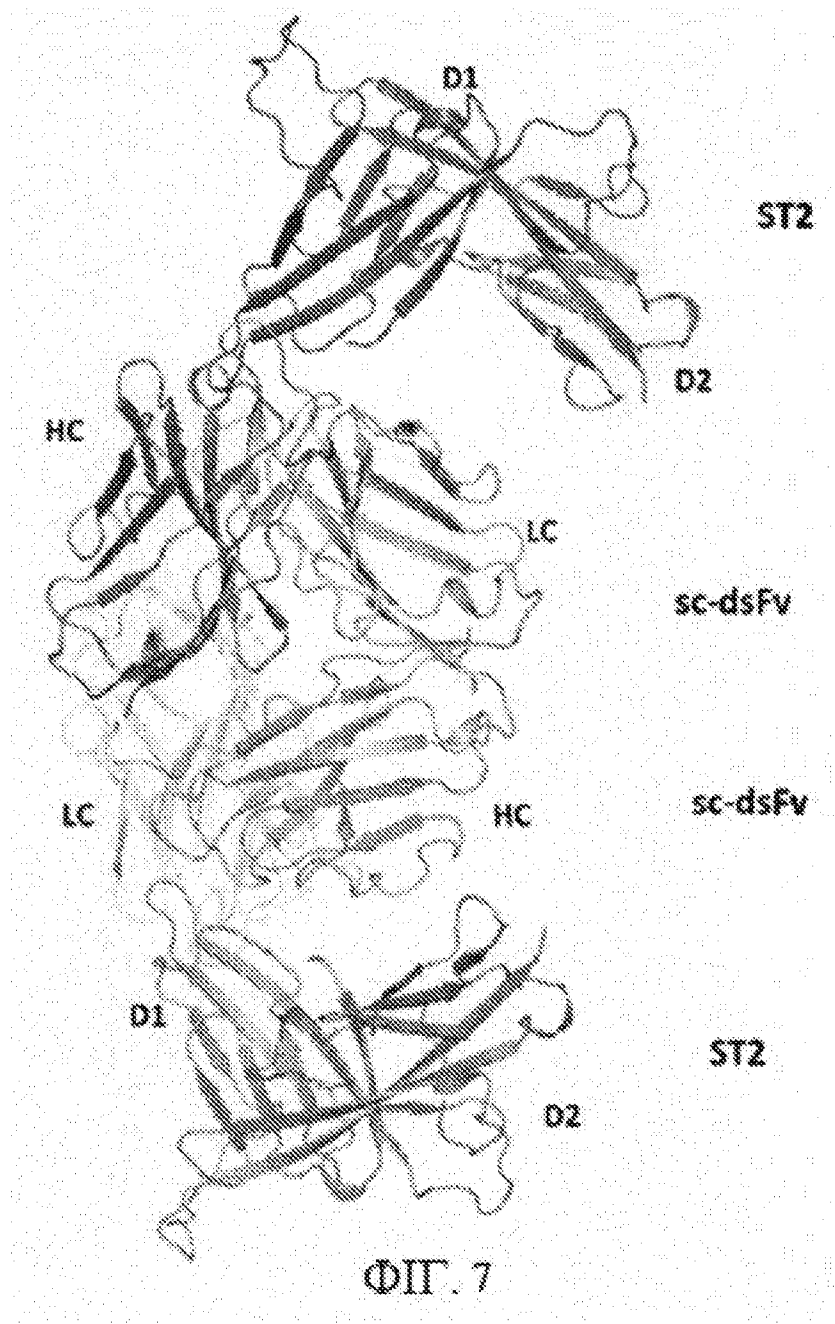
ФІГ. 4

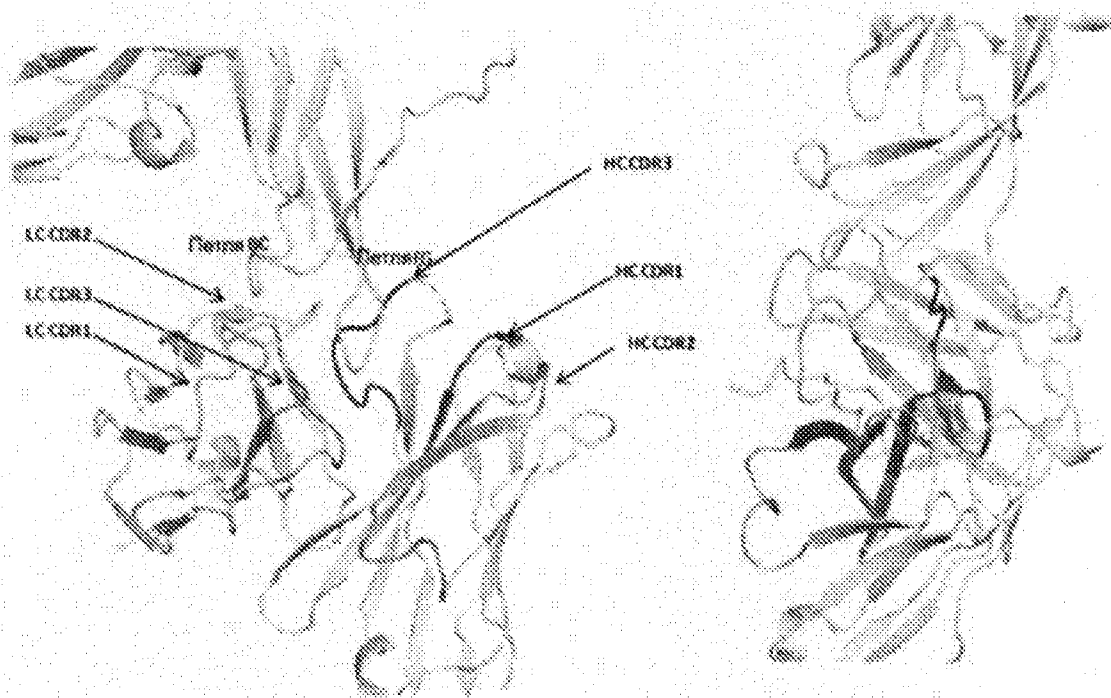


ФІГ. 5

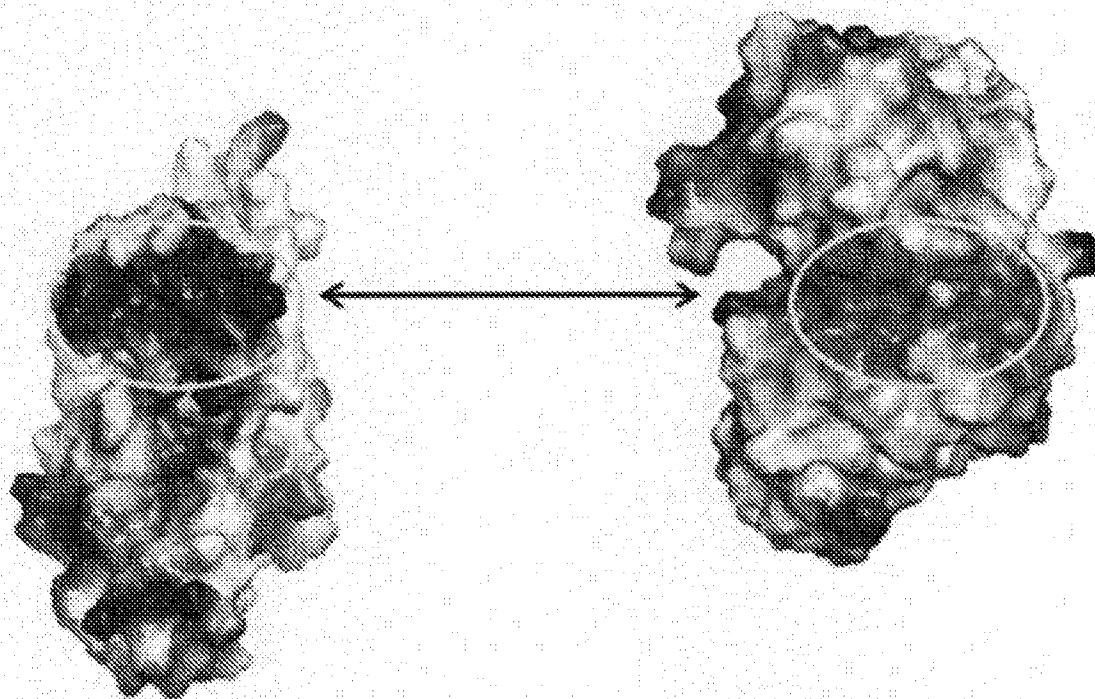


ФІГ. 6





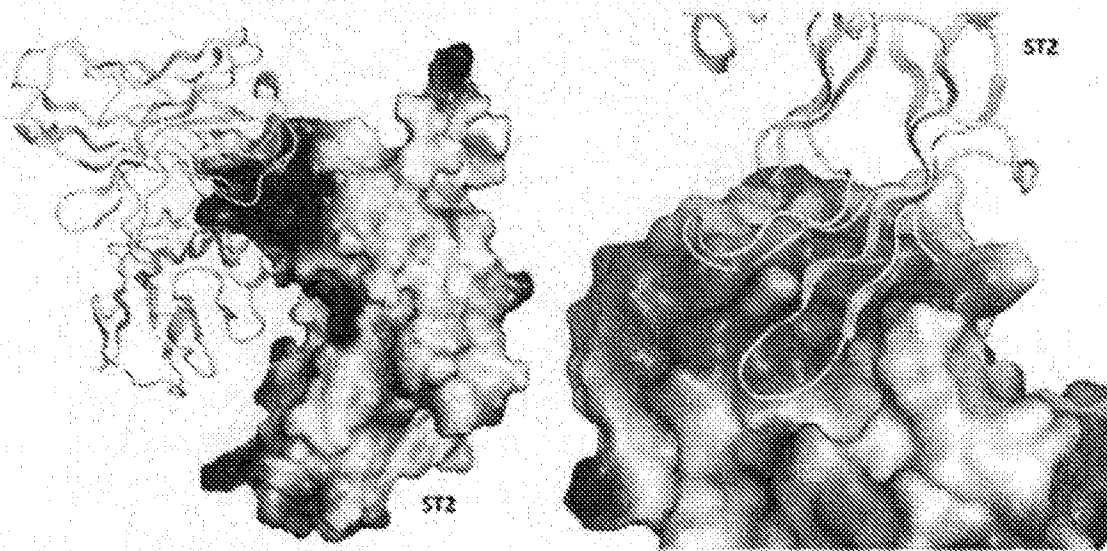
ΦΠ. 8



ST2

ΦΠ. 9A

Ab2



Фиг. 9В

Вариабельна ділянка HC Ab2 (SEQ ID NO:30)

EVQLVQSGAE VKKPGSELKI SCGGGVTEPT NYMIG NVRQH PGRGLENNKI IYPGNSETRF SPSPQGVTI SAGRSITTAY
LQNSLKAQD TMTYCASSIG YSEDYSHLEQ WEGQTTVTYS S

Вариабельна ділянка LC Ab2 (SEQ ID NO:96)

DICMTQSPSS LSASVGGDYIT IASQDIS NYLNYQCKP GKAFELLIM ASNLER VYPS RFSGSGSGTD FTFTIGSLQP
EDIATYYC QDHPFL POG QTKVEIKR

Фиг. 10