

Prezenta invenție se află în domeniul medicinei. Mai particular, prezenta invenție se referă la anticorpi direcționați împotriva interleukinei-33 (IL-33) și compozițiilor farmaceutice ale acestora. Se așteaptă ca anticorpul prezentei invenții să fie util în tratamentul dermatitei atopice.

Dermatita atopică (cunoscută și sub numele de eczemă atopică) este o boală alergică inflamatorie cronică a pielii care se caracterizează prin leziuni recurente roșii, mâncărime. Două anomalii fiziopatologice majore sunt observate la pacienții cu dermatită atopică; inflamația cutanată din cauza răspunsurilor imune inadecvate la nivelul pielii și a structurii și funcției epidermice modificate. Infiltratul inflamator este alcătuit dintr-un amestec de celule, în special celule imune care exprimă IL-4, IL-5 și IL-13. Aceste citokine sunt adesea crescute în alte boli alergice, inclusiv astmul și rinita alergică.

Dermatita atopică a fost descrisă ca fiind principala sarcină non-fatală pentru sănătate atribuită bolilor de piele. Deși începe cel mai adesea în copilărie și afectează doi din zece copii, este foarte răspândită și la adulți. Majoritatea adulților care suferă de dermatită atopică cronică au avut boală aproape pe tot parcursul vieții. Mâncărimea, lipsa de somn și jena socială din cauza leziunilor vizibile au efecte substanțiale asupra bunăstării psihosociale a pacienților și a rudelor acestora. La copii, efectul dermatitei atopice asupra calității vieții legate de sănătate este similar cu cel al altor tulburări majore din copilărie, cum ar fi astmul și diabetul. Majoritatea persoanelor care au dermatită atopică au antecedente personale sau familiale de alergii.

În prezent, dermatita atopică nu poate fi vindecată, iar scopul gestionării bolii este de a controla sau îmbunătăți simptomele și de a realiza controlul bolii pe termen lung cu o abordare cu mai multe etape. Principiile principale sunt repararea continuă a barierei epidermice cu emolienți, evitarea factorilor declanșatori individuali și terapia antiinflamatoare cu corticosteroizi topici sau inhibitori de calcineurină. În cazurile grav afectate, sunt indicate fototerapia sau imunosupresoarele sistemice. Prin urmare, este nevoie de terapii eficiente suplimentare pentru pacienții cu dermatită atopică.

IL-33 este un membru al superfamiliei de citokine IL-1 și se exprimă în principal prin keratinocite, celule epiteliale și celule endoteliale. IL-33 activează mai multe tipuri de celule imune înnașcute și dobândite provocând producerea altor mediatori proinflamatori și este cel mai frecvent caracterizat ca o citokină epitelială care promovează răspunsurile

imune de tip 2 sau ajutori T 2 (Th2). Există un număr de anticorpi care se leagă și neutralizează IL-33 cunoscute în domeniu. De exemplu, Publicația SUA nr. 20160168242A1 și Publicația internațională nr. WO2015 / 106080A2 și WO2016 / 077381 dezvăluie anumiți anticorpi care leagă IL-33 uman. Cu toate acestea, este nevoie de anticorpi alternativi care leagă IL-33 uman cu afinitate ridicată și sunt eficienți terapeutic în tratarea bolilor alergice, cum ar fi dermatita atopică. Afinitatea îmbunătățită și IC₅₀ superior pot permite beneficii de dozare.

Prezenta invenție abordează necesitatea unei terapii alternative cu anticorpi pentru pacienții cu boli alergice precum dermatita atopică, alergiile alimentare, rinita alergică și astmul. În unele variante, boala alergică este dermatita atopică. Prezenta invenție abordează, de asemenea, necesitatea unei terapii alternative cu anticorpi pentru pacienții cu boli inflamatorii persistente, inclusiv esofagită eozinofilă, sclerodermie / scleroză sistemică, colită ulcerativă și boală pulmonară obstructivă cronică. Prezenta invenție abordează, de asemenea, necesitatea unei terapii alternative cu anticorpi pentru pacienții cu boală Crohn.

Conform unui prim aspect al prezentei invenții, este furnizat un anticorp care leagă IL-33 uman, cuprinzând două LCDR1, fiecare cu SEQ ID NR: 16, două LCDR2, fiecare cu SEQ ID NR: 17, două LCDR3, fiecare dintre SEQ ID NR: 18, două HCDR1, fiecare dintre SEQ ID NR: 13, două HCDR2, fiecare dintre SEQ ID NR: 14 și două HCDR3, fiecare dintre SEQ ID NR: 15 în care fiecare LCVR este SEQ ID NR: 4, SEQ ID NR: 8, sau SEQ ID NR: 12, și fiecare HCVR este SEQ ID NR: 3, SEQ ID NR: 7, sau SEQ ID NR: 11.

Conform unei variante preferate a prezentei invenții, este furnizat un anticorp conform prezentei invenții în care fiecare LCVR este SEQ ID NO: 4 și fiecare HCVR este SEQ ID NO: 3.

Conform unui alt exemplu de realizare preferat al prezentei invenții, este furnizat un anticorp conform prezentei invenții în care fiecare LCVR este SEQ ID NR: 8 și fiecare HCVR este SEQ ID NR: 7.

Conform încă unui alt exemplu de realizare preferat al prezentei invenții, este furnizat un anticorp conform prezentei invenții în care fiecare LCVR este SEQ ID NR: 12 și fiecare HCVR este SEQ ID NR: 11.

De preferință, fiecare LC este SEQ ID NR: 2, SEQ ID NR: 6, sau SEQ ID NR: 10 și fiecare HC este SEQ ID NR: 1, SEQ ID NR: 5 sau SEQ ID NR: 9.

De preferință, fiecare LC este SEQ ID NR: 2 și fiecare HC este SEQ ID NR: 1.

De preferință, fiecare LC este SEQ ID NR: 6, și fiecare HC este SEQ ID NR: 5.

De preferință, fiecare LC este SEQ ID NR: 10, și fiecare HC este SEQ ID NR: 9.

Conform unui al doilea aspect al prezentei invenții, este furnizată o compoziție farmaceutică cuprinzând anticorpul prezentei invenții și unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți acceptabili farmaceutic.

Conform unui alt aspect al prezentei invenții, este furnizat anticorpul prezentei invenții pentru utilizare în terapie.

De preferință, anticorpul conform prezentei invenții este destinat utilizării în tratamentul uneia sau mai multor boli alergice.

Mai preferabil, anticorpul prezentei invenții este destinat utilizării în boli alergice în care boala alergică este dermatita atopică, astmul, rinita alergică sau alergia alimentară. Chiar mai preferabil, anticorpul conform prezentei invenții este dermatita atopică.

Într-un exemplu de realizare preferat, anticorpul prezentei invenții este destinat utilizării în tratamentul esofagitei eozinofile, a sclerodermiei / sclerozei sistemice, a colitei ulcerative sau a bolii pulmonare obstructive cronice.

Conform unui alt exemplu de realizare preferat, anticorpul prezentei invenții este destinat utilizării în tratamentul bolii Crohn.

Prezenta invenție asigură, de asemenea, o compoziție farmaceutică cuprinzând un anticorp conform prezentei invenții și unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți acceptabili farmaceutic. În unele variante, compozițiile farmaceutice ale prezentei invenții pot fi utilizate în tratamentul unei boli alergice, prin care un astfel de tratament cuprinde administrarea unui pacient care are nevoie de aceasta o cantitate eficientă dintr-o compoziție farmaceutică conform prezentei invenții. În unele variante particulare, boala alergică este dermatita atopică, astmul, rinita alergică, sau alergie alimentară. În unele variante de realizare, compozițiile farmaceutice ale prezentei invenții pot fi utilizate în tratamentul de esofagită eozinofilă, sclerodermie / scleroză sistemică, colită ulcerativă sau boală pulmonară obstructivă cronică. În unele variante, compozițiile farmaceutice ale prezentei invenții pot fi utilizate în tratamentul bolii Crohn.

Prezenta invenție oferă, de asemenea, o metodă de tratare a unei boli alergice, care cuprinde administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta o cantitate eficientă de anticorp conform prezentei invenții. În unele astfel de realizări, boala alergică este dermatita atopică. În alte astfel de realizări, boala alergică este astmul. În alte astfel de realizări, boala alergică este alergiia alimentară. În alte astfel de realizări, boala alergică este rinita alergică. Prezenta invenție furnizează, de asemenea, o metodă de tratare a dermatitei atopice, care cuprinde administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta o cantitate eficientă de anticorp conform prezentei invenții. În unele variante de realizare, prezenta invenție oferă, de asemenea, o metoda de tratare a cel puțin uneia dintre esofagite eozinofile, sclerodermie / scleroză sistemică, colită ulcerativă și cronică boală pulmonară obstructivă, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta o cantitate eficientă de anticorp din prezenta invenție. În unele variante, prezenta invenție oferă, de asemenea, o metodă de tratare a bolii Crohn.

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, un anticorp al prezentei invenții sau o compoziție farmaceutică a acestuia pentru utilizare în terapie. În unele variante de realizare, prezenta invenție furnizează un anticorp al prezentei invenții sau o compoziție farmaceutică a acestuia pentru utilizare în tratamentul bolilor alergice, în care boala alergică este dermatita atopică, astmul, rinita alergică sau alergiia alimentară. Într-un exemplu de realizare particular, prezenta invenție furnizează un anticorp al prezentei invenții sau o compoziție farmaceutică a acestuia pentru utilizare în tratamentul dermatitei atopice. În unele variante, prezenta invenție furnizează un anticorp al prezentei invenții sau compoziția farmaceutică a acestuia pentru utilizarea în tratamentul esofagitei eozinofile, sclerodermie / scleroză sistemică, colită ulcerativă sau boală pulmonară obstructivă cronică. În unele variante de realizare, prezenta invenție furnizează un anticorp al prezentei invenții sau compoziția farmaceutică a acestora pentru utilizare în tratamentul bolii Crohn.

Într-un exemplu de realizare, prezenta invenție prevede, de asemenea, utilizarea unui anticorp conform prezentei invenții sau a unei compoziții farmaceutice a acestuia în fabricarea unui medicament pentru tratamentul bolilor alergice. În unele variante de realizare, prezenta invenție prevede utilizarea unui anticorp conform prezentei invenții sau a unei compoziții farmaceutice a acestuia în fabricarea unui medicament pentru

tratamentul bolii alergice, în care boala alergică este dermatita atopică, astmul, rinita alergică sau alimentele alergice. Într-o variantă particulară, prezenta invenție prevede utilizarea unui anticorp conform prezentei invenții la fabricarea unui medicament pentru tratamentul dermatitei atopice. În unele variante de realizare, prezenta invenție oferă utilizarea unui anticorp conform prezentei invenții sau a unei compoziții farmaceutice a acestuia în fabricarea unui medicament pentru tratamentul esofagitei eozinofile, sclerodermei / sclerozei sistemice, colitei ulcerative sau a bolii pulmonare obstructive cronice. În unele variante de realizare, prezenta invenție oferă utilizarea unui anticorp conform prezentei invenții sau a unei compoziții farmaceutice a acestuia în fabricarea unui medicament pentru tratamentul bolii Crohn.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la moleculele de acid nucleic care codifică anticorpii din prezenta invenție. Într-o variantă de realizare, prezenta invenție furnizează o moleculă de ADN care cuprinde o SEQență de polinucleotidă care codifică un HC, în care SEQența de aminoacizi a HC este SEQ ID NR. ID NR: 20.

Într-o variantă de realizare, prezenta invenție furnizează o moleculă de ADN care cuprinde o SEQență de polinucleotide care codifică un LC, în care SEQența de aminoacizi a LC este SEQ ID NR. ID NR: 21.

Într-o altă variantă de realizare, prezenta invenție furnizează o moleculă de ADN care cuprinde o SEQență de polinucleotide care codifică un HC având SEQența de aminoacizi din SEQ ID NR: 9 și cuprinzând o SEQență de polinucleotid care codifică o LC având SEQența de aminoacizi din SEQ ID NR: 10 Într-o variantă particulară, SEQența polinucleotidică care codifică HC având SEQența de aminoacizi din SEQ ID NR: 9 este dată de SEQ ID NR: 20 și SEQența polinucleotidică care codifică LC având SEQența de aminoacizi din SEQ ID NR: 10 este dată de SEQ ID NR. 21.

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, o celulă de mamifer transformată cu moleculă (molecule) de ADN, care celulă este capabilă să exprime un compus care cuprinde un HC și un LC conform prezentei invenții, în care HC este dat de SEQ ID NR: 9 și LC este dată de SEQ ID NR. 10. De asemenea, prezenta invenție oferă un procedeu pentru producerea unui compus care cuprinde HC și LC, cuprinzând cultivarea celulei de mamifer în condiții astfel încât anticorpii prezentei invenții să fie exprimați. Prezenta invenție furnizează, de asemenea, un anticorp produs prin procedeul menționat.

Într-un alt exemplu de realizare, prezenta invenție furnizează un anticorp care intră în contact cu IL-33 uman la un epitop nou, în care epitopul are următoarele reziduuri ale SEQ ID NR: 19: Ser în poziția 23; Pro în poziția 24; Ile în poziția 25; Thr în poziția 26; Glu în poziția 27; Tyr în poziția 28; Leu în poziția 29; Tyr în poziția 69; Glu la poziția 71; Val la poziția 83; Asp la poziția 84; Lys în poziția 86; Leu în poziția 88; Leu în poziția 126; Asn la poziția 128; Intalnit la pozitia 129; Asn la poziția 132; Cys în poziția 133; Val la poziția 134; Glu la poziția 175; și Thr în poziția 176. Într-un astfel de exemplu de realizare, epitopul este determinat prin cristalografie cu raze X în cazul în care orice reziduu de pe IL-33 în 4,5Å de alt rest pe Fab legat este considerat a fi un site de contact. Termenul "epitop" așa cum este utilizat aici se referă astfel la siturile unui antigen care sunt în contact cu regiunea variabilă a unui anticorp.

Așa cum este utilizat aici, un „anticorp” este o moleculă de imunoglobulină care cuprinde 2 HC și 2 LC interconectate prin legături disulfură. Porțiunea amino terminală a fiecărui LC și HC include o regiune variabilă de aproximativ 100-120 aminoacizi responsabili în principal de recunoașterea antigenului prin CDR-urile conținute în acestea. CDR-urile sunt intercalate cu regiuni care sunt mai conservate, denumite regiuni cadru („FR”). Fiecare LCVR și HCVR este compus din 3 CDR-uri și 4 FR-uri, dispuse de la amino-terminal la carboxi-terminal în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Cele 3 CDR ale LC sunt denumite „LCDR1, LCDR2 și LCDR3”, iar cele 3 CDR ale HC sunt denumite „HCDR1, HCDR2 și HCDR3”. CDR-urile conțin majoritatea reziduurilor care formează interacțiuni specifice cu antigenul. Adică, CDR-urile conțin majoritatea reziduurilor care sunt în contact cu (în 4,5 Å) reziduurile antigenului. Capacitatea funcțională a unui anticorp de a lega un anumit antigen este, prin urmare, influențată în mare măsură de resturile de aminoacizi din cele șase CDR. Atribuirea aminoacizilor la domeniile CDR din regiunile LCVR și HCVR ale anticorpilor din prezenta invenția se bazează pe binecunoscuta convenție de numerotare Kabat (Kabat și colab., Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-93 (1971); Kabat și colab., SEQențe de proteine de interes imunologic, ediția a cincea, SUA Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)), North numeration convention (North et al., A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology, 406: 228-256 (2011)) și Chothia (Chothia C, Lesk AM. Structuri canonice pentru regiunile

hipervariabile ale imunoglobulinelor. 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 și colab. Conformări ale regiunilor hipervariabile ale imunoglobulinei. Nature. 1989; 342: 877-83). CDR-urile anticorpilor prezentei invenții sunt definite în conformitate cu Tabelul 1.

Tabelul 1. Convențiile de numerotare CDR utilizate pentru a defini CDR-urile anticorpilor conform prezentei invenții.

CDR	Pornirea definiției reziduurilor de aminoacizi	Definiți reziduurile de aminoacizi De:
HCDR1	Chothia	Kabat/North
HCDR2	Kabat	Kabat
HCDR3	Chothia/Kabat	Chothia/Kabat
HCDR1	Chothia/Kabat/North	Chothia/Kabat/North
HCDR2	Chothia/Kabat	Chothia/Kabat/North
HCDR3	Chothia/Kabat/North	Chothia/Kabat/North

Anticorpii conform prezentei invenții pot fi preparați și purificați folosind metode cunoscute. De exemplu, SEQențele de ADNc care codifică un HC (de exemplu SEQența de aminoacizi dată de SEQ ID NO: 9) și o LC (de exemplu, SEQența de aminoacizi dată de SEQ ID NO: 10) pot fi clonate și transformate într-un GS vector de expresie (sintetază de glutamină). Vectorul de expresie al imunoglobulinei proiectat poate fi apoi transfectat stabil în celule CHO. După cum va aprecia un specialist în domeniu, expresia anticorpilor la mamifere va avea ca rezultat glicozilarea, în mod tipic la siturile de N-glicozilare foarte conservate din regiunea Fc. Clonele stabile pot fi verificate pentru exprimarea unui anticorp care se leagă în mod specific de IL-33. Clonele pozitive pot fi extinse în mediu de cultură fără ser pentru producerea de anticorpi în bioreactoare. Mediul, în care a fost secretat un anticorp, poate fi purificat prin tehnici convenționale. De exemplu, mediul poate fi aplicat în mod convenabil la o coloană de proteină A sau G Sepharose FF care

a fost echilibrată cu un tampon compatibil, cum ar fi soluție salină tamponată cu fosfat. Coloana este spălată pentru a elimina componentele de legare nespecifice. Anticorpul legat este eluat, de exemplu, prin gradient de pH și fracțiile de anticorp sunt detectate, cum ar fi prin SDS-PAGE, și apoi reunite. Anticorpul poate fi concentrat și / sau filtrat steril folosind tehnici comune. Agregatul solubil și multimerii pot fi îndepărtați în mod eficient prin tehnici comune, incluzând excluderea dimensiunii, interacțiunea hidrofobă, schimbul de ioni sau cromatografia pe hidroxiapatită. Produsul poate fi imediat congelat, de exemplu la -70° C, sau poate fi liofilizat.

Un anticorp conform prezentei invenții poate fi încorporat într-o compoziție farmaceutică care poate fi preparată prin metode bine cunoscute în domeniu și cuprinde un anticorp din prezenta invenție și unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți acceptabili farmaceutic.

O compoziție farmaceutică cuprinzând o cantitate eficientă de anticorpi conform prezentei invenții poate fi administrată unui pacient cu risc sau care prezintă boli sau tulburări, așa cum este descris aici prin căi parentale (de exemplu, subcutanat, intravenos, intraperitoneal, intramuscular sau transdermic) . O "cantitate eficientă" se referă la o cantitate necesară (la dozaje și pentru perioade de timp și pentru mijloacele de administrare) pentru a obține rezultatul terapeutic dorit. O cantitate eficientă de anticorp poate varia în funcție de factori precum starea bolii, vârsta, sexul și greutatea individului și capacitatea anticorpului de a obține un răspuns dorit la individ. O cantitate eficientă este, de asemenea, una în care orice efecte toxice sau dăunătoare ale anticorpului conform prezentei invenții sunt compensate de efectele benefice terapeutice.

Anticorpii conform prezentei invenții pot fi utilizați în tratamentul pacienților. Mai precis, anticorpii prezentei invenții sunt de așteptat să trateze boli alergice, cum ar fi dermatita atopică, astmul, rinita alergică și alergia alimentară. Bolile alergice sunt un set de afecțiuni cronice care implică răspunsuri imune anormale la substanțe care sunt de obicei inofensive pentru majoritatea oamenilor. Anticorpii prezentei invenții sunt, de asemenea, așteptați să trateze esofagita eozinofilă, sclerodermia / scleroza sistemică, colita ulcerativă și boala pulmonară obstructivă cronică. Anticorpii din prezenta invenție sunt, de asemenea, așteptați să trateze boala Crohn.

Așa cum se utilizează în mod alternativ aici, „tratament” și / sau „tratare” și / sau „tratament” sunt destinate să se refere la toate procesele în care poate exista o încetinire, întrerupere, oprire, control, oprire sau inversare a progresiei tulburărilor descris aici, dar nu indică neapărat o eliminare totală a tuturor simptomelor tulburării. Tratamentul include administrarea unui anticorp conform prezentei invenții pentru tratamentul unei boli sau afecțiuni la un om care ar beneficia de o reducere a activității IL-33 și include: (a) inhibarea progresiei ulterioare a bolii; și (b) ameliorarea bolii, adică provocarea regresiei bolii sau tulburării sau ameliorarea simptomelor sau complicațiilor acestora.

Producerea anticorpilor

Un anticorp anti-IL-33 parental uman a fost optimizat pentru legarea de IL-33 uman. Pentru a realiza acest lucru, CDR-urile VH și VL izolate au fost randomizate prin mutageneză și anticorpii rezultați au fost testați pentru legarea la IL-33 umană utilizând ELISA. Mutațiile care îmbunătățesc afinitatea au fost apoi combinate pentru a produce anticorpul 23, care a fost apoi optimizat utilizând o abordare bibliotecă cadru. Pentru biblioteca cadru, douăsprezece gene umane ale liniei germinale VH (1-24, 1-46, 1-69, 2-5, 3-15, 3-23, 3-53, 3-72, 4-04, 4-39, 5-51 și 6-01) și opt gene cadru VL umane (A-19, A-26, A-27, B-2, B-3, L-2, L-12 și O-2) care conțin anticorpi 23 CDR-uri au fost sintetizate și donate în vectori de expresie IgG4 umane cu lanț greu și ușor. După 293 HEK transfecție tranzitorie a tuturor celor 96 de combinații de lanț greu și ușor, supernatantele au fost testate de ELISA pentru legarea la IL-33 umană acoperită direct pe o placă și la IL-33 biotinitată în soluție după captarea IgG umană de la supernatanti cu un anti-anticorp uman kappa. Pentru dezvoltarea ulterioară a fost ales un anticorp uman cu CDR derivat din anticorpul 23, care utilizează cadrul uman cu lanț greu 3-53 și cadrul lanțului ușor uman A27, (Anticorpul 75). Expresia anticorpului 75 în CHO tranzitoriu a dus la titruri de expresie mai mari în comparație cu anticorpul 23. Mai mult, purificarea anticorpului 75 a condus la randamente de purificare mai mari decât anticorpul 23. Legarea nespecifică redusă de heparină a fost observată și cu anticorpul 75 comparativ cu anticorpul 23. Per ansamblu, anticorpul 75 a avut proprietăți preferate în comparație cu anticorpul 23. Anticorpul 75 legat de IL-33 uman cu o afinitate de 14,5 pM și legat de IL-33 de cinomolg

cu o afinitate de 12,400 pM, reprezentând o diferență de ~ 850 ori reactivitate încrucișată a speciilor.

Anticorpul 75 a fost apoi optimizat pentru legarea la cinomolgul IL-33. Pentru a realiza acest lucru, CDR-urile VH și VL izolate ale anticorpului 75 au fost randomizate prin mutageneză și anticorpii rezultați au fost examinați pentru legarea la IL-33 umană și IL-33 cinomolgul prin ELISA. Mutațiile care îmbunătățesc afinitatea la cinomolg care nu au avut un impact semnificativ asupra afinității pentru IL-33 uman au fost apoi combinate pentru a produce anticorpul 54. Anticorpul 54 legat de IL-33 uman cu o afinitate de 46 pM și legat de cinomolgul IL-33 cu o afinitate de 217 pM reprezentând o diferență de 5 ori în reactivitatea încrucișată a speciilor. Anticorpul 54 a fost apoi conceput în continuare pentru a reduce imunogenitatea potențială, ceea ce a dus la anticorpul 43. Numerele de identificare a SEQenței de aminoacizi sunt furnizate mai jos pentru anticorpii 43, 54 și 75.

	HC	LC	HCVR	LCVR
Ab75	SEQ ID NR: 1	SEQ ID NR: 2	SEQ ID NR: 3	SEQ ID NR: 4
Ab54	SEQ ID NR: 5	SEQ ID NR: 6	SEQ ID NR: 7	SEQ ID NR: 8
Ab43	SEQ ID NR: 9	SEQ ID NR: 10	SEQ ID NR: 11	SEQ ID NR: 12

Exemple

Exemplul 1: Exprimarea și purificarea anticorpilor exemplificați

Anticorpii conform invenției pot fi biosintezați, purificați și formulați pentru administrare prin metode bine cunoscute. O celulă gazdă adecvată, cum ar fi HEK 293 sau CHO, este transfectată fie în mod tranzitor, fie stabil, cu un sistem de expresie pentru secretarea anticorpilor utilizând un raport cu vectorul HC: LC este predeterminat dacă se utilizează doi vectori, sau un sistem de vector unic care codifică atât lanțul greu cât și cel ușor. Vectorii potriviți pentru exprimarea și secreția anticorpilor din aceste celule gazdă utilizate în mod obișnuit sunt bine-cunoscuți.

După exprimarea și secreția anticorpului, mediul este clarificat pentru a îndepărta celulele și mediul clarificat este purificat folosind oricare dintre numeroasele tehnici utilizate în mod obișnuit. De exemplu, mediul poate fi aplicat pe o coloană de proteină A sau G care

a fost echilibrată cu un tampon, cum ar fi soluție salină tamponată cu fosfat (pH 7,4). Coloana este spălată pentru a elimina componentele de legare nespecifice. Anticorpul legat este eluat, de exemplu, printr-un gradient de pH (cum ar fi un tampon fosfat de sodiu 0,1 M pH 6,8 până la un tampon citrat de sodiu 0,1 M pH 2,5). Fraakțiile de anticorp sunt detectate, de exemplu prin SDS-PAGE, și apoi sunt grupate. Purificarea ulterioară este opțională, în funcție de utilizarea intenționată. Anticorpul poate fi concentrat și / sau filtrat steril folosind tehnici comune. Alte materiale decât anticorpul, cum ar fi celulele gazdă și componentele mediului de creștere, și agregatele solubile și multimerii anticorpului, pot fi reduse sau îndepărtate în mod eficient prin tehnici comune, incluzând excluderea dimensiunii, interacțiunea hidrofoabă, schimbul de cationi, schimbul de anioni, afinitatea sau cromatografie hidroxiapatită. Purity anticorpului după aceste etape de cromatografie este de obicei mai mare de 95%. Produsul poate fi congelat la -70 ° C sau poate fi liofilizat.

Anticorpul exemplificat 43 a fost exprimat fie în mod tranzitor în celule CHO după co-transfecție a vectorilor ADN separați de expresia lanțului greu și a lanțului ușor care au încorporat SEQențele ADN din SEQ ID NR: 20 și respectiv SEQ ID NR: 21, sau a fost exprimat stabil în celule CHO după transfecția unui singur vector ADN care a încorporat SEQențele ADN atât ale SEQ ID NR: 20, cât și SEQ ID NR: 21, care codifică lanțul greu și respectiv lanțul ușor. Mediul recoltat fie dintr-o cultură CHO tranzitorie de 7 zile, fie dintr-o cultură în vrac CHO de 14 zile a fost clarificată și supernatantul brut rezultat a fost purificat prin cromatografie cu Proteina A. Anticorpul 43 s-a legat de rășina proteinei A și a fost eluat folosind un tampon cu pH scăzut. Anticorpul eluat a fost purificat în continuare folosind fie cromatografia preparativă de excludere a mărimii (SEC), pentru materialul produs din CHO tranzitoriu, fie folosind cromatografia cu schimb de cationi ca etapă de lustruire pentru materialul produs din CHO stabil. Purity finală a anticorpului 43 a fost evaluată prin SDS-PAGE, SEC-HPLC analitică și analiză LC / MS. Nivelurile de endotoxină s-au dovedit a fi <1EU / mg utilizând analiza Endosafe-PTS. Anticorpul purificat 43 a fost depozitat în PBS (soluție salină tamponată cu fosfat), pH 7,2 la 4 ° C.

Afinitate și cinetică de legare *in vitro*

Cinetica de legare și afinitatea anticorpului 43 la om, maimuță cinomolgă, șoarece, șobolan și iepure IL-33 este determinată folosind o analiză de rezonanță a plasmonului de suprafață fie pe un instrument Biacore T100, fie T200 amorsat cu HBSEP + (GE Healthcare, 10 mM Hepes pH7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% surfactant P20) tampon de funcționare și temperatura de analiză setată la 37 ° C. Un cip CM4 care conține proteina A imobilizată (generat folosind cuplarea amină standard NHS-EDC) pe toate cele patru celule de flux (Fc) este utilizat pentru a utiliza o metodă de captare. Probele de anticorpi sunt preparate la 10 mg / ml în tampon de rulare. Probele IL-33 de șoareci, șobolani și iepuri sunt preparate la concentrații finale de 1000, 500, 250, 125, 63, 31, 16 și 0 nM în tampon de rulare. Probele IL-33 umane și Cynomologus sunt preparate la concentrații finale de 250, 125, 63, 31, 16, 8, 4, 2, 1 și 0 nM în tampon de rulare. Fiecare ciclu de analiză implică etapele (1) captării probelor de anticorpi pe celule de flux separate (Fc2, Fc3 sau Fc4); (2) injectarea a 200 mL de IL-33 peste toate celulele de flux la 100 mL / min; (3) revenirea la debitul tampon pentru cel puțin 10 min la 100 ml / min pentru a monitoriza disocierea complexă; (4) regenerarea suprafeței cipului cu două injecții SEQențiale de 7,5 microlitri de glicină, pH 1,5; și (5) echilibrarea suprafeței cipului timp de 5 minute înainte de repetarea ciclului. Fiecare concentrație de IL-33 este injectată în duplicat. Datele sunt procesate folosind standard cu dublă referențiere și se potrivesc la un model de legare 1:1 utilizând software-ul de evaluare Biacore T100, versiunea 2.0.1, pentru a determina rata de asociere (on-rate, k_{on} , unități $M^{-1}s^{-1}$) și disocierea rata (off-rate, k_{off} , s^{-1} unități). Constanta de disociere a echilibrului (K_D) este calculată din relația $K_D = k_{off} / k_{on}$ și este în unități molare. Trei replici experimentale (n) sunt efectuate pentru legarea anticorpului 43 de maimuța IL-33 umană și cynomolgus.

Urmând procedurile, în esență, așa cum s-a descris mai sus, anticorpul 43 a avut un răspuns de legare dependent de concentrație la IL-33 uman și la IL-33 maimuță cynomolgus. La cea mai mare concentrație de șoareci, șobolani și iepuri injectați IL-33 (1000 nM) semnalul de răspuns de legare nu a atins semnalul teoretic de răspuns semimaximal. Ca rezultat, K_D -ul anticorpului 43 la șoarece, șobolan și iepure IL-33 a fost estimat a fi > 1000 nM. Metode similare descrise mai sus au fost utilizate pentru a determina cinetica de legare și afinitatea anticorpului 75 și anticorpul 54. Metode similare au fost, de asemenea, utilizate pentru a determina cinetica de legare și afinitatea unui

anticorp IgG4 anti-IL-33 (care nu este conform prezentei invenții) având SEQențele HCVR și LCVR ale APE4909 (dezvăluite în WO15106080; denumite aici "Anticorp 6"). Aceste rezultate sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 2: Cinetica de legare a IL-33 și afinitatea anticorpilor conform prezentei invenții și a anticorpului 6.

Anticorp	Antigen	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) Avg±SD	K_{off} ($M^{-1}s^{-1}$) Avg±SD	K_D ($M^{-1}s^{-1}$) Avg±SD	N
Anticorp75*	IL-33 uman	$1.7 \pm 0.5 \times 10^6$	$2.6 \pm 0.1 \times 10^{-5}$	14.5 ± 1.5	3
Anticorp75*	IL-33 cinomolog	$1.7 \pm 0.6 \times 10^6$	$1.9 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	12400 ± 4000	3
Anticorp54*	IL-33 uman	$1.5 \pm 0.5 \times 10^6$	$6.8 \pm 1.3 \times 10^{-5}$	46 ± 9	3
Anticorp54*	IL-33 cinomolog	$1.5 \pm 0.2 \times 10^6$	$3.4 \pm 0.5 \times 10^{-4}$	217 ± 50	3
Anticorp43	IL-33 uman	$1.5 \pm 0.1 \times 10^6$	$7.2 \pm 1.7 \times 10^{-5}$	49 ± 14	3
Anticorp43	IL-33 cinomolog	$15 \pm 0.2 \times 10^6$	$51 \pm 2.0 \times 10^{-5}$	338 ± 45	3
Anticorp6*	IL-33 uman	$1.6 \pm 0.1 \times 10^6$	$4,0 \pm 0.9 \times 10^{-4}$	252 ± 73	2
Anticorp6*	IL-33 cinomolog	$18 \pm 0.6 \times 10^6$	$1.3 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	804 ± 377	2
Anticorp43	IL-33 de soarece	$K_D > 1000 \text{ nM}$			1
Anticorp43	IL-33 de sobolan	$K_D > 1000 \text{ nM}$			1

Anticorp43	IL-33 de iepure	$K_D > 1000 \text{ nM}$	1
*Testat in zile diferite			

Caracterizarea in vitro a legării la IL-33 uman și la alți membri ai familiei IL-1.

BIAcore biosensor 2000 este utilizat pentru a demonstra specificitatea de legare a anticorpului 43 la IL-33 uman și pentru a arăta că anticorpul exemplificat nu se leagă de alți membri ai familiei de proteine IL-1 umane.

Proteina A (Calbiochem) este cuplată prin intermediul grupărilor aminice libere la grupările carboxil pe celulele de flux 1 și 2 ale unui cip biosenzor CM5 (GE Healthcare) utilizând un amestec de N-etil-N- (dimetilaminopropil) -carbodiimidă (EDC) și N-hidroxisuccinimidă (NHS). Pentru a captura anticorpi de control pozitiv, IgG anti-capră de iepure (specific Fc) este cuplat cu celula de flux 3, iar IgG anti-șobolan de iepure (specific Fc) este cuplat cu celula de flux 4 (ambele din Jackson ImmunoResearch). Celulele de flux sunt monitorizate cu un debit de 30 ml / minut folosind un tampon conținând 0,01 M HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005% surfactant P20. Anticorpul 43 este capturat pe celula de flux 2 pentru a produce un total de 300 până la 800 de unități de răspuns (RU; rezultatele reflectă celula de flux 2 minus celula de flux 1). Testele de legare sunt urmate de o etapă de regenerare folosind glicină-HCl (pH 1,5) între fiecare ciclu. Celula de flux 1 este utilizată ca control pentru a monitoriza legarea nespecifică a analiților testați. Anticorpul exemplificat este testat cu toți analiții din familia de proteine IL-1 umană, conform listei la concentrația de 500 nM.

Urmând procedurile descrise mai sus, rezultatele din Tabelul 3 arată că Anticorpul 43 se leagă doar de IL-33 uman și nu de ceilalți membri ai familiei IL-1.

Tabelul 3: Antibodv 43 se leagă în mod specific de IL-33.

Ligand	Exemplificat	Legarea anticorpilor	Legarea controlului pozitiv
IL-33	DA		

IL-1 α	NU	DA
IL-1 β	NU	DA
IL-1RA	NU	DA
IL-18	NU	DA
IL-36 α	NU	DA
IL-36 β	NU	DA
IL-36 γ	NU	DA
IL-36RA	NU	DA
IL-37	NU	DA

Neutralizarea IL-33 în testul reporter GEC NF κ B-Luciferase in vitro.

Celulele endoteliale glomerulare umane (GEC) transfectate stabil cu un construct NF κ B - luciferază sunt utilizate pentru a determina capacitatea anticorpului 43 de a inhiba activitatea NF κ B indusă de IL-33. Linia GEC exprimă în mod natural receptorul ST2 și co-receptorul său IL1RAP. Ca răspuns la IL-33 uman, calea NF κ B este activată în GEC.

Celulele GEC-NF κ B-luc sunt cultivate în mediul de testare (mediul EGM BulletKit (LONZA) plus puromicină). În ziua anterioară testului, celulele GEC-NF κ B-luc sunt placate la 5.000 de celule în 50 ml / godeu în plăci tratate cu collagen I cu pereți albi (BD Biocoat), iar plăcile sunt incubate peste noapte.

A doua zi celulele sunt tratate cu anticorpul 43 în prezența IL-33. Pentru fiecare test, se adaugă 25 ml de anticorp exemplificat pe godeu la o doză cuprinsă între 0 și 133,3 nM per godeu. Se adaugă apoi 25 ml de IL-33 umană la fiecare godeu la o concentrație finală de 126 pM (pe baza MW = 20kDa). ST2 monomeric uman (IL1RL1) este utilizat ca control pozitiv în test într-un interval de doză de la 0 la 142,9 nM (baza concentrației finale pe MW = 35kDa), iar un anticorp de control izotip este utilizat ca control negativ în test intervalul de dozare de la 0 la 133,3 nM (baza concentrației finale pe MW = 75kDa). Toate

probele sunt rulate în trei exemplare. Plăcile cu 96 de godeuri sunt incubate la 37°C, 95% umiditate relativă, 5% CO₂ timp de 4 ore, după care se adaugă 100 ml / godeu de soluție One-Glo Luciferase pentru a măsura activitatea luciferazei și plăcile sunt citite pe un luminometru (Perkin Elmer Victor3). Rezultatele sunt prezentate mai jos în Tabelul 4.

Tabelul 4: Anticorp exemplificat IC₅₀ (pM, Avg 6 SD) în testul de activitate in vitro NF GB-GEC-luciferază.

Anticorp	IL-33 IC ₅₀ uman	IL33 IC ₅₀ - cino
Anticorp 43	330±112	1918±152
Anticorp 54*	139±98	851±500
Anticorp 75*	289±67	ND
Anticorp 6*	292±158	1031
Control pozitiv	426±115	175±21
*Testat in zile diferite		

Urmând procedurile în esență descrise mai sus, anticorpul 43 inhibă IL-33 umană și cino IL-33, dar nu activitatea NFκB indusă de șoarece, șobolan sau iepure IL-33 într-o manieră dependentă de doză. Media IC₅₀ din trei experimente independente pentru neutralizarea umană și cino este rezumată în tabelul 4. Anticorpul de control negativ nu a inhibat activitatea NFκB în celulele GEC-NFκB-luc la orice concentrație testată.

Neutralizarea secreției GM-CSF indusă de IL-33 din mastocite umane in vitro.

Se determină inhibarea eliberării GM-CSF indusă de IL-33 în mastocite umane prin tratamentul cu anticorpul 43. Mastocitele umane care exprimă în mod natural receptorul ST2 (IL1RL1) și co-receptorul său IL1RAP sunt diferențiate în cultură de celulele stem din sângele cordonului uman folosind StemSpan Medium (StemCell) și SCF / IL-6. În ziua testului, mastocitele sunt placate la 50.000 de celule în 50 ml / godeu în plăci de cultură tisulară cu 96 de godeuri în mediul de cultură. Celulele sunt tratate cu IL-33 în prezența sau absența anticorpilor. Pentru fiecare test, se adaugă 25 ml de anticorp exemplificat 4X

pe godeu în doză interval de la 0 la 30 nM. 25 ml de IL-33 uman 4X se adaugă la fiecare godeu la o concentrație finală 0,5 nM. Mediul de testare singur este utilizat ca un control fără tratament și un ST2 monomeric uman care este utilizat ca un control pozitiv la un interval de doză de la 0 la 30 nM. Anticorpul martor izotip testat la 30 nM este utilizat ca martor negativ. Testarea se face în trei exemplare. Plăcile cu 96 de godeuri sunt plasate în incubatorul de cultură tisulară (37°C, 95% umiditate relativă, 5% CO₂) timp de 16 ore. Se colectează 100 ml / godeu de supernatant pentru a măsura nivelurile GM-CSF prin ELISA comercială (sisteme de cercetare și dezvoltare).

Urmând procedurile descrise mai sus, anticorpul 43 a inhibat complet secreția GM-CSF indusă de IL33 umană din mastocite umane într-o manieră dependentă de doză, cu un IC₅₀ de 0,3 nM, care a fost mai mare decât receptorul solubil de control pozitiv IC₅₀ de 7,6 nM . Într-un alt experiment similar, anticorpul 54 a inhibat secreția GM-CSF indusă de IL33 umană de la mastocite umane cu un IC₅₀ de 0,265 nM și anticorpul 6 a inhibat secreția IL33 umană indusă de GM-CSF din mastocite umane cu un IC₅₀ de 0,811 nM. Anticorpul control izotip nu a inhibat secreția GM-CSF indusă de IL-33. Rezultatele sunt reprezentative pentru două experimente independente.

Inhibarea producției de IL-5 indusă de IL-33 in vivo.

Pentru a confirma neutralizarea IL-33 in vivo, pentru a determina dacă anticorpul 43 este capabil să neutralizeze funcția IL-33 umană și să inhibe producția de IL-5 de șoarece in vivo, șoarecii C57BL / 6 (n = 5) sunt injectați intraperitoneal cu 0,94 mg / kg, 0,282 mg / kg sau 0,094 mg / kg de anticorp sau cu un anticorp control izotip la 0,94 mg / kg. Într-o zi după injectare, șoarecii sunt provocați cu 0,025 mg / kg de IL-33 uman prin injecție intraperitoneală. Șase ore după provocarea IL-33 umană, șoarecii sunt sacrificați și serul este colectat. Serul este analizat pentru producerea IL-5 de șoarece folosind un ELISA comercial (sisteme R&D) conform instrucțiunilor producătorului.

Rezultatele au indicat faptul că Anticorpul 43 este capabil să inhibe complet producția de IL-5 de șoarece într-o manieră dependentă de doză. Nivelurile de IL-5 în serul de șoareci injectați cu 0,94 mg / kg, 0,282 mg / kg sau 0,094 mg / kg de anticorp exemplificat au fost 0,0360,004 ng / mL, 0,166660,036 ng / mL și 0,43060,095 ng / mL, respectiv. Anticorpul martor negativ nu inhibă producția umană de IL-5 indusă de IL-33 de șoarece. Aceste

date demonstrează că Anticorpul 43 inhibă producția de IL-5 de șoarece prin neutralizarea IL-33 umană în vivo.

Eficacitatea în vivo a unui anticorp IL-33 de șoarece surogat într-un model de inflamație a căilor respiratorii

Un anticorp surogat este dezvoltat pentru a neutraliza IL-33 de șoarece (mIL-33) pentru utilizare în modele de boală preclinică. Surogatul este un anticorp monoclonal IgG1 murin care neutralizează mIL-33 în teste in vitro. Capacitatea administrării sistemice a anticorpului anti-mIL-33 de a afecta răspunsul inflamator al căilor respiratorii la provocarea Alternaria este determinată in vivo. Șoarecii femele BALB / c (n = 5 per grup) sunt injectați subcutanat cu 25 mg / kg de anticorp anti-mIL-33 sau izotip martor în ziua 0. Șoarecele ST2-Fc, o formă solubilă a unuia dintre co-receptori IL-33 care poate neutraliza mIL-33 în teste in vitro (control pozitiv), este injectat la 12,5 mg / kg intraperitoneal în zilele 1 și 2, cu 30 de minute înainte de administrarea Alternaria. Extractul alternarian (50 mg în 20 ml PBS) se administrează intra-nazal fiecărui șoarece în zilele 1 și 2. Șoarecii sunt sacrificați în ziua 3 cu inhalare de CO₂ și sângele este colectat imediat prin puncție cardiacă pentru prepararea serului.

Fluidul de spălare alveolar bronșic (BAL) este preparat prin spălarea plămânilor cu 10 spălări (500 ml fiecare spălare) de injecție cu PBS și retragere printr-o canulă în traheea expusă a fiecărui șoarece. Lichidul BAL este centrifugat la 200g timp de 10 minute și supernatantul este îndepărtat și congelat. Celulele sunt resuspendate în 1 ml tampon ACK (Sigma) pentru a liza celulele roșii din sânge, sunt spălate și sunt resuspendate în 0,5 ml de PBS pentru numărare. Eozinofilele sunt numărate utilizând lichid de diluare a eozinofilului și colorare (ENG Scientific, Cat. ES-3101), iar celulele totale sunt numărate cu albastru de tripan. Fluidul BAL este testat folosind IL-5 de șoarece comercial și ELIT-uri 3 / YM1 (Chi3L3 / YM1) de tip chitinază 3 (sisteme R&D) și pentru expunerea la anticorpi. Rezultatele sunt prezentate mai jos în Tabelul 5.

Tabelul 5: Niveluri de IL-5 și Chi3L3 / YM1 și numărul de eozinofile și numărul total de celule din lichidul BAL.

Celule / citokine	Necontestat	Controlul isotipului	Anti-mIL-33	Controlul pozitiv
Eozinofile (# celule)	32000±13565	340000 ±70711	120000 ±51769	112000 ±57480
IL-5 (pg/mL)	2 ± 0	69.6 ± 27.31	2 ± 0	9.2 ± 2.248
Chi3L3/YM1 (ng/mL)	17.4 ± 2.064	108.6±28.7	27.4 ± 4.986	37.4 ± 6.313
Celule totale (# celule)	104000 ± 20396	408000 ±95833	144000 ±31241	152000 ±44989

Urmând procedurile esențiale descrise mai sus, provocarea *Alternaria* a crescut numărul de celule, în principal eozinofile, prezente în fluidul BAL. De asemenea, a indus producerea de citokine precum IL-5 și Chi3L3 / YM1. Administrarea sistemică a anticorpului anti-mIL-33 a redus semnificativ eozinofilul și infiltrarea totală a celulelor, măsurate prin numărul de celule BAL și a scăzut nivelul IL-5 și Chi3L3 / YM1 în fluidul BAL. Aceste rezultate demonstrează că inhibarea mIL-33 a redus markeri inflamatori multipli în acest model de inflamație a căilor respiratorii.

Cartografierea epitopului prin cristalografie cu raze X

Cristalografie cu raze X

O soluție de 10,6 mg / ml de complex hIL33: FAB este selectată pentru cristale utilizând ecrane personalizate și disponibile în comerț. Experimentele de difuzie a vaporilor sunt stabilite la 22 ° C sub formă de picături de cristalizare de 400 nL + 400 nL (soluție de proteină + godeu) cu soluție de godeu de 50 ml (0,2 M sulfat de amoniu și 30% greutate / volum polietilenglicol 8.000) într-un MRC2 (SWISSCI) așezat picătură pe placă. 20 mM acetat de magneziu este adăugat la proteină pentru a ajuta la cristalizare. Cristalele rezultate sunt congelate rapid în azot lichid după o scufundare rapidă în soluție de godeu care conține 20% etilenglicol adăugat ca agent criogen. Datele cu Raze X de difracție

sunt colectate folosind radiații sincrotron la LRL-CAT 31-ID (Advanced Photon Source, Argonne, IL). 180 de cadre sunt colectate la oscilație de 1° la o lungime de undă de 0,99731 Å și procesate cu pachete CCP41.

Cristalele aparțin grupului spațial P21212 cu dimensiuni unitare ale celulei $a = 70,1 \text{ Å}$ $b = 194,9 \text{ Å}$ $c = 46,5 \text{ Å}$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. O soluție de înlocuire moleculară a complexului hIL33: FAB este obținută cu Phaser2 utilizând modele de intrare din structura PDB 4KC3 și un model FAB generat cu instrumentul de modelare a anticorpilor MOE3 (v2014.9). Soluția de înlocuire moleculară conține 1 complex în unitatea asimetrică. Această soluție suferă ulterior mai multe runde de rafinament și construire de modele cu Buster4 și Coot5 obținând o structură finală cu Rwork de 17,8% și Rfree de 20,3% la 1,40 Å.

Epitopul hIL33 este mapat pentru structura cristalină de înaltă rezoluție a complexului hIL33: FAB utilizând instrumentul Protein Contacts din MOE3 (v2015.10). Instrumentul este utilizat pentru a evalua interacțiunile „distanță”, „covalentă”, „arenă”, „ionică” și „hbond”. Ieșirea pentru interacțiunile inter-lanț este distilată până la nivelul reziduurilor din Microsoft Excel pentru a identifica reziduurile epitop hIL33. Lista finală conține reziduuri hIL33 care se află la 4,5 Å de orice reziduu FAB.

Urmând procedura, în esență, așa cum este descrisă mai sus, un anticorp având aceleași CDR ca Anticorpul 75 contactează IL-33 uman la un epitop dat de următoarele reziduuri ale SEQ ID NR.: 19: Ser în poziția 23; Pro în poziția 24; Ile în poziția 25; Thr în poziția 26; Glu în poziția 27; Tyr în poziția 28; Leu în poziția 29; Tyr în poziția 69; Glu la poziția 71; Val la poziția 83; Asp la poziția 84; Lys în poziția 86; Leu în poziția 88; Leu în poziția 126; Asn la poziția 128; Intalnit la pozitia 129; Asn la poziția 132; Cys în poziția 133; Val la poziția 134; Glu la poziția 175; și Thr în poziția 176. Anticorpul 54 și anticorpul 43 contactează, de asemenea, un epitop substanțial similar pe IL-33 uman.

SEQențe

HC al anticorpului 75 (SEQ ID NR. 1)

EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
 GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLHGIRAAAYDA
 FIIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKR
 VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSLG

LC de anticorp 75 (SEQ ID NR. 2)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGINLSWYQQKPGQAPRLLIYGASHRAT
 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYSQSPPFTFGGGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

HCVR al anticorpului 75 (SEQ ID NR. 3)

EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
 GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLHGIRAAAYDA
 FIIWGQGTLVTVSS

HCVR al anticorpului 75 (SEQ ID NR. 4)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGINLSWYQQKPGQAPRLLIYGASHRAT
 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYSQSPPFTFGGGTKVEIK

LCVR al anticorpului 75 (ID SEQ NR. 5)

EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSFYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
 GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLHGIRAAAYDA

FIIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKR
 VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEV
 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
 QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

LC a anticorpului 54 (ID SEQ NR. 6)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGINLSWYQQKPGQAPRLLIYGASHRLT
 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYSQPPPFTFGGGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

HCVR al anticorpului 54 (ID SEQ NR. : 7)

EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSFYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
 GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLHGIRAAAYDA
 FIIWGQGTLVTVSS

LCVR al anticorpului 54 (SEQ ID NR. 8)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGINLSWYQQKPGQAPRLLIYGASHRLT
 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYSQPPPFTFGGGTKVEIK

HC al anticorpului 43 (SEQ ID NR. : 9)

EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSFYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
 GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIHGIRAAAYDA
 FIIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKR
 VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEV
 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSLG

LC de anticorp 43 (ID SEQ NR: 10)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGINLSWYQQKPGQAPRLLIYGASHRLT
 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYSQPPPFTFGGGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

HCVR al anticorpului 43 (SEQ ID NR: 11)

EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSFYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
 GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIHGIRAAAYDA
 FIIWGQGTLVTVSS

LCVR al anticorpului 43 (SEQ ID NR: 12)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGINLSWYQQKPGQAPRLLIYGASHRLT
 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYSQPPPFTFGGGTKVEIK

HCDR1 (SEQ ID NR. 13)

GFTFSXYAMS

În care X în poziția 6 este S sau F.

HCDR2 (SEQ ID NR. 14)

AISGSGGSTYYADSVKG

HCDR3 (SEQ ID NR. 15)

TXHGIRAAAYDAFII

În care X în poziția 2 este L sau I.

LCDR1 (SEQ ID NR. 16)

RASQSVGINLS

LCDR2 (ID SEQ NR. 17)

GASHRXT

În care X în poziția 6 este A sau L.

LCDR3 (SEQ ID NR. 18)

HQYSQXPPFT

În care X în poziția 6 este S sau P.

Aminoacizi IL-33 umani 95-270 (SEQ ID NR. 19)

AFGISGVQKYTRALHDSSITGISPITEYLASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVEDLKK
DEKKDKVLLSYYESQHPSNESGDGVDGKMLMVTLSPTKDFWLHANNKEHSVEL
HKCEKPLPDQAFFVLHNMHSNCVSFECKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDSSSENLC
T
ENILFKLSET

ADN care codifică HC din SEQ ID NR: 9 (SEQ ID NR: 20)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCTTTTATGCTATGAGCT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGG
TAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGATTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCT
CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGC
CGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACGATCCACGGTATACGCGCA
GCCTATGATGCTTTTATTATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTC
AGCTTCTACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCA
CCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
ACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACC
TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC
CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC
AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCC
CATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCCTG
TTCCCCC AAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
GTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG
TACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
CAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA
CTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCG
TCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCAC
AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACC ACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

ADN care codifică LC-ul SEQ ID NR: 10 (SEQ ID NR: 21)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCATCAACTTGTCTGCTGGT
ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCCAT
AGGCTAACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT
TCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGT
CATCAATATAGTCAACCACCTCCCTTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG
AGATCAAACGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
GAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA
TCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT
AACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC
CTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT
ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT
CAACAGGGGAGAGTGC

LISTA SEQUENȚELOR

<110> Eli Lilly and Company

<120> ANTICORPI ANTI-IL-33 ȘI UTILIZĂRI A acestora

<130> X21037

<150> US 62/414258

<151> 28-10-2016

<160> 21

<170> Brevet În versiunea 3.5

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<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					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

<210> 2

<211> 215

<212> PRT

<213> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<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> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<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> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<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> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<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	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> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<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> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<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> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<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> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<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> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<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> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<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> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<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> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa în poziția 6 este Ser sau Phe

<400> 13

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

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<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> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa în poziția 2 este Leu sau 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> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<400> 16

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

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa în poziția 6 este Ala sau Leu

<400> 17

Gly	Ala	Ser	His	Arg	Xaa	Thr
1				5		

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa în poziția 6 este Ser sau 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> ADN

<213> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<400> 20

```

gaggtgcagc tgggtggagac tggaggaggc ttgatccagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc ttttatgcta tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagattccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
cttcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaacgatc      300
cacggtatac gcgcagccta tgatgctttt attatctggg gccagggcac cctggtcacc      360
gtctcctcag cttctaccaa gggcccatcg gtcttcccgc tagcgccctg ctccaggagc      420
acctccgaga gcacagccgc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg      480
acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta      540
cagtccacag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc      600
acgaagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga      660
gttgagtcca aatatggtcc cccatgccc cctgcccag cacctgaggc cgccggggga      720
ccatcagtct tcctgttccc cccaaaacc aaggacactc tcatgatctc ccggaccctc      780

```

gaggtcacgt gcggtggtggt ggacgtgagc caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg	840
tacgtggatg gcggtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac	900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaacggcaag	960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaaggc ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc	1020
aaagccaaag ggcagccccg agagccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag	1080
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc	1140
gccgtggagt gggaaagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	1200
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg	1260
caggagggga atgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca	1320
cagaagagcc tctccctgtc tctgggt	1347

<210> 21

<211> 645

<212> ADN

<213> SEQență artificială

<220>

<223> Construcție sintetică

<400> 21

gaaatttgtg tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttggc atcaacttgt cctggtagca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatcccata ggctaactgg catcccagac	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag actggagcct	240
gaagattttg cagtgtatta ctgtcatcaa tatagtcaac cacctccctt cactttcggc	300
ggagggacca 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 cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc	645