



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **121293**

(13) **C2**

(51) МПК

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2019 03400**
(22) Дата подання заявки: **24.10.2017**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **27.04.2020**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **62/414,258**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **28.10.2016**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.07.2019, Бюл.№ 13**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.04.2020, Бюл.№ 8**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/US2017/058020, 24.10.2017**

(72) Винахідник(и):
**Бенсон Роберт Ян (US),
Дейвіс Джуліан (US),
Окразлі Анджела Джаннін (US),
Патель Четанкумар Натварлал (US),
Трулар Стефані Марі (US)**
(73) Власник(и):
**ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ,
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana
46285, United States of America (US)**
(74) Представник:
**Шляховецький Ілля Олександрович,
реєстр. №190**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2015106080 A2, 16.07.2015
WO 2016077381 A1, 19.05.2016
US 2014271658 A1, 18.09.2014
LIU X. et al. Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. Biochemical and biophysical research communications, Elsevier, Amsterdam, NL, 2009, Vol. 386, no. 1, P. 181 – 185
KIM Y.H. et al. Anti-IL-33 antibody has a therapeutic effect in a murine model of allergic rhinitis. Allergy, Wiley-Blackwell publishing LTD, United Kingdom, 2012, Vol. 67, no. 2, P. 183 – 190
TAKESHI NABE. Interleukin (IL)-33: New Therapeutic Target for Atopic Diseases. Journal of pharmacological sciences, JP, 2014, Vol. 126, no. 2, P. 85 – 91

(54) АНТИТІЛО ПРОТИ IL-33 ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіла, яке зв'язує і нейтралізує людський IL-33, молекули ДНК, клітини ссавця, способу одержання такого антитіла та способу його застосування у приготуванні лікарського засобу та лікування станів, пов'язаних з алергічним захворюванням, в тому числі для лікування atopічного дерматиту та хвороби Крона.

UA 121293 C2

Цей винахід належить до медицини. Більш конкретно, цей винахід стосується антитіл, спрямованих проти інтерлейкіну-33 (IL-33), та фармацевтичних композицій, до складу яких вони входять. Очікується, що антитіла за цим винаходом будуть придатні для лікування atopічного дерматиту.

Атопічний дерматит (відомий також як atopічна екзема) являє собою хронічне запальне алергічне захворювання шкіри, яке характеризується рецидивними червоними сверблячими ураженнями. У пацієнтів з atopічним дерматитом спостерігаються два основні патофізіологічні відхилення: шкірне запалення внаслідок неналежних імунних реакцій в шкірі і змінені епідермальні структура і функція. Запальний інфільтрат складається з суміші клітин, зокрема імунних клітин, що експресують IL-4, IL-5 та IL-13. Рівні цих цитокінів часто є підвищеними й при інших алергічних захворюваннях, в тому числі при астмі і алергічному риніті.

Атопічний дерматит був описаний як найпоширеніше нефатальне обтяження стану здоров'я, характерне для захворювань шкіри. Незважаючи на те, що це захворювання найчастіше починається в дитинстві і уражає двох з десяти дітей, воно також є дуже поширеним у дорослих. Більшість дорослих, які страждають на хронічний atopічний дерматит, мають практично пожиттєве захворювання. Свербіж, позбавлення сну і соціальні ускладнення через видимі пошкодження чинять істотний вплив на психосоціальне здоров'я пацієнтів та їхніх родичів. У дітей вплив atopічного дерматиту на якість життя, пов'язану зі здоров'ям, є подібним до інших тяжких дитячих хвороб, таких як астма та діабет. Більшість людей, які мають atopічний дерматит, мають особисту або сімейну історію алергій.

До цього часу atopічний дерматит є невиліковним, і метою надання медичної допомоги при цьому захворюванні є контроль або полегшення симптомів і досягнення довгострокового контролю захворювання із застосуванням багатоступеневого методу. Головними складовими є безперервне відновлення епідермального бар'єру за допомогою пом'якшувальних засобів для шкіри, уникнення індивідуальних подразнювальних факторів і протизапальна терапія топічними кортикостероїдами або інгібіторами кальциневрину. У випадках тяжких уражень показана фототерапія або застосування системних імунодепресантів. Отже, існує потреба у додаткових ефективних методах лікування пацієнтів з atopічним дерматитом.

IL-33 є членом надродини цитокінів IL-1 і експресується головним чином кератиноцитами, епітеліальними клітинами і ендотеліальними клітинами. IL-33 активує вроджені і набуті імунні клітини декількох типів, що спричинює продукування інших прозапальних медіаторів, і він найбільш часто характеризується як епітеліальний цитокін, який сприяє імунним відповідям 2 типу або імунним відповідям Т-хелперів 2 типу (Th2). Еснує ряд антитіл, відомих в цій галузі, які зв'язуються з IL-33 і нейтралізують його. Наприклад, в публікації Сполучених Штатів а 20160168242A1 і міжнародній публікації а WO2015/106080A2 розкриті деякі антитіла, які зв'язують людський IL-33. Однак існує потреба в альтернативних антитілах, які зв'язують людський IL-33 з високою афінністю, і які є терапевтично ефективними при лікуванні алергічних захворювань, таких як atopічний дерматит. Покращена афінність та краща IC₅₀ можуть забезпечити переваги при дозуванні.

Цей винахід призначений для задоволення потреби у альтернативній терапії антитілами для пацієнтів, які мають алергічні захворювання, такі як atopічний дерматит, харчова алергія, алергічний риніт і астма. В деяких варіантах здійснення цього винаходу алергічне захворювання являє собою atopічний дерматит. Цей винахід також призначений для задоволення потреби у альтернативній терапії антитілами для пацієнтів, які мають постійні запальні захворювання, в тому числі еозинофільний езофагіт, склеродермію/системний склероз, виразковий коліт і хронічне обструктивне захворювання легенів. Цей винахід також призначений для задоволення потреби у альтернативній терапії антитілами для пацієнтів, які мають хворобу Крона.

Цим винаходом запропоновані антитіла, які зв'язують людський IL-33. В деяких варіантах здійснення цього винаходу згадане антитіло містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR) і варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), де LCVR містить гіперваріабельні ділянки (CDR) LCDR1, LCDR2 і LCDR3, і HCVR містить CDR HCDR1, HCDR2 і HCDR3, і де амінокислотна послідовність LCDR1 являє собою SEQ ID NO: 16, амінокислотна послідовність LCDR2 являє собою SEQ ID NO: 17, амінокислотна послідовність LCDR3 являє собою SEQ ID NO: 18, амінокислотна послідовність HCDR1 являє собою SEQ ID NO: 13, амінокислотна послідовність HCDR2 являє собою SEQ ID NO: 14, й амінокислотна послідовність HCDR3 являє собою SEQ ID NO: 15. В деяких з таких варіантів здійснення цього винаходу Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 13 являє собою Ser, Хаа в положенні 2 послідовності SEQ ID NO: 15 являє собою Leu, Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 17 являє собою Ala, і Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 18 являє собою Ser. В іншому з таких варіантів здійснення цього винаходу Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 13 являє собою Phe,

Хаа в положенні 2 послідовності SEQ ID NO: 15 являє собою Leu, Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 17 являє собою Leu, й Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 18 являє собою Pro. В іншому з таких варіантів здійснення цього винаходу Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 13 являє собою Phe, Хаа в положенні 2 послідовності SEQ ID NO: 15 являє собою Ile, Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 17 являє собою Leu, й Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 18 являє собою Pro.

Цим винаходом також запропоноване антитіло, яке зв'язує людський IL-33, де згадане антитіло містить LCVR і HCVR, і де амінокислотна послідовність LCVR являє собою SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 або SEQ ID NO: 12, і амінокислотна послідовність HCVR являє собою SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 або SEQ ID NO: 11. В одному з конкретних варіантів здійснення цього винаходу амінокислотна послідовність LCVR являє собою SEQ ID NO: 4, а амінокислотна послідовність HCVR являє собою SEQ ID NO: 3. В іншому конкретному варіанті здійснення цього винаходу амінокислотна послідовність LCVR являє собою SEQ ID NO: 8, а амінокислотна послідовність HCVR являє собою SEQ ID NO: 7. В іншому конкретному варіанті здійснення цього винаходу амінокислотна послідовність LCVR являє собою SEQ ID NO: 12, а амінокислотна послідовність HCVR являє собою SEQ ID NO: 11.

Цим винаходом також запропоноване антитіло, яке зв'язує людський IL-33, де згадане антитіло містить легкий ланцюг (LC) і важкий ланцюг (HC), і де амінокислотна послідовність LC являє собою SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, або SEQ ID NO: 10, й амінокислотна послідовність HC являє собою SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, або SEQ ID NO: 9. В одному з конкретних варіантів здійснення цього винаходу амінокислотна послідовність LC являє собою SEQ ID NO: 2, і амінокислотна послідовність HC являє собою SEQ ID NO: 1. В іншому конкретному варіанті здійснення цього винаходу амінокислотна послідовність LC являє собою SEQ ID NO: 6, і амінокислотна послідовність HC являє собою SEQ ID NO: 5. В іншому конкретному варіанті здійснення цього винаходу амінокислотна послідовність LC являє собою SEQ ID NO: 10, і амінокислотна послідовність HC являє собою SEQ ID NO: 9.

Цим винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язує людський IL-33, де згадане антитіло містить 2 LC і 2 HC, і де амінокислотна послідовність кожного LC являє собою SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 10, і амінокислотна послідовність кожного HC являє собою SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO: 9. В одному з конкретних варіантів здійснення цього винаходу амінокислотна послідовність кожного LC являє собою SEQ ID NO: 2, і амінокислотна послідовність кожного HC являє собою SEQ ID NO: 1. В одному з конкретних варіантів здійснення цього винаходу амінокислотна послідовність кожного LC являє собою SEQ ID NO: 6, і амінокислотна послідовність кожного HC являє собою SEQ ID NO: 5. В іншому конкретному варіанті здійснення цього винаходу амінокислотна послідовність кожного LC являє собою SEQ ID NO: 10, і амінокислотна послідовність кожного HC являє собою SEQ ID NO: 9.

Цим винаходом також запропонована фармацевтична композиція, що містить антитіло за цим винаходом і один або більше фармацевтично прийнятний(-их) носій(-ів), розріджувач(-ів) або наповнювач(-ів). В деяких варіантах здійснення цього винаходу фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть бути використані при лікуванні алергічного захворювання, причому таке лікування включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості фармацевтичної композиції за цим винаходом. В деяких конкретних варіантах здійснення цього винаходу згадане алергічне захворювання являє собою atopічний дерматит, астму, алергічний риніт або харчову алергію. В деяких варіантах здійснення цього винаходу фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть бути використані при лікуванні еозинофільного езофагіту, склеродермії/системного склерозу, виразкового коліту або хронічного обструктивного захворювання легенів. В деяких варіантах здійснення цього винаходу фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть бути використані при лікуванні хвороби Крона.

Цим винаходом також запропонований спосіб лікування алергічного захворювання, що включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості антитіла за цим винаходом. В деяких з таких варіантів здійснення цього винаходу згадане алергічне захворювання являє собою atopічний дерматит. У іншому з таких варіантів здійснення цього винаходу згадане алергічне захворювання являє собою астму. У іншому з таких варіантів здійснення цього винаходу згадане алергічне захворювання являє собою харчову алергію. У іншому з таких варіантів здійснення цього винаходу згадане алергічне захворювання являє собою алергічний риніт. Цим винаходом також запропонований спосіб лікування atopічного дерматиту, що включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості антитіла за цим винаходом. В деяких варіантах здійснення цим винаходом також запропонований спосіб лікування щонайменше одного захворювання з-посеред еозинофільного езофагіту, склеродермії/системного склерозу, виразкового коліту і хронічного обструктивного

захворювання легенів, що включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості антитіла за цим винаходом. В деяких з варіантів здійснення цим винаходом також запропонований спосіб лікування хвороби Крона.

Цим винаходом також запропоновані антитіло за цим винаходом або фармацевтична композиція, до складу якої воно входить, для застосування в терапії. В деяких варіантах здійснення цим винаходом запропоновані антитіло за цим винаходом або фармацевтична композиція, до складу якої воно входить, для застосування при лікуванні алергічного захворювання, де згадане алергічне захворювання являє собою atopічний дерматит, астму, алергічний риніт або харчову алергію. В конкретному варіанті здійснення цим винаходом запропоновані антитіло за цим винаходом або фармацевтична композиція, до складу якої воно входить, для застосування при лікуванні atopічного дерматиту. В деяких варіантах здійснення цим винаходом запропоновані антитіло за цим винаходом або фармацевтична композиція, до складу якої воно входить, для застосування при лікуванні еозинофільного езофагіту, склеродермії/системного склерозу, виразкового коліту або хронічного обструктивного захворювання легенів. В деяких варіантах здійснення цим винаходом запропоновані антитіло за цим винаходом або фармацевтична композиція, до складу якої воно входить, для застосування при лікуванні хвороби Крона.

В одному з варіантів здійснення цим винаходом також запропоноване використання антитіла за цим винаходом або фармацевтичної композиції, до складу якої воно входить, для виготовлення лікарського засобу для лікування алергічного захворювання. В деяких варіантах здійснення цим винаходом запропоноване використання антитіла за цим винаходом або фармацевтичної композиції, до складу якої воно входить, для виготовлення лікарського засобу для лікування алергічного захворювання, де згадане алергічне захворювання являє собою atopічний дерматит, астму, алергічний риніт або харчову алергію. В одному з конкретних варіантів здійснення цим винаходом запропоноване використання антитіла за цим винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування atopічного дерматиту. В деяких варіантах здійснення цим винаходом запропоноване використання антитіла за цим винаходом або фармацевтичної композиції, до складу якої воно входить, для виготовлення лікарського засобу для лікування еозинофільного езофагіту, склеродермії/системного склерозу, виразкового коліту або хронічного обструктивного захворювання легенів. В деяких варіантах здійснення цим винаходом запропоноване використання антитіла за цим винаходом або фармацевтичної композиції, до складу якої воно входить, для виготовлення лікарського засобу для лікування хвороби Крона.

Цей винахід також стосується молекул нуклеїнових кислот, що кодують антитіла за цим винаходом. В одному з варіантів здійснення цим винаходом запропонована молекула ДНК, що містить полінуклеотидну послідовність, яка кодує HC, де амінокислотна послідовність HC являє собою SEQ ID NO: 9. За деякими з таких варіантів здійснення цього винаходу згадана молекула ДНК має полінуклеотидну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 20.

В одному з варіантів здійснення цим винаходом запропонована молекула ДНК, що містить полінуклеотидну послідовність, яка кодує LC, де амінокислотна послідовність LC являє собою SEQ ID NO: 10. За деякими з таких варіантів здійснення цього винаходу згадана молекула ДНК має полінуклеотидну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 21.

У ще одному варіанті здійснення цим винаходом запропонована молекула ДНК, що містить полінуклеотидну послідовність, яка кодує HC, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, і містить полінуклеотидну послідовність, яка кодує LC, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10. В одному з конкретних варіантів здійснення цього винаходу полінуклеотидна послідовність, яка кодує HC, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, представлена послідовністю SEQ ID NO: 20, і полінуклеотидна послідовність, яка кодує LC, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, представлена послідовністю SEQ ID NO: 21.

Цим винаходом також запропонована клітина ссавців, трансформована молекулою(-ами) ДНК, де згадана клітина є здатною до експресії сполуки, яка містить HC і LC за цим винаходом, де HC представлений послідовністю SEQ ID NO: 9, і LC представлений послідовністю SEQ ID NO: 10. Також цим винаходом запропонований спосіб одержання сполуки, яка містить HC і LC, який включає культивування клітини ссавця за таких умов, за яких експресується антитіло за цим винаходом. Цим винаходом також запропоноване антитіло, продукowane за допомогою згаданого способу.

В іншому варіанті здійснення цим винаходом запропоноване антитіло, яке контактує з людським IL-33 на новій антигенній детермінанті, де згадана антигенна детермінанта має такі залишки послідовності SEQ ID NO: 19: Ser в положенні 23; Pro в положенні 24; Ile в положенні 25; Thr в положенні 26; Glu в положенні 27; Tyr в положенні 28; Leu в положенні 29; Tyr в

положенні 69; Glu в положенні 71; Val в положенні 83; Asp в положенні 84; Lys в положенні 86; Leu в положенні 88; Leu в положенні 126; Asp в положенні 128; Met в положенні 129; Asp в положенні 132; Cys в положенні 133; Val в положенні 134; Glu в положенні 175; i Thr в положенні 176. В такому варіанті здійснення цього винаходу згадану антигенну детермінанту визначають за допомогою рентгенівської кристалографії, де будь-який залишок на IL-33 в межах 4,5 є від іншого залишку на зв'язаному Fab вважається ділянкою контакту. Отже термін "антигенна детермінанта" у значенні, вживаному у цьому описі, має відношення до ділянок антигену, які контактують з варіабельною ділянкою антитіла.

У значенні, вживаному в цьому описі, "антитіло" являє собою молекулу імуноглобуліну, що містить 2 HC і 2 LC, пов'язані між собою дисульфідними зв'язками. Аміно-кінцева частина кожного LC і HC містить варіабельну ділянку з приблизно 100-120 амінокислот, головним чином відповідальну за розпізнавання антигену через CDR, які входять до її складу. CDR чергуються з ділянками, які є більш консервативними і які називають каркасними ділянками ("FR"). Кожна HCVR і LCVR складається з трьох CDR і чотирьох FR, розміщених від аміно-кінця до карбоксикінця в такому порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. З CDR LC називають "LCDR1, LCDR2 і LCDR3", а з CDR HC називають "HCDR1, HCDR2 і HCDR3". Згадані CDR містять більшість залишків, які утворюють специфічні взаємозв'язки з антигеном. Тобто, CDR містять більшість залишків, які контактують (у межах 4,5 є) із залишками антигену. Отже функціональна здатність антитіла до зв'язування певного антигену значною мірою залежить від амінокислотних залишків у межах згаданих шести CDR. Визначення амінокислот в CDR-доменах в межах LCVR і HCVR антитіл за цим винаходом має за основу добре відому схему нумерації, яка розроблена Кабатом (Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)), схему нумерації, яка розроблена Норттом (North et al., A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology, 406: 228-256 (2011)), і Чотья (Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins, J. Mol. Biol. 1987, 196:901-17. Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill SJ, Air G, Sheriff S, Padlan EA, Davies D, Tulip WR et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature, 1989; 342:877-83). CDR антитіл за цим винаходом визначають згідно з Таблицею 1.

Таблиця 1

Схеми нумерації CDR, що використовуються для визначення CDR антитіл за цим винаходом

CDR	Початкові амінокислотні залишки, що визначаються за:	Кінцеві амінокислотні залишки, що визначаються за:
HCDR1	Чотья	Кабат/Норт
HCDR2	Кабат	Кабат
HCDR3	Чотья/Кабат	Чотья/Кабат
LCDR1	Чотья/Кабат/Норт	Чотья/Кабат/Норт
LCDR2	Чотья/Кабат	Чотья/Кабат/Норт
LCDR3	Чотья/Кабат/Норт	Чотья/Кабат/Норт

Антитіла за цим винаходом можуть бути одержані і очищені з використанням відомих методів. Наприклад, послідовності кДНК, які кодують HC (наприклад, амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 9), і LC (наприклад, амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 10), можуть бути клоновані і введені у експресійний вектор GS (глутамінсинтетаза). Цим сконструйованим вектором експресії імуноглобуліну потім можуть бути стабільно трансфected клітини CHO. Як буде зрозуміло фахівцю в цій галузі, наслідком експресії антитіл ссавцями буде глікозилювання, як правило, на висококонсервативних ділянках N-глікозилювання на Fc-фрагменті. Стабільні клони можуть бути перевірені на експресію антитіла, що специфічно зв'язується з IL-33. Позитивні клони можуть бути розмножені в безсироватковому культуральному середовищі для продукування антитіл в біореакторах. Середовище, в яке буде секретуватися антитіло, може бути очищене звичайними методами. Наприклад, середовище може бути без утруднень нанесено на колонку з протейном A або G Sepharose FF, яка була врівноважена сумісним буфером, таким як забуферений фосфатом фізіологічний розчин. Колонку промивають, щоб видалити компоненти неспецифічного зв'язування. Зв'язане антитіло елюють, наприклад, градієнтом pH, й фракції антитіла виявляють, наприклад, з використанням SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію), а потім об'єднують. Згадане

антитіло може бути сконцентроване та/або стерильно відфільтроване з використанням традиційних методик. Розчинні агрегати і мультимери можуть бути ефективно видалені звичайними методами, в тому числі гель-хроматографією за розміром молекул, гідрофобною хроматографією, іонообмінною хроматографією або хроматографією на гідроксилапатитній адсорбційній колонці. Продукт може бути негайно заморожений, наприклад, при температурі - 70 °C, або може бути ліофілізований.

Антитіло за цим винаходом може бути включене до складу фармацевтичної композиції, яка може бути одержана способами, добре відомими в цій галузі, і містити антитіло за цим винаходом і один або більше фармацевтично прийнятний(-их) носій(-ів), розріджувач(-ів) або наповнювач(-ів).

Фармацевтична композиція, що містить ефективну кількість антитіла за цим винаходом, може бути введена пацієнту, що належить до групи підвищеного ризику захворювання, або має прояви захворювань чи порушень, які наведені в цьому описі, парентеральними шляхами (наприклад, підшкірним, внутрішньовенним, внутрішньоочеревинним, внутрішньом'язовим або черезшкірним). "Ефективна кількість" означає кількість, виражену в дозах та для проміжків часу, та для певних засобів введення), необхідну для досягнення бажаного терапевтичного результату. Ефективна кількість антитіла може змінюватись в залежності від таких факторів, як стан хвороби, вік, стать і маса індивідуума, а також від здатності антитіла викликати бажану відповідь у індивідуума. Ефективною кількістю також є кількість, при якій будь-які токсичні або шкідливі впливи антитіла за цим винаходом переважаються терапевтично сприятливими результатами.

Антитіла за цим винаходом можуть бути використані при лікуванні пацієнтів. Більш конкретно, очікується, що антитіла за цим винаходом будуть лікувати алергічні захворювання, такі як atopічний дерматит, астма, алергічний риніт і харчова алергія. Алергічні захворювання являють собою сукупність хронічних станів, які включають аномальні імунні реакції на речовини, які зазвичай є нешкідливими для більшості людей. Очікується також, що антитіла за цим винаходом також будуть лікувати еозинофільний езофагіт, склеродермію/системний склероз, виразковий коліт і хронічне обструктивне захворювання легенів. Очікується також, що антитіла за цим винаходом будуть лікувати хворобу Крона.

У значенні, взаємозамінно використовуваному у цьому описі, терміни "курс лікування" та/або "лікування" та/або "лікувати" призначені для позначення всіх процесів, в ході яких може відбуватись уповільнення, переривання, затримка, контролювання, припинення або звертання прогресування розладів, наведених у цьому описі, але не обов'язково вказують на повне усунення всіх симптомів розладу. Лікування включає введення антитіла за цим винаходом для лікування захворювання або стану у людини, сприятливим для якої було б зниження активності IL-33, і включає: (а) інгібування подальшого прогресування захворювання; і (b) полегшення захворювання, тобто, спричинення регресу захворювання або розладу чи полегшення його симптомів або ускладнень.

Конструювання антитіл

Батьківське людське антитіло проти IL-33 було оптимізовано для зв'язування з людським IL-33. Для досягнення цього CDR ізольованих VH і VL були довільно розподілені за допомогою мутагенезу, і одержані антитіла були піддані скринінгу на зв'язування з людським IL-33 з використанням ELISA. Мутації, що підсилюють афінність, потім об'єднували для одержання Антитіла 23, яке потім оптимізували, використовуючи метод з бібліотекою каркасних ділянок. Для бібліотеки каркасних ділянок синтезували дванадцять зародкових генів людських каркасних ділянок VH (1-24, 1-46, 1-69, 2-5, 3-15, 3-23, 3-53, 3-72, 4-04, 4-39, 5-51 і 6-01) і вісім зародкових генів людських каркасних ділянок VL (A-19, A-26, A-27, B-2, B-3, L-2, L-12 і O-2), що містять CDR Антитіла 23, і клонували у вектори експресії важких і легких ланцюгів людських IgG4. Після транз'єнтної трансфекції клітин 293 HEK всіма 96 комбінаціями важких і легких ланцюгів, супернатанти аналізували з використанням ELISA на зв'язування з людським IL-33, безпосередньо нанесеним на планшет, і з біотинільованим IL-33 в розчині після захоплення людського IgG з супернатантів антитілом проти людських каппа-ланцюгів. Людське антитіло з CDR, одержаними з Антитіла 23 з використанням людських каркасних ділянок 3-53 важкого ланцюга і людських каркасних ділянок A27 легкого ланцюга, було вибрано для подальшої розробки (Антитіло 75). Наслідком експресії Антитіла 75 у транз'єнтно трансфектованих клітинах CHO було одержання більш високих титрів експресії у порівнянні з Антитілом 23. Крім того, очищення Антитіла 75 призвело до більш високого рівня очищення, ніж у Антитіла 23. У Антитіла 75 спостерігали також зниження неспецифічного зв'язування з гепарином у порівнянні з Антитілом 23. В цілому, Антитіло 75 має властивості, яким у порівнянні з властивостями Антитіла 23 віддається перевага. Антитіло 75 зв'язувалося з людським IL-33 з афінністю 14,5

пМ, і з IL-33 макак-крабоїдів з афінністю 12400 пМ, що становить 850-кратну різницю у видовій перехресній реактивності.

Потім Антитіло 75 було оптимізовано для зв'язування з IL-33 макак-крабоїдів. Для досягнення цього CDR ізольованих VH і VL Антитіла 75 були довільно розподілені за допомогою мутагенезу, і одержані антитіла були піддані скринінгу на зв'язування з людським IL-33 та IL-33 макак-крабоїдів з використанням ELISA. Мутації, що підсилюють афінність до IL-33 макак-крабоїдів, які не чинять суттєвого негативного впливу на афінність до людського IL-33, потім об'єднували для одержання Антитіла 54. Антитіло 54 зв'язувалося з людським IL-33 з афінністю 46 пМ, і з IL-33 макак-крабоїдів з афінністю 217 пМ, що становить 5-кратну різницю у видовій перехресній реактивності. Потім Антитіло 54 піддавали додатковим генно-інженерним маніпуляціям для зниження потенційної імуногенності, які призводили до одержання Антитіла 43. Нижче наведені ідентифікаційні номери амінокислотних послідовностей для Антитіла 43, Антитіла 54 і Антитіла 75.

	HC	LC	HCVR	LCVR
Ab 75	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ab 54	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
Ab 43	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12

Приклади

Приклад 1: Експресія і очищення ілюстративних антитіл

Антитіла за цим винаходом можуть бути біосинтезовані, очищені і введені до складу композицій добре відомими методами. Відповідна клітина-хазяїн, така як HEK 293 або CHO, транз'єнтно або стабільно трансфекується експресійною системою для секретування антитіл з використанням заздалегідь визначеного співвідношення векторів HC:LC, якщо використовуються два вектори, або єдиною векторною системою, яка кодує як важкий, так і легкий ланцюги. Вектори, придатні для експресії і секреції антитіл з цих зазвичай використовуваних клітин-господарів, є добре відомими.

Після експресії та секреції антитіла середовище прояснювали, щоб видалити клітини, і прояснене середовище очищали, використовуючи будь-який з багатьох часто використовуваних методів. Наприклад, середовище може бути нанесено на колонку з протеїном А або G, врівноважену буфером, таким як забуферений фосфатом фізіологічний розчин (pH 7,4). Колонку промивали для видалення компонентів неспецифічного зв'язування. Зв'язане антитіло елюювали, наприклад, градієнтом pH (наприклад, від 0,1 М натрій фосфатного буферу, pH 6,8, до 0,1 М натрійцитратного буферу, pH 2,5). Фракції антитіла виявляли, наприклад, з використанням SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію), а потім об'єднували. Додаткове очищення є факультативним у залежності від передбачуваного використання. Згадане антитіло може бути сконцентроване та/або стерильно відфільтроване з використанням традиційних методик. Вміст інших матеріалів, окрім антитіла, таких як клітина-хазяїн і компоненти ростового середовища, і розчинні агрегати та мультимери антитіла, може бути ефективно зменшений або вони можуть бути видалені звичайними методами, в тому числі гель-хроматографією за розміром молекул, гідрофобною хроматографією, катіонообмінною хроматографією, іонообмінною хроматографією, афінною хроматографією або хроматографією на гідроксилапатитній адсорбційній колонці. Чистота антитіла після цих хроматографічних стадій зазвичай перевищує 95 %. Продукт може бути заморожений при температурі -70 °C, або може бути ліофілізований.

Елюстративне Антитіло 43 або було експресовано транз'єнтно в клітинах CHO після спільної трансфекції окремими ДНК-векторами, що експресували важкі ланцюги і легкі ланцюги, які містили послідовності ДНК SEQ ID NO: 20 і SEQ ID NO: 21, відповідно, або було експресовано стабільно, знову ж таки в клітинах CHO, після трансфекції єдиним ДНК-вектором, який містив послідовності ДНК SEQ ID NO: 20 і SEQ ID NO: 21, які кодують важкий ланцюг і легкий ланцюг, відповідно. Середовище, зібране з 7-денної транз'єнтної культури CHO, або 14-денної змішаної культури CHO, прояснювали, і одержаний неочищений супернатант очищали хроматографуванням на колонках з протеїном А. Антитіло 43, зв'язане з протеїном А, елюювали з використанням буфера з низьким pH. Елюйоване антитіло додатково очищали, використовуючи препаративну гель-хроматографію за розміром молекул (SEC) для матеріалу, одержаного з транз'єнтно трансфектованих клітин CHO, або ж використовуючи катіонообмінну хроматографію, як стадію тонкого очищення, для матеріалу, одержаного зі стабільно трансфектованих клітин CHO. Кінцеву чистоту Антитіла 43 оцінювали із використанням SDS-PAGE, аналітичної SEC-HPLC і LC/MS-аналізу. Дослідженням Endosafe-PTS було показано, що

рівень ендотоксину становить <1 ОЕ/мг. Очищене Антитіло 43 зберігали в PBS (забуферений фосфатом фізіологічний розчин), рН 7,2, при температурі 4 °С.

Афінність зв'язування *in vitro* і кінетика.

Кінетику зв'язування і афінність Антитіла 43 до ЕЛ-33 людини, макак-крабоїдів, мишей, пацюків і кролів визначали з використанням дослідження поверхневого плазмонного резонансу на приладі Biacore T100 або Biacore T200, який спочатку обробляли проточним буфером HBS-EP (GE Healthcare, 10 mM розчин Hepes, рН 7,4, 150 mM розчин NaCl, 3 mM розчин EDTA, 0,05 % розчин поверхнево-активної речовини P20), й при температурі проведення дослідження, встановленій на рівні 37°C. Для застосування методу іммобілізації на всіх чотирьох проточних кюветах (Fc) був використаний чіп CM4, що містить іммобілізований протеїн А (одержаний з використанням стандартного сполучення аміногруп NHS-EDC (N-гідроксисукциніміду (NHS) та N-етил-N-(диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC))). Зразки антитіл готували в проточному буфері з концентрацією 10 мкг/мл. Зразки мишачого, пацючого і кролячого IL-33 готували в проточному буфері з кінцевою концентрацією 1000 нМ, 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 63 нМ, 31 нМ, 16 нМ і 0 нМ. Зразки IL-33 людини і макак-крабоїдів готували в проточному буфері з кінцевою концентрацією 250 нМ, 125 нМ, 63 нМ, 31 нМ, 16 нМ, 8 нМ, 4 нМ, 2 нМ, 1 нМ і 0 нМ. Кожен цикл дослідження включав етапи (1) захоплення зразків антитіл на окремих проточних кюветах (Fc2, Fc3 або Fc4); (2) введення 200 мкл IL-33 в усі проточні кювети зі швидкістю 100 мкл/хв; (3) повернення в потік буферу протягом мінімум 10 хв зі швидкістю 100 мкл/хв для моніторингу дисоціації комплексу; (4) регенерація поверхні чіпа двома послідовними ін'єкціями 7,5 мікролітрів гліцину, рН 1,5; і (5) врівноваження поверхні чіпа протягом 5 хв перед повторенням циклу. Кожну концентрацію IL-33 вводили з повтором. Дані обробляли з використанням стандартного подвійного посилення, і підганяються до моделі зв'язування 1:1 з використанням програмного забезпечення Biacore T100 Evaluation, версія 2.0.1, для визначення швидкості асоціації (k_{on} , одиниці $M^{-1}s^{-1}$), і для визначення швидкості дисоціації (k_{off} , одиниці s^{-1}). Константу дисоціації у стані рівноваги (K_D) обчислювали з відношення $K_D = k_{off}/k_{on}$ в молярних одиницях. Дослідження зв'язування Антитіла 43 з IL-33 людини і макак-крабоїдів проводили з трьома дослідними повторами (n).

За результатами процедур по суті таких, як описано вище, Антитіло 43 мало залежну від концентрації реакцію зв'язування з людським IL-33 та IL-33 макак-крабоїдів. При найвищій введеній концентрації (1000 нМ) мишачого, пацючого і кролячого IL-33 сигнал реакції зв'язування не досягав теоретичного напівмаксимального сигналу реакції. В результаті K_D Антитіла 43 з мишачим, пацючим і кролячим IL-33 була оцінена на рівні >1000 нМ. Способи, аналогічні описаним вище, використовували для визначення кінетики зв'язування і афінності Антитіла 75 і Антитіла 54. Аналогічні методи також використовували для визначення кінетики зв'язування і афінності антитіла IgG₄ проти IL-33 (антитіло не за цим винаходом), яке має послідовності HCVR і LCVR APE4909 (розкриті в WO 15106080; і в цьому описі згадується як "Антитіло 6"). Ці результати наведені в Таблиці 2.

Таблиця 2

Кінетика зв'язування IL-33 і афінність антитіл за цим винаходом і Антитіла 6

Антитіло	Антиген	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$ Середнє±SD (середнє квадратичне відхилення)	$k_{off} (s^{-1})$ Середнє±SD (середнє квадратичне відхилення)	K_D (pM) Середнє±SD (середнє квадратичне відхилення)	N
Антитіло 75*	Людський IL-33	$1,7 \pm 0,5 \times 10^6$	$2,6 \pm 0,1 \times 10^{-5}$	$14,5 \pm 1,5$	3
Антитіло 75*	IL-33 макак-крабоїдів	$1,7 \pm 0,6 \times 10^6$	$1,9 \pm 0,1 \times 10^{-2}$	12400 ± 4000	3
Антитіло 54*	Людський IL-33	$1,5 \pm 0,5 \times 10^6$	$6,8 \pm 1,3 \times 10^{-5}$	46 ± 9	3
Антитіло 54*	IL-33 макак-крабоїдів	$1,5 \pm 0,2 \times 10^6$	$3,4 \pm 0,5 \times 10^{-4}$	217 ± 50	3
Антитіло 43	Людський IL-33	$1,5 \pm 0,1 \times 10^6$	$7,2 \pm 1,7 \times 10^{-5}$	49 ± 14	3
Антитіло 43	IL-33 макак-крабоїдів	$1,5 \pm 0,2 \times 10^6$	$51 \pm 2,0 \times 10^{-5}$	338 ± 45	3
Антитіло 6*	Людський IL-33	$1,6 \pm 0,1 \times 10^6$	$4,0 \pm 0,9 \times 10^{-4}$	252 ± 73	2
Антитіло 6*	IL-33 макак-крабоїдів	$1,8 \pm 0,6 \times 10^6$	$1,3 \pm 0,1 \times 10^{-3}$	804 ± 377	2
Антитіло 43	Мишачий IL-33	$K_D > 1000$ нМ			1
Антитіло 43	Пацючий IL-33	$K_D > 1000$ нМ			1
Антитіло 43	Кролячий IL-33	$K_D > 1000$ нМ			1

*Випробовувано в різні дні

In vitro визначення характеристик зв'язування з людським IL-33 та іншими членами родини IL-1.

5 Біосенсор BIAcore 2000 використовується для демонстрації специфічності зв'язування Антитіла 43 з людським IL-33 і для того, щоб показати, що ілюстративне антитіло не зв'язується з іншими членами родини білків IL-1 людини.

10 Протеїн А (Calbiochem) сполучали з використанням вільних аміногруп з карбоксильними групами у проточних кюветах 1 і 2 біосенсорного чіпа CM5 (GE Healthcare) з використанням суміші N-етил-N-(диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC) і N-гідроксисукциніміду (NHS). Для захоплення позитивних контрольних антитіл кролячий анти-козячий IgG (Fc-специфічний) зв'язували з проточною кюветою 3, а кролячий анти-пацючий IgG (Fc-специфічний) зв'язували з проточною кюветою 4 (обидва від Jackson ImmunoResearch). Моніторинг проточних кювет здійснювали при швидкості потоку 30 мкл/хв з використанням буфера, що містить 0,01 М розчин HEPES, pH 7,4, 150 мМ розчин NaCl, 0,005 % розчин поверхнево-активної речовини P20. 15 Антитіло 43 захоплюється на проточній кюветі 2 до одержання у цілому від 300 до 800 резонансних одиниць (RU; результати відображають проточну кювету 2 мінус проточна кювета 1). Після тестів зі зв'язуванням між кожним циклом здійснювали етап регенерації з використанням гліцин-HCl (pH 1,5). Проточну кювету 1 використовували як контроль для моніторингу неспецифічного зв'язування досліджуваних речовин. Елюстративне антитіло 20 випробовували з усіма вказаними досліджуваними речовинами родини білків IL-1 людини в концентрації 500 нМ.

25 Одержані після виконання процедур по суті так, як описано вище, результати, наведені в Таблиці 3, показують, що Антитіло 43 зв'язується виключно з людським IL-33, а не з іншими членами родини IL-1.

Таблиця 3

Антитіло 43 специфічно зв'язується з IL-33

Ліганд	Зв'язування ілюстративного антитіла	Зв'язування позитивного контролю
IL-33	Так	
IL-1 α	Ні	Так
IL-1 β	Ні	Так
IL-1RA	Ні	Так
IL-18	Ні	Так
IL-36 α	Ні	Так
IL-36 β	Ні	Так
IL-36 γ	Ні	Так
IL-36RA	Ні	Так
IL-37	Ні	Так

Нейтралізація IL-33 в репортерному дослідженні GEC NF κ B-люцифераза in vitro.

30 Для визначення здатності Антитіла 43 інгібувати IL-33-індуковану активність NF κ B використовували людські клубочкові ендотеліальні клітини (GEC), стабільно трансфековані генно-інженерною конструкцією NF κ B-люцифераза. Згадана лінія GEC природним чином експресувала рецептор ST2 і його корецептор IL1RAP. У відповідь на людський IL-33 у GEC активувався шлях NF κ B.

35 Клітини GEC-NF κ B-luc культивують у аналітичному середовищі (середовище EGM BulletKit (LONZA) плюс пуроміцин). За день до проведення досліджень клітини GEC-NF κ B-luc висівали з розрахунку 5000 клітин в 50 мкл/лунку на оброблені колагеном І планшети з білими стінками (BD Bioscoat), і планшети інкубували протягом ночі.

40 Наступного дня клітини обробляли Антитілом 43 у присутності IL-33. Для кожного випробування додавали по 25 мкл ілюстративного антитіла на лунку в діапазоні доз 0-133,3 нМ на лунку. Потім в кожен лунку додавали 25 мкл людського IL-33 з кінцевою концентрацією 126 пМ (на підставі того, що молекулярна маса становить 20 кДа). Людський мономерний ST2 (IL1RL1) використовували в дослідженні як позитивний контроль в діапазоні доз 0-142,9 нМ (кінцева концентрація на підставі того, що молекулярна маса становить 35 кДа), а ізотипове контрольне антитіло використовували в дослідженні як негативний контроль в діапазоні доз 0-133,3 нМ (кінцева концентрація на підставі того, що молекулярна маса становить 75 кДа). Всі 45

проби виконували тричі. 96-лункові планшети інкубували при температурі 37 °C, 95 % відносній вологості, 5 % CO₂ протягом 4 год., після чого додавали 100 мкл/лунку розчину One-Glo Luciferase для оцінювання активності люциферази, і планшети зчитували на люмінометрі (Perkin Elmer Victor3). Результати наведені нижче в Таблиці 4.

5

Таблиця 4

IC₅₀ ілюстративного антитіла (нМ, середнє ± середнє квадратичне відхилення)
в in vitro аналізі активності NFκB-GEC-люциферази.

Антитіло	IC ₅₀ людського IL-33	IC ₅₀ IL33 макак-крабодів
Антитіло 43	330±112	1918±152
Антитіло 54*	139±98	851±500
Антитіло 75*	286±67	немає даних
Антитіло 6*	292±158	1031
Позитивний контроль	426±115	175±21

*Випробувано в різні дні

Після виконання процедур по суті так, як описано вище, Антитіло 43 дозозалежним чином інгібувало активність NFκB, індуковану IL-33 людини і IL-33 макак-крабодів, але не інгібувало активності NFκB, індукованої мишачим, пацючим або кролячим IL-33. Середнє значення IC₅₀ трьох незалежних експериментів з нейтралізації IL-33 людини і макак-крабодів підсумоване в Таблиці 4. Негативне контрольне Антитіло негативного контролю не інгібувало активність NFκB в клітинах GEC-NFκB-luc при будь-якій випробуваній концентрації.

Нейтралізація IL-33-індукованої секреції GM-CSF з тучних клітин людини in vitro.

Визначали інгібування IL-33-індукованого вивільнення GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор) з тучних клітин людини шляхом обробки Антитілом 43. Людські тучні клітини, які природно експресують рецептор ST2 (IL1RL1) і його корецептор IL1RAP, диференціювали в культурі з людських стовбурових клітин пуповинної крові з використанням середовища StemSpan (StemCell) і SCF/IL-6. У день дослідження тучні клітини висівали з розрахунку 50000 клітин у 50 мкл/лунку на 96-лункові планшети для культивування тканин у культуральному середовищі. Клітини обробляли IL-33 в присутності або за відсутності антитіла. Для кожного випробування додавали по 25 мкл 4X ілюстративного антитіла на лунку в діапазоні доз 0-30 нМ. В кожен лунку додавали 25 мкл 4X людського IL-33 до кінцевої концентрації 0,5 нМ. Аналітичне середовище окремо використовували як контроль, який не піддавали обробці, і мономерний ST2 людини використовували як позитивний контроль в діапазоні доз 0-30 нМ. Езотипове контрольне антитіло, випробуване при 30 нМ, використовували як негативний контроль. Випробування проводили з потрійним повторенням. 96-лункові планшети поміщали в інкубатор для культури тканин (37 °C, 95 % відносна вологість, 5 % CO₂) на 16 год. Для визначення рівнів GM-CSF збирали по 100 мкл/лунку супернатанту за допомогою наявного у продажу набору для проведення твердофазного імуноферментного аналізу ELISA (R&D Systems).

Після виконання процедур по суті так, як описано вище, Антитіло 43 дозозалежним чином повністю інгібувало індуковану людським IL33 секрецію GM-CSF з тучних клітин людини з IC₅₀ 0,3 нМ, який був кращим ніж IC₅₀ 7,6 нМ розчинного рецептора, який відіграв роль позитивного контролю. В іншому подібному експерименті Антитіло 54 інгібувало індуковану людським IL33 секрецію GM-CSF з тучних клітин людини з IC₅₀ 0,265 нМ, і Антитіло 6 інгібувало індуковану людським IL33 секрецію GM-CSF з людських тучних клітин з IC₅₀ 0,811 нМ. Езотипове контрольне антитіло не інгібувало IL-33-індуковану секрецію GM-CSF. Результати є репрезентативними для двох незалежних експериментів.

Енгібування IL-33-індукованого продукування IL-5 in vivo.

Для підтвердження нейтралізації IL-33 in vivo, для визначення того, чи здатне Антитіло 43 нейтралізувати дію IL-33 людини та інгібувати продукування мишачого IL-5 in vivo, мишам C57BL/6 (n=5) внутрішньоочеревинним шляхом вводили антитіло у дозі 0,94 мг/кг, 0,282 мг/кг або 0,094 мг/кг, або контрольне ізотипове антитіло у дозі 0,94 мг/кг. Через день після ін'єкції мишам внутрішньоочеревинним шляхом вводили 0,025 мг/кг людського IL-33. Через шість годин після введення людського IL-33 мишей вмертвлювали, і збирали сироватку. Сироватку досліджують на продукування мишачого IL-5 з використанням наявного у продажу набору для проведення твердофазного імуноферментного аналізу ELISA (R&D Systems) згідно з інструкціями виробника.

Результати показали, що Антитіло 43 здатне повністю інгібувати продукування мишачого IL-5 дозозалежним чином. Рівні IL-5 в сироватці мишей, яким вводили ілюстративне антитіло у дозі 0,94 мг/кг, 0,282 мг/кг або 0,094 мг/кг, становили $0,03 \pm 0,004$ нг/мл, $0,166 \pm 0,036$ нг/мл і $0,430 \pm 0,095$ нг/мл, відповідно. Негативне контрольне антитіло не інгібувало індуковане людським IL-33 продукування мишачого IL-5. Ці дані демонструють, що Антитіло 43 інгібує

продукування мишачого IL-5 шляхом нейтралізації людського IL-33 in vivo.

In vivo ефективність сурогатного антитіла проти мишачого IL-33 у моделі запалення дихальних шляхів

Сурогатне антитіло для нейтралізації мишачого IL-33 (mIL-33) розроблене для застосування в моделях доклінічної форми захворювання. Цим сурогатним антитілом є мишаче моноклональне антитіло IgG1, яке нейтралізує mIL-33 у тестах in vitro. In vivo визначали здатність системного введення згаданого антитіла проти mIL-33 впливати на запальну реакцію дихальних шляхів при введенні *Alternaria*. Мишам-самцям лінії BALB/c (n=5 на групу) у день 0 підшкірним шляхом вводили 25 мг/кг антитіла проти mIL-33 або ізотипового контрольного антитіла. У дні 1 і 2, за 30 хв до введення *Alternaria*, мишам у дозі 12,5 мг/кг внутрішньоочеревинним шляхом вводили мишачий ST2-Fc, розчинну форму одного з корецепторів IL-33, який може нейтралізувати mIL-33 у дослідженнях in vitro (позитивний контроль). Кожній миші у день 1 і день 2 інтраназальним шляхом вводили екстракт *Alternaria* (50 мкг в 20 мкл забуференого фосфатом фізіологічного розчину). Мишей вмертвлювали на 3 день шляхом інгаляції CO₂, і кров негайно збирали через серцеву пункцію для приготування сироватки.

Бронхо-альвеолярну промивну рідину (BAL) одержували промиванням легенів 10 порціями (500 мкл кожна) промивочного PBS, і відкачуванням його з кожної миші через канюлю в оголеній трахеї. Бронхо-альвеолярну промивну рідину центрифугували при 200g протягом 10 хв, супернатант видаляли, і заморожували. Клітини ресуспендували в 1 мл буфера ACK (Sigma) для лізису червоних кров'яних клітин, промивали, і ресуспендували у 0,5 мл PBS для підрахунку. Еозинофіли підраховували із використанням рідини для розбавлення еозинофілів і барвника (ENG Scientific, а за каталогом ES-3101), а загальну кількість клітин підраховують із використанням трипанового синього. Бронхо-альвеолярну промивну рідину досліджували для виявлення антитіл, використовуючи наявні у продажу набори для проведення твердофазного імунного аналізу ELISA мишачого IL-5 та хітіназа-3-подібного YM1 (Chi3L3/YM1) (R&D Systems). Результати наведені нижче в Таблиці 5.

Таблица 5

Рівні IL-5 і Chi3L3/YM1, а також кількість еозинофілів і загальна кількість клітин в бронхо-альвеолярній промивній рідині.

Клітини/Цитокіни	Без введення	Езотиповий контроль	Антитіло проти mIL-33	Позитивний контроль
Еозинофіли (кількість клітин)	32000±13565	340000±70711	120000±51769	112000±57480
IL-5 (пг/мл)	2±0	69,6±27,31	2±0	9,2±6,248
Chi3L3/YM1 (нг/мл)	17,4±2,064	108,6±28,7	27,4±4,986	37,4±6,313
Загальна кількість клітин (кількість клітин)	104000±20396	408000±95833	144000±31241	152000±44989

Після виконання процедур по суті так, як описано вище, контрольне зараження *Alternaria* збільшувало кількість клітин, переважно еозинофілів, присутніх у бронхо-альвеолярній промивній рідині. Воно також індукувало продукування цитокінів, таких як IL-5 і Chi3L3/YM1. Системне введення антитіла проти mIL-33 суттєво знижувало інфільтрацію еозинофілів та загальну інфільтрацію клітин, за результатами підрахунків клітин у бронхо-альвеолярній промивній рідині, і знижувало рівні IL-5 і Chi3L3/YM1 у бронхо-альвеолярній промивній рідині. Ці результати демонструють, що інгібування mIL-33 зменшувало рівні численних запальних маркерів в цій моделі запалення дихальних шляхів.

Картування антигенних детермінант методом рентгенівської кристаллографії

Рентгенівська кристаллографія

10,6 мг/мл розчину комплексу hIL33:FAB піддавали скринінгу на кристали з використанням звичайних та доступних у продажу скринінгів. Експерименти з дифузії у паровій фазі проводили при температурі 22 °C з використанням 400 нл+400 нл кристалізаційних крапель (розчин білка + лунковий розчин) з 50 мкл лункового розчину (0,2 М розчин сульфату амонію і

30 % (маса/об'єм) поліетиленгліколю 8000) на планшеті з лежачою краплею MRC2 (SWISSCI). До білка додавали 20 мМ ацетату магнію для сприяння кристалізації. Одержані кристали піддавали надшвидкому заморожуванню в рідкому азоті з подальшим швидким зануренням в лунковий розчин, що містить 20 % етиленгліколю, доданого як кріогенний агент. Дані рентгенівської дифракції збирали з використанням синхротронного випромінювання на LRL-CAT 31-ID (Source Photon Source, Argonne, штат Еллінойс). 180 фреймів збирають при 1° осциляції на довжині хвилі 0,97931 е, і обробляють за допомогою пакета програм CCP41.

Кристали належать до просторової групи P21212 з розмірами елементарної комірки $a=70,1$ е, $b=194,9$ е, $c=46,5$ е, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Молекулярно-замісний розчин комплексу hIL33:FAB одержували із застосуванням Phaser2, використовуючи вхідні моделі зі структури PDB 4KC3 і модель FAB, створену із застосуванням інструменту моделювання антитіл MOE3 (v2014.9). Молекулярно-замісний розчин містив 1 комплекс в асиметричній одиниці. Цей розчин згодом піддавали декільком етапам очищення з подальшим створенням моделі із застосуванням Buster4 та Coot5, і одержували остаточну структуру з R_{work} 17,8 % і R_{free} 20,3 % при 1,40 е.

Антигенну детермінанту hIL33 картували для високороздільної кристалічної структури комплексу hIL33:FAB, використовуючи інструмент Protein Contacts в MOE3 (v2015.10). Цей інструмент використовували для оцінювання "дистанційної", "ковалентної", "аренної", "іонної" взаємодії та взаємодії "водневих зв'язків". Вихідні дані для міжланцюгових взаємодій піддавали математичній обробці до рівня залишків у Microsoft Excel для ідентифікації залишків антигенної детермінанти hIL33. Остаточний список містив залишки hIL33, які знаходилися в межах 4,5 е від будь-якого залишку FAB.

Після виконання процедур по суті так, як описано вище, антитіло, що має ті ж самі CDR, що і Антитіло 75, контактувало з людським IL-33 на антигенній детермінанті, представлений наведеними нижче залишками послідовності SEQ ID NO: 19: Ser в положенні 23; Pro в положенні 24; Ile в положенні 25; Thr в положенні 26; Glu в положенні 27; Tyr в положенні 28; Leu в положенні 29; Tyr в положенні 69; Glu в положенні 71; Val в положенні 83; Asp в положенні 84; Lys в положенні 86; Leu в положенні 88; Leu в положенні 126; Asn в положенні 128; Met в положенні 129; Asn в положенні 132; Cys в положенні 133; Val в положенні 134; Glu в положенні 175; і Thr в положенні 176. Антитіло 54 і Антитіло 43 також контактували з по суті аналогічною антигенною детермінантою на людському IL-33.

Послідовності

HC Антитіла 75 (SEQ ID NO: 1)

EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLHGIRAAAYDAFIWGGQTLTVTVSSASTKGPSV
FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
GTKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVEKYGPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPRREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

LC Антитіла 75 (SEQ ID NO: 2)

EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVGINLSWYQQKPGQAPRLLIYGASHRATGIPDRFSGS
GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYSQSPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

HCVR Антитіла 75 (SEQ ID NO: 3)

EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLHGIRAAAYDAFIWGGQTLTVTVSS

LCVR Антитіла 75 (SEQ ID NO: 4)

EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVGINLSWYQQKPGQAPRLLIYGASHRATGIPDRFSGS
GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYSQSPPTFGGGTKVEIK

HC Антитіла 54 (SEQ ID NO: 5)

evqlvetgggllqpggslrlscaasgftfsyamswwrqapgkglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnsraedta
vyycartlhgiraaydafiiwgqgtltvtvssastkgpsvflapcsrstsestaalgclvkdyppeptvswngaltsgvhtfpavllqssgylsls
vvtvpssslgktytcnvndhkpsntkvdkrveskygppcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqdedpevqfnwv
dgvevhnatkprreeqfnstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiektiskakgqprepqvyltppsqqeemtknqvslclvkgyfyp
sdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysrlltdksrw

qegnvfscsvmhcalhnhytqkslsllslg

LC Антитіла 54 (SEQ ID NO: 6)

EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVGINLSWYQQKPGQAPRLLIYGASHRLTGIPDRFSGS
GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYSQPPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV

CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC
HCVR Антитіла 54 (SEQ ID NO: 7)
evqlvetgggliqpqgsrlscaasgftsfyamswwrqapgkglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnsntlylqmnsraedta
5 vyycartLhgiraaydafiiwgqgtltvss
LCVR Антитіла 54 (SEQ ID NO: 8)
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGINLSWYQQKPGQAPRLLIYGASHRLTGIPDRFSGS
GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYSQPPPTFGGGTKVEIK
HC Антитіла 43 (SEQ ID NO: 9)
10 evqlvetgggliqpqgsrlscaasgftsfyamswwrqapgkglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnsntlylqmnsraedta
vyycartihgiraaydafiiwgqgtltvssastkgsplapcsrstsestaalgclvkdypvptvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssv
vtvpssslgktkytcnvdhkpsntkvdkrveskygppcpapeaaggpsvflfpkpkdtlmisrtpevtcvvdvsqedpevqfnwyvd
gvevhnaktkpreeqfnstyrsvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkglpssiektiskakgqprepvytlppsqeemtknqvsitclvkgyfyps
diavewesngqpennnyktpvldsdgsfflysrlytdksrwqegnvfscsvmhhealhnhytqkslsislg
15 LC Антитіла 43 (SEQ ID NO: 10)
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGINLSWYQQKPGQAPRLLIYGASHRLTGIPDRFSGS
GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYSQPPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC
20 HCVR Антитіла 43 (SEQ ID NO: 11)
evqlvetgggliqpqgsrlscaasgftsfyamswwrqapgkglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnsntlylqmnsraedta
vyycartihgiraaydafiiwgqgtltvss
LCVR Антитіла 43 (SEQ ID NO: 12)
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGINLSWYQQKPGQAPRLLIYGASHRLTGIPDRFSGS
25 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYSQPPPTFGGGTKVEIK
HCDR1 (SEQ ID NO: 13)
GFTFSXYAMS
Де Х у положенні 6 являє собою S або F.
HCDR2 (SEQ ID NO: 14)
30 AISGSGGSTYYADSVKG
HCDR3 (SEQ ID NO: 15)
TXHGIRAAYDAFII
Де Х у положенні 2 являє собою L або I.
LCDR1 (SEQ ID NO: 16)
35 RASQSVGINLS
LCDR2 (SEQ ID NO: 17)
GASHRXT
Де Х у положенні 6 являє собою A або L.
LCDR3 (SEQ ID NO: 18)
40 HQYSQXPPPT
Де Х у положенні 6 являє собою S або P.
Амінокислоти 95-270 людського IL-33 (SEQ ID NO: 19)
AfgisgvqkytralhdssitgispitylaslstyndqsitfaledesyeiYvedlkdekdkdvllsyyesqhpnsesgdgvdgkmlmvtls
ptkdfWlhannehsvelhkceklpdpqaffvlhnmhnsncvsfecktdpgvfigvkdnhlalikvdssenlctenilfklset
45 ДНК, що кодує HC SEQ ID NO: 9, (SEQ ID NO: 20)
GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCTTTTATGCTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG
GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGATTCC
GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAG
50 CCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACGATCCACGGTATACGCGCAGC
CTATGATGCTTTTATTATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTCAACGTCTCCTCAGCTTCTACCAAGG
GCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGG
GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGA
CCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
55 GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCCTGCCCA
GCACCTGAGGCGCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTGTTCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCA
TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGG
TCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGG
60 AGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCAGCGTCCCTGCACCAAGGACTGGCTGAA

CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATC
TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT
5 CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGA
ATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCTGGGT

ДНК, що кодує LC SEQ ID NO: 10, (SEQ ID NO: 21)

10 GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCT
CTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCATCAACTTGTCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG
GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCCATAGGCTAACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGT
GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGT
GTATTACTGTCATCAATATAGTCAACCACCTCCCTTCACTTTGCGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA
TCAAACGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
15 GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA
GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGA
CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA
GAGTGC

20

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Елі Ліллі енд Компані

<120> АНТИТІЛА ПРОТИ IL-33 ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> X21037

<150> US 62/414258

<151> 2016-10-28

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

 $\langle 220 \rangle$

<223> Синтетична тепло-інженерна конструкція

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Thr Leu His Gly Ile Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Phe Ile Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu 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	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	195	200	205
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	210	215	220
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	225	230	235
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	260	265	270
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	290	295	300
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	305	310	315
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	325	330	335
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	340	345	350
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	355	360	365
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	370	375	380
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	385	390	395
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	405	410	415
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	420	425	430
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	435	440	445
Gly																		
<210> 2																		

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

<220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 3

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

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 4

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

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

<210> 5
<211> 449
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Phe Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Leu His Gly Ile Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Phe Ile Ile
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu 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 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
195 200 205
Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
210 215 220
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

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

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly

<210> 6

<211> 215

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 6

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 Gly Ile Asn
20 25 30

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

<210> 7

<211> 123

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 7

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

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

<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 8

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

<210> 9
<211> 449
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 9

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Gly	Leu	Ile	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Phe	Tyr	20	25	30	
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Thr	Ile	His	Gly	Ile	Arg	Ala	Ala	Tyr	Asp	Ala	Phe	Ile	Ile	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	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	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	195	200	205	
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	210	215	220	
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	225	230	235	240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	260	265	270	
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	290	295	300	

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

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

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

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

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

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

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly

<210> 10
<211> 215
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 10

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 Gly Ile Asn
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 11

<211> 123

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 11

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Thr Ile His Gly Ile Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Phe Ile Ile
100 105 110

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

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 12

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

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa at position 6 is Ser or Phe Xaa у положенні 6 являє собою Ser або Phe

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr Ala Met Ser
1 5 10

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 14

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

Gly

<210> 15
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa at position 2 is Leu or Ile

<400> 15

Thr Xaa His Gly Ile Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Phe Ile Ile
1           5           10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 16

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

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa at position 6 is Ala or Leu

<400> 17

```

Gly Ala Ser His Arg Xaa Thr
1 5

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa at position 6 is Ser or Pro

<400> 18

His Gln Tyr Ser Gln Xaa Pro Pro Phe Thr
1 5 10

<210> 19
<211> 176
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 19

Ala Phe Gly Ile Ser Gly Val Gln Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp
1 5 10 15

Ser Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu
20 25 30

Ser Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser
35 40 45

Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys
50 55 60

Val Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly
65 70 75 80

Asp Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys
85 90 95

Asp Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His
100 105 110

Lys Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn
115 120 125

Met His Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val
130 135 140

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

Ser Glu Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr
165 170 175

<210> 20

<211> 1347

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 20

```

gaggtgcagc tggtaggagc tggaggaggc ttgatccagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc ttttatgcta tgagctgggt cgcagaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagattccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
cttcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaacgac      300
cacggtatac gcgcagccta tgatgctttt attatctggg gccagggcac cctggtcacc      360
gtctcctcag cttctaccaaa gggcccatcg gtcttcccg ctagcgcctg ctccaggagc      420
acctccgaga gcacagccgc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg      480
acgggtgtcgt ggaactcagg gcgcctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggetgtccta      540
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc      600
acgaagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga      660
gttgagtcca aatatggtcc cccatgccca ccctgccag cacctgaggc cgcgggggga      720
ccatcagtc tctgttccc cccaaaacc aaggacactc tcatgatctc cgggaccct      780
gaggtcacgt gcgtgggtgt ggacgtgagc caggaagacc cggaggtcca gttcaactgg      840
tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac      900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaacggcaag      960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaaggc ctcccgtct ccatcgagaa aaccatctcc     1020
aaagccaaag ggcagccccg agagccacag gtgtacacc tgccccatc ccaggaggag     1080
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctacc cagcgacatc     1140
gccgtggagt gggaaagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggt     1200
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg     1260
caggagggga atgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca     1320
cagaagagcc tctcctgtc tctgggt      1347

```

<210> 21

<211> 645

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 21

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtcg gagtggtggc atcaacttgt cctggtacca gcagaaacct      120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatcccata ggctaactgg catcccagac      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag actggagcct      240
gaagattttg cagtgtatta ctgtcatcaa tatagtcaac cacctccctt cactttcggc      300
ggaggggacca aggtggagat caaacggacc gtggctgcac catctgtctt catcttcccg      360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc      420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc      480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg      540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag      600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc      645

```

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

- 5 1. Антитіло, що зв'язує людський IL-33, яке містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR) і варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), де LCVR включає гіперваріабельні ділянки (CDR) LCDR1, LCDR2 і LCDR3, і HCVR включає CDR HCDR1, HCDR2 і HCDR3, і де амінокислотна послідовність LCDR1 представлена послідовністю SEQ ID NO: 16, амінокислотна послідовність LCDR2 представлена послідовністю SEQ ID NO: 17, амінокислотна послідовність LCDR3 представлена послідовністю SEQ ID NO: 18, амінокислотна послідовність HCDR1 представлена послідовністю SEQ ID NO: 13, амінокислотна послідовність HCDR2 представлена послідовністю SEQ ID NO: 14, а амінокислотна послідовність HCDR3 представлена послідовністю SEQ ID NO: 15, і де Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 13 являє собою Ser або Phe, Хаа в положенні 2 послідовності SEQ ID NO: 15 являє собою Leu або Ile, Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 17 являє собою Ala або Leu, і Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 18 являє собою Ser або Pro.
- 10 2. Антитіло за п. 1, в якому:
 - а) Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 13 являє собою Ser;
 - б) Хаа в положенні 2 послідовності SEQ ID NO: 15 являє собою Leu;
 - 20 в) Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 17 являє собою Ala; і
 - д) Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 18 являє собою Ser.
- 15 3. Антитіло за п. 1, в якому:
 - а) Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 13 являє собою Phe;
 - б) Хаа в положенні 2 послідовності SEQ ID NO: 15 являє собою Leu;
 - 25 в) Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 17 являє собою Leu; і
 - д) Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 18 являє собою Pro.
- 30 4. Антитіло за п. 1, в якому:
 - а) Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 13 являє собою Phe;
 - б) Хаа в положенні 2 послідовності SEQ ID NO: 15 являє собою Ile;
 - в) Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 17 являє собою Leu; і
 - д) Хаа в положенні 6 послідовності SEQ ID NO: 18 являє собою Pro.
- 35 5. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що амінокислотна послідовність LCVR являє собою SEQ ID NO: 4, і амінокислотна послідовність HCVR являє собою SEQ ID NO: 3.
6. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що амінокислотна послідовність LCVR являє собою SEQ ID NO: 8, і амінокислотна послідовність HCVR являє собою SEQ ID NO: 7.

7. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що амінокислотна послідовність LCVR являє собою SEQ ID NO: 12, і амінокислотна послідовність HCVR являє собою SEQ ID NO: 11.
8. Антитіло за п. 1, яке містить легкий ланцюг (LC) і важкий ланцюг (HC), причому амінокислотна послідовність LC являє собою SEQ ID NO: 2, і амінокислотна послідовність HC являє собою SEQ ID NO: 1.
9. Антитіло за п. 1, яке містить LC і HC, причому амінокислотна послідовність LC являє собою SEQ ID NO: 6, і амінокислотна послідовність HC являє собою SEQ ID NO: 5.
10. Антитіло за п. 1, яке містить LC і HC, причому амінокислотна послідовність LC являє собою SEQ ID NO: 10 і амінокислотна послідовність HC являє собою SEQ ID NO: 9.
11. Фармацевтична композиція, що містить антитіло за будь-яким з пп. 1-10, і один або більше фармацевтично прийнятних носіїв, розріджувачів або наповнювачів.
12. Антитіло за будь-яким з пп. 1-10 для застосування в терапії.
13. Антитіло за будь-яким з пп. 1-10 для застосування при лікуванні одного або більше алергічних захворювань.
14. Антитіло за п. 13, де згаданим алергічним захворюванням є atopічний дерматит, астма, алергічний риніт або харчова алергія.
15. Антитіло за п. 14, де згаданим алергічним захворюванням є atopічний дерматит.
16. Антитіло за будь-яким з пп. 1-10 для застосування при лікуванні еозинофільного езофагіту, склеродермії/системного склерозу, виразкового коліту або хронічного обструктивного захворювання легенів.
17. Антитіло за будь-яким з пп. 1-10 для застосування при лікуванні хвороби Крона.
18. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-10 для виготовлення лікарського засобу для лікування одного або більше алергічних захворювань.
19. Застосування за п. 18, де згаданим алергічним захворюванням є atopічний дерматит, астма, алергічний риніт або харчова алергія.
20. Застосування за п. 19, де згаданим алергічним захворюванням є atopічний дерматит.
21. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-10 для виготовлення лікарського засобу для лікування еозинофільного езофагіту, склеродермії/системного склерозу, виразкового коліту або хронічного обструктивного захворювання легенів.
22. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-10 для виготовлення лікарського засобу для лікування хвороби Крона.
23. Молекула ДНК, що містить полінуклеотидну послідовність, яка кодує HC, де амінокислотна послідовність HC являє собою послідовність SEQ ID NO: 9.
24. Молекула ДНК, що містить полінуклеотидну послідовність, яка кодує LC, де амінокислотна послідовність LC являє собою послідовність SEQ ID NO: 10.
25. Молекула ДНК, що містить полінуклеотидну послідовність, яка кодує HC, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, і містить полінуклеотидну послідовність, яка кодує LC, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10.
26. Клітина ссавця, трансформована молекулою ДНК за п. 23 і молекулою ДНК за п. 24, причому згадана клітина здатна експресувати антитіло, що містить HC, представлений амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 9, і LC, представлений амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 10.
27. Клітина ссавця, трансформована молекулою ДНК за п. 25, де згадана клітина здатна експресувати антитіло, що містить HC, представлений амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 9, і LC, представлений амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 10.
28. Спосіб одержання антитіла, де вказане антитіло містить два HC і два LC, в яких амінокислотна послідовність кожного з двох HC представлена амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 9, і амінокислотна послідовність кожного з двох LC представлена амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 10, причому цей спосіб включає:
 - a) культивування клітини ссавця за п. 26 або клітини ссавця за п. 27 за таких умов, за яких експресується згадане антитіло, і
 - b) виділення експресованого антитіла.
29. Антитіло, одержуване за способом за п. 28.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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