

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035160**(13) **B9**

**(12) ИСПРАВЛЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К
ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(15) Информация об исправлении

Версия исправления: 1 (W1 B1)**исправления в описании: стр.18, 19**(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(48) Дата публикации исправления

2020.10.01, Бюллетень №10'2020

(45) Дата публикации и выдачи патента

2020.05.08

(21) Номер заявки

201492149

(22) Дата подачи заявки

2013.05.17

(54) АНТИТЕЛА К ST2 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **61/649,147; 61/792,619**(32) **2012.05.18; 2013.03.15**(33) **US**(43) **2015.03.31**(86) **PCT/US2013/041656**(87) **WO 2013/173761 2013.11.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ЭМДЖЕН ИНК. (US)(56) **US-A1-20100221257****US-A1-20100247545****US-A1-20100247442****US-A1-20090214559****US-A1-20110256635****US-A1-20050058639**

(72) Изобретатель:

Смит Дирк Е. (US), Фолтц Ян, Кинг**Чэдвик Т. (CA), Лим Ан Чин, Кларк****Рутилио, Комо Майкл Р., Кетчем****Рэндал Р., Си Дунхой, Минь Сяошань,****Ван Чжулунь (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к выделенному антителу к ST2, содержащему переменный домен легкой цепи, который содержит последовательность LCDR1, приведенную в SEQ ID NO: 107, последовательность LCDR2, приведенную в SEQ ID NO: 118, и последовательность LCDR3, приведенную в SEQ ID NO: 129, и переменный домен тяжелой цепи, который содержит последовательность HCDR1, приведенную в SEQ ID NO: 41, последовательность HCDR2, приведенную в SEQ ID NO: 52, и последовательность HCDR3, приведенную в SEQ ID NO: 63. Изобретение относится также к нуклеиновой кислоте, кодирующей указанное анти тело, вектору экспрессии, рекомбинантной клетке-хозяину, способу лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания и способу получения указанного анти тела.

B9**035160****035160****B9**

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 61/792619, поданной 15 марта 2013 г., и предварительной заявке на патент США № 61/649147, поданной 18 мая 2012 г., которые в полном объеме включены в данное описание посредством ссылки.

Ссылка на список последовательностей

Настоящая заявка подается вместе со Списком последовательностей в электронном формате через EFS-Web. Список последовательностей подан в виде текстового файла под названием A1712WOPCT_ST25.txt, созданного 17 мая 2013 г., размер которого составляет 189804 байт. Информация электронного формата Списка последовательностей в полном объеме включена в данное описание посредством ссылки.

Уровень техники изобретения

ST2 представляет собой связывающий рецептор для интерлейкина-33 (IL-33) - цитокина, родственного IL-1 и IL-18, также известного как NF-HEV или IL-1F11. ST2 экспрессируется как в виде растворимого несигнольного варианта (растворимый ST2 или sST2), так и в полноразмерной трансмембранной форме (FL ST2, ST2 или ST2L), которая опосредует клеточные ответы на IL-33. Последняя форма экспрессируется в широком диапазоне типов клеток и напрямую связана с патологическими воспалениями при большом количестве болезненных состояний. Она включает лимфоциты, в частности экспрессирующие IL-5 и IL-13 Т-хелперные клетки, натуральные клетки-киллеры (NK) и натуральные Т-киллеры (NKT), а также многие так называемые природные иммунные клетки, такие как тучные клетки, базофилы, эозинофилы, макрофаги и природные хелперные клетки (также известные как нуоциты (Neill, Wong et al. 2010)). Связывание IL-33 с ST2 на этих клетках приводит к накоплению широко экспрессируемого корецептора, известного как IL-1R акцессорный белок (AcP), и активации провоспалительных сигнальных путей, схожих с IL-1 и IL-18. Таким образом, IL-33 способен прямо активировать клетки, экспрессирующие ST2, или усиливать их активацию в присутствии других активационных стимулов. Примеры индуцированных IL-33 клеточных ответов включают выработку воспалительных цитокинов, таких как IL-5, IL-6, IL-13, TNF, IFN- γ и GM-CSF, а также выработку хемокинов, таких как CXCL8, CCL17 и CCL24. Также было показано, что IL-33 усиливает острые аллергические реакции посредством накопления тучных клеток и активации базофилов, инициируемых передачей сигнала рецептором IgE либо другими активаторами тучных клеток и базофилов. Также IL-33 увеличивает накопление, выживаемость и адгезивные свойства иммунных клеток, экспрессирующих ST2, и, таким образом, является важным компонентом, который вызывает и поддерживает клеточное воспаление в местных тканях.

Провоспалительное воздействие IL-33 на природные и адаптивные иммунные клетки приводит к возбуждению большого количества патологических процессов. В легких они включают воспаление дыхательных путей, образование слизи, гипервосприимчивость дыхательных путей и фиброзное ремоделирование. Также IL-33 может привести к местному воспалению в суставах, а также к кожной и суставной гиперноцицепции, посредством стимуляции выработки провоспалительных цитокинов (Verri, Guertero et al. 2008; Xu, Jiang et al. 2008). Избыток IL-33 связывают с патологическим отложением коллагена и фиброзом, также он приводит к повреждению эпителия при воспалительном заболевании кишечника. Вследствие своего сильного воздействия на базофилы и IgE-сенсibilизированные тучные клетки IL-33 также может вызывать анафилактический шок (Pushparaj, Tay et al. 2009) и может играть значительную роль при аллергических заболеваниях. Многие из этих заболеваний по своей природе являются хроническими и прогрессирующими и трудно поддаются лечению, соответственно существует потребность в более эффективных способах лечения.

Согласно документально подтвержденным данным по биологическому воздействию существует несколько свидетельств того, что каскад реакций IL-33/ST2 приводит к заболеваниям человека. Например, аномально высокую экспрессию IL-33 обнаруживают при заболеваниях, сопровождающихся воспалением слизистых оболочек и воспалением суставов. Такие заболевания включают астму (Prefontaine, Lajoie-Kadoch et al. 2009; Prefontaine, Nadigel et al. 2010), воспалительное заболевание кишечника (Beltran, Nunez et al. 2010; Pastorelli, Garg et al. 2010; Sponheim, Pollheimer et al. 2010) и ревматоидный артрит (Palmer, Talabot-Ayer et al. 2009; Matsuyama, Okazaki et al. 2010). Экспрессия IL-33 повышена в пораженной псориазом коже (Theoharides, Zhang et al. 2010) и коже пациентов с атопическим дерматитом (Pushparaj, Tay et al. 2009), а также увеличена при патологических случаях фиброза, таких как системная склеродермия (Yanaba, Yoshizaki et al. 2011) (Manetti, Ibba-Manneschi et al. 2009), и фиброзе печени (Marvie, Lisbonne et al. 2009). Также концентрация циркулирующего растворимого ST2 повышена во многих случаях заболеваний, что дополнительно указывает на связь между каскадом реакций данного цитокина и этими заболеваниями. Примеры включают астму (Kuroiwa, Arai et al. 2001; Oshikawa, Kuroiwa et al. 2001; Ali, Zhang et al. 2009), хроническое обструктивное заболевание легких (Hacker, Lambers et al. 2009), фиброз легких (Tajima, Oshikawa et al. 2003), сепсис и травмы (Brunner, Krenn et al. 2004), ВИЧ-инфекцию (Miyagaki, Sugaya et al. 2011), системную красную волчанку (Mok, Huang et al. 2010), воспалительное заболевание кишечника (Beltran, Nunez et al. 2010), а также ревматоидный артрит, склероз, гранулематоз Вегенера и болезнь Бехчета (Kuroiwa, Arai et al. 2001) и сердечно-сосудистые заболевания (Shah and Januzzi 2010). IL-33 усиливает эозинофильное воспаление, помимо этого существуют свидетельства того, что данный

каскад реакций имеет отношение к эозинофильным заболеваниям, таким как риносинусит и назальный полипоз (Plager, Kahl et al. 2010), а также эозинофильный бронхит (Oshikawa, Kuroiwa et al. 2001).

Дополнительные свидетельства, связывающие каскад реакций IL-33/ST2 с заболеваниями человека, предоставлены генетическими исследованиями, в которых было обнаружено наличие полиморфизма гена IL-33 и/или ST2 в общей популяции, которые в значительной степени связаны с повышенным риском заболевания или параметрами тяжести заболевания. В нескольких крупных общегеномных исследованиях генетическую вариацию в ST2 (IL1RL1) или IL-33 связывали с повышенным риском астмы (Gudbjartsson, Bjornsdottir et al. 2009; Moffatt, Gut et al. 2010; Wu, Romieu et al. 2010), а в других исследованиях на генетическом уровне данный каскад реакций связывали с повышенной степенью тяжести астмы (Ali, Zhang et al. 2009) и бронхиальной гиперчувствительностью (Reijmerink, Postma et al. 2008). Сходные исследования показали, что данный каскад реакций на генетическом уровне имеет отношение к аллергическим заболеваниям, таким как атопический дерматит (Shimizu, Matsuda et al. 2005), риносинусит (Sakashita, Yoshimoto et al. 2008; Castano R 2009), а также назальный полипоз (Buyschaert, Grulois et al. 2010).

В совокупности эти данные связаны с несколькими заболеваниями человека и способностью этого цитокина стимулировать многие формы опасных воспалительных процессов, что делает его подходящей мишенью для терапевтического вмешательства.

Сущность изобретения

В изобретении предложены анти-ST2 антигенсвязывающие белки, например антитела и их функциональные фрагменты, обладающие свойствами, подходящими для коммерческого производства и терапевтического применения для человека. В особенности применение анти-ST2 антигенсвязывающих белков целесообразно в способах лечения заболеваний и нарушений, связанных с системой IL-33/ST2. В данном описании предложены ST2-связывающие антитела, которые связывают ST2 с высокой аффинностью и эффективно блокируют связывание IL-33, тем самым снижая IL-33-опосредованную передачу сигнала в клетке.

В первом аспекте осуществления изобретение относится к выделенному антителу к ST2, содержащему варибельный домен легкой цепи, который содержит LCDR1, приведенную в SEQ ID NO: 107; последовательность LCDR2, приведенную в SEQ ID NO: 118; и последовательность LCDR3, приведенную в SEQ ID NO: 129; и варибельный домен тяжелой цепи, который содержит HCDR1, приведенную в SEQ ID NO: 41; последовательность HCDR2, приведенную в SEQ ID NO: 52; и последовательность HCDR3, приведенную в SEQ ID NO: 63.

Предпочтительные антитела в первом аспекте осуществления включают те, которые содержат варибельный домен легкой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 96, и варибельный домен тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 30; те, которые специфически связывают человеческий ST2 с аффинностью, меньшей или равной 1×10^{-10} М; те, которые подавляют связывание человеческого ST2 с человеческим IL-33; те, которые снижают IL-33-опосредованную передачу сигнала ST2 человека в экспрессирующих ST2 клетках человека; те, которые подавляют связывание ST2 яванского макака с IL-33 яванского макака; те, которые снижают IL-33-опосредованную передачу сигнала ST2 яванского макака в экспрессирующих ST2 клетках яванского макака; те, которые являются антителом человека; и те, которые содержат легкую цепь и тяжелую цепь, при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID: 85, а тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19.

Определенные аспекты изобретения относятся к выделенным антителам к ST2, связывающим ST2, содержащим аминокислоты 19-322 из SEQ ID NO: 1 в пределах аминокислот 33-44 или 88-94 из SEQ ID NO: 1, как определено при помощи анализа водородно-дейтериевого обмена. В частности, указанное антитело к ST2 связывается в пределах аминокислот 33-44 и 88-94 из SEQ ID NO: 1, как определено при помощи анализа водородно-дейтериевого обмена.

Во втором аспекте осуществления изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей варибельный домен легкой цепи антитела согласно изобретению.

В третьем аспекте осуществления изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей варибельный домен тяжелой цепи антитела согласно изобретению.

В четвертом аспекте осуществления изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей варибельный домен легкой цепи и варибельный домен тяжелой цепи антитела.

Предпочтительные варианты выделенных нуклеиновых кислот включают те, которые кодируют легкую цепь антитела; те, где легкая цепь кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 74; те, где легкая цепь кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 74; те, где легкая цепь кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 74; те, где легкая цепь кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74; те, где указанная нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь антитела; те, где тяжелая цепь кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей

нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 8; те, где тяжелая цепь кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 8; те, где тяжелая цепь кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 8; те, где тяжелая цепь кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8.

В пятом аспекте осуществления в изобретении предложен вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту согласно изобретению.

В шестом аспекте осуществления в изобретении предложена рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту согласно изобретению, функционально связанную с промотором для экспрессии легкой цепи, тяжелой цепи или легкой цепи и тяжелой цепи антитела согласно изобретению.

В седьмом аспекте осуществления изобретение относится к рекомбинантной клетке-хозяину, содержащей вектор экспрессии согласно изобретению.

Предпочтительными вариантами осуществления изобретения являются те клетки-хозяева, которые секретируют антитело, которое связывает ST2; те клетки-хозяева, которые происходят из организма млекопитающего; и те клетки-хозяева, которые принадлежат клеточной линии яичников китайского хомячка (CHO).

В восьмом аспекте осуществления в изобретении предложен способ лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела к ST2 согласно изобретению.

Предпочтительные варианты осуществления способа согласно изобретению включают те, где антитело содержит аминокислотную последовательность варибельного домена легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 96, и аминокислотную последовательность варибельного домена тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 30; те, где антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 85, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 19; те, где антитело подавляет связывание IL-33 с ST2; те, где аутоиммунным или воспалительным заболеванием является астма, атопический дерматит, хроническое обструктивное заболевание легких, фиброз легких, сепсис и травма, системная красная волчанка, воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит, склероз, гранулематоз Вегенера, болезнь Бехчета, сердечно-сосудистое заболевание, риносинусит, назальный полипоз или эозинофильный бронхит; те, где аутоиммунное или воспалительное заболевание представляет собой астму или хроническое обструктивное заболевание легких.

В девятом аспекте осуществления в изобретении предложен способ получения антитела к ST2, включающий а) культивирование рекомбинантной клетки-хозяина по изобретению и б) выделение антитела к ST2 из указанной культуры.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - обработка ST2 mAb приводит к значительному подавлению IL-33-индуцированного IL-5 в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF) мышей штаммов Balb/c и C57B1/6.

Фиг. 2 - обработка ST2 mAb является эффективной в индуцированной тараканьим аллергеном (CRA) модели астмы. У обработанных антителом к ST2 мышей наблюдали значительно меньшее количество эозинофилов BALF, чем у мышей изотипического контроля, обработанных Ig.

Фиг. 3 - подавление ST2 mAb IL-33-индуцированной выработки IL-5 человека из CD4⁺ Т-клеток, полученных от разных доноров. Линия (—) отображает значения для положительного контроля человеческого IL-33 в комбинации с человеческим IL-2 в отсутствие подавления. (····) отображает значения для положительного контроля человеческого IL-2. Линия (---) отображает значения для контроля среды.

Фиг. 4 - анализ зависимости доза-ответ для человеческого IL-33 в человеческих NK-клетках.

Фиг. 5 - снижение активности IL-33 вследствие воздействия Ab2, зарегистрированное при анализе человеческих NK-клеток, по сравнению с коммерчески доступными антителами к ST2. Клоны HB12, FB9 и 2A5 получили от международной корпорации MBL. Клон B4E6 получили от MD Biosciences. Клон 97203 получили от R&D Systems.

Фиг. 6 - расположение участков ST2, связанных Ab2, определенных при помощи HDX (см. пример 12). Участок, соответствующий аминокислотам 15-26 внеклеточного домена ST2, выделен красным, а участок, соответствующий аминокислотам 70-76 внеклеточного домена ST2, выделен фуксиновым.

Фиг. 7 - общая структура комплекса ST2/Ab2 sc-dsFv. На фигуре приведено изображение двух молекул Ab2 sc-dsFv с окрашенной соответственно в циановый/голубой или светло-желтый/золотистый парой легкая цепь (LC)/тяжелая цепь (HC). Две молекулы ST2 изображены в фуксиновом и зеленом цветах.

Фиг. 8. Область связывания. ST2 изображен в желтом цвете. Тяжелая цепь и легкая цепь Ab2 показаны в сером и пшеничном цветах. Петли CDR для тяжелой цепи и легкой цепи окрашены в следующем порядке: CDR1 - красным (HC) или светло-красным (LC); CDR2 - зеленым (HC) или светло-зеленым (LC)

и CDR3 - голубым (HC) или светло-голубым (LC).

Фиг. 9 - карта распределения электростатического поверхностного потенциала для ST2 и Ab2 sc-dsFv. Фиг. 9A - комплементарность заряда и поверхности для ST2 и Ab2 sc-dsFv. Область связывания обведена кругом. Фиг. 9B - левая часть: Ab2 (серый/пшеничный цвет) связывается с положительно заряженным участком на (поверхности) ST2; правая часть: ST2 (желтый цвет) связывается с кислотным участком (поверхности) Ab2 sc-dsFv. На карте распределения электростатического потенциала поверхность красного цвета соответствует отрицательному заряду, а поверхность голубого цвета соответствует положительному заряду.

Фиг. 10 - остатки в пределах вариабельных доменов Ab2, которые образуют область контакта с ST2 при связывании с антигеном. Участки CDR обведены. Остатки в пределах области контакта выделены жирным текстом. Остатки, которые образуют водородные связи или соляные мостики с аминокислотами в пределах ST2, выделены курсивом.

Подробное описание изобретения

Используемые в данном документе заголовки разделов приведены в целях структурирования и не ограничивают описываемого предмета изобретения. Все работы, перечисленные в данном описании, в полном объеме включены в документ посредством ссылки.

Для синтеза рекомбинантных ДНК и олигонуклеотидов, культивирования и трансформации тканей, очистки белка и т.д. можно использовать общепринятые методы. Ферментативные реакции и очистку можно проводить согласно инструкциям производителя или способами, являющимися общепринятыми в данной области техники или описанными в данном документе. Нижеприведенные процедуры и способы в общем случае можно осуществить согласно широкоизвестным в данной области техники стандартным методам, которые описаны во многих общих и более специализированных работах, которые перечислены и обсуждаются в описании изобретения (см., например, Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., которая включена в данное описание посредством ссылки для использования в любых целях). В случае если не приведены отдельные определения, терминология, а также лабораторные процедуры и методы аналитической химии, органической химии, медицинской и фармацевтической химии, которые описаны в данном описании, являются широкоизвестными и общеупотребимыми в данной области техники. Для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического получения, составления рецептуры, а также доставки препаратов и лечения пациентов можно использовать стандартные методы.

ST2.

Описанные в данном документе антигенсвязывающие белки связываются с ST2. ST2 экспрессируется как в виде растворимого несигнального варианта (растворимый ST2 или sST2), так и в полноразмерной трансмембранной форме (FL ST2, ST2 или ST2L). Пример аминокислотной последовательности человеческого ST2L приведен в табл. 1. Белок состоит из нескольких доменов: Аминокислоты 1-18 соответствуют лидерной последовательности, которая может отщепляться во время процессинга белка в клетках млекопитающих; аминокислоты 19-331 соответствуют внеклеточному домену; аминокислоты 332-350 соответствуют трансмембранному домену; а аминокислоты 351-556 соответствуют внутриклеточному домену. В предпочтительных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывается с внеклеточным доменом ST2L и предотвращает взаимодействие ST2 с IL-33. Пример аминокислотной последовательности человеческого IL-33 приведен в табл. 1.

Передача сигнала IL-33 осуществляется через гетеродимерный рецептор, содержащий ST2L и AcP. Пример аминокислотной последовательности человеческого AcP приведен в табл. 1. Этот белок также состоит из нескольких доменов: аминокислоты 1-20 соответствуют лидерной последовательности, которая может отщепляться во время процессинга белка в клетках млекопитающих; аминокислоты 21-367 соответствуют внеклеточному домену; аминокислоты 368-388 соответствуют трансмембранному домену; а аминокислоты 389-570 соответствуют внутриклеточному домену. В примерах, иллюстрирующих варианты осуществления, ST2-антигенсвязывающий белок связывает ST2L и препятствует IL-33-опосредованной передаче сигнала в клетках, экспрессирующих ST2L и AcP.

Таблица 1

Аминокислотная последовательность человеческого ST2 (SEQ ID NO:1)
MGFWILAILTILMYSTAAKFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQE RNRVFAFGQLLKFLPAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTV SGSEKNSKIYCPITIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNMVTEADAGDYTCKF IHNEGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKNANLTCACFGKGTQ FLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIOQEEGQNSFSNGLACLDMLVRIADVKEEDLLQYDCLA LNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSIYCI IAVCSVFLMLINVLVIILKMFWEATLLWRDIK PYKTRNDGKLYDAYVYPRNYKSSDASRVEHFVHQILPDVLENKCGYTLCIYGRDMLPG EDVVTAVETNIRKSRRIIFILTPQITHNKEFAYEQEVALHICALIQNDAKVILIEMEALSEL DMLQAEALQDSLQHLMKVQGTIKWREDHIANKRSLNSKFWKHVRYQMPVPSKIPRKASSLT PLAAQKQ
X = E или A
Аминокислотная последовательность человеческого АсР (SEQ ID NO:2)
MTLLWCVVSLYFYGILQSDASERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSTA HSAGLTLIWYWTRQDRDLEEFINFRLENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGNITCMLRNTTYC SKVAFPLEVYQKDSFCNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVGYPFSSVKPTITWYMGCYK IQNFNNVIEGMMNLSFLIALISNNGNYTCVVYPENGRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPV IHSNDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISHS RTEDETRTQILSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAGVEVAKAAVKQKVPAPRYTVELACGFGA TVLLVVLIVVYHVWLEMLFYRAHFGTDEITLDGKEYDIYVSYARNAEEEEFVLLTLRG VLENEFGYKLCIFDRDSLPGGIVTDETLSTFIQSRRLLVVLSPNYVLQGTQALLEKAGLE NMASSGNINVLVQYKAVKETVKELKRAKTVLTVIKWKEKSKYPQGRFWKQLQVAMPVK KSPRRSSDEQGLSYSSSLKNV
Аминокислотная последовательность человеческого IL-33 (SEQ ID NO:3)
MKPKMKYSTNKTAKWKNTASKALCFKLGKSQQKAKEVCPMYFMKLRSGLMIKKEACYFR RETTKRPSLKTGRKKHRLVLAACQQQSTVECFAGFISGVQKYTRALHDSSITGISPIITEY LASLSTYNDQSI TFALEDESIEIYVEDLKDKKDKVLLSYESQHPSNESGDGVDGKMLM VTLSPTKDFWLHANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNMHNSNCVSFECKTDPGVFIGVKD NHLALIKVDSSLENLCTENILFKLSET

В примерах, иллюстрирующих варианты осуществления настоящего изобретения, происходит высокоаффинное связывание как человеческого ST2, так и ST2 яванского макака, включая те случаи, когда происходит высокоаффинное связывание и блокируется взаимодействие IL-33 яванского макака с ST2 яванского макака. Эти характеристики обеспечивают информативное токсикологическое исследование на приматах, за исключением человека.

Пример аминокислотной последовательности ST2L яванского макака приведен в табл. 2. Данный белок состоит из нескольких доменов: аминокислоты 1-18 соответствуют лидерной последовательности, которая может отщепляться во время процессинга белка в клетках млекопитающих; аминокислоты 19-331 соответствуют внеклеточному домену; аминокислоты 332-350 соответствуют трансмембранному домену; а аминокислоты 351-556 соответствуют внутриклеточному домену.

Пример аминокислотной последовательности АсР яванского макака приведен в табл. 2. Этот белок состоит из нескольких доменов: аминокислоты 1-20 соответствуют лидерной последовательности, которая может отщепляться во время процессинга белка в клетках млекопитающих; аминокислоты 21-367 соответствуют внеклеточному домену; аминокислоты 368-388 соответствуют трансмембранному домену; а аминокислоты 389-570 соответствуют внутриклеточному домену.

Пример аминокислотной последовательности IL-33 яванского макака приведен в табл. 2.

Таблица 2

Аминокислотная последовательность ST2 яванского макака (SEQ ID NO:4)
MGLWILAILTILVYSTAAKFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKSSYIVDWYYSQTNKSIPTQE RNRVFAFGQLLKFLPAEVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQPCNVDPDYLMYSTV SGSEKNSKIYCPITIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYKAHKSFLVIDNMVTEADAGDYTCKF IHNEGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIRAPAHNETKEVEIGENTNLTCACFGKGAQ FLATVQWLQNGNKITDFGEPRIOQEEGQNSFSNGLACVNTVLRIDVKEEDLLRLYDCLA LNLHGLRRHTIRLSRKNPIDHQSTYCI IAVCSVLLMLINILVILKTFWIEATLLWRDIK PYKTRNDGKLYDAYVIYPRNYTSSADGASRVEYFVHQILPDVLENKCGYTLCIYGRDMLPG EDVVTAVETNIRKSRRIIFILTPQITHSEEFAYEQEVALHSALIQNDKSVILIEMEALSEL DMLQAEALQDSLRLHMEVQGTIKWREDHVANKRSLNSKFWKHVRYQMPVPSKMPRKASSLT SLAAQKQ
Аминокислотная последовательность АсР яванского макака (SEQ ID NO:5)
MTLLWCVVSLYFYGILQSDASERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSTA HSAGLTLIWYWTRQDRDLEEFINFRLENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGNITCMLRNTTYC SKVAFPLEVYQKDSFCNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVGYPFSSVKPTITWYMGCYK IQNFNNVIEGMMNLSFLIAFISNNGNYTCVVYPENGRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPV IHSNDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDIPIDVTINESISHS RTEDETRTQILSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAGVEVAKAATVKQKVPAPRYTVELACGFGA TVLLVVLIVVYHVWLEMLFYRAHFGTDEITLDGKEYDIYVSYARNAEEEEFVLLTLRG VLENEFGYKLCIFDRDSLPGGIVTDETLSTFIQSRRLLVVLSPNYVLQGTQALLEKAGLE NMASSGNINVLVQYKAVKETVKELKRAKTVLTVIKWKEKSKYPQGRFWKQLQVAMPVK KSPRRSSDEQGLSYSSSLKNV
Аминокислотная последовательность IL-33 яванского макака (SEQ ID NO:6)
MKPKMKYSTNKTAKRKNTASKALCFKLGKSQQKAKEVCHVYFMKLRSGLMIKKEACYFR RETTKRPSLKTGGKHGHLVLAACQQQSTVECFAGFISGVPKYTRALHDSSITGISPITES LASLSTYNDQSI TFALEDESIEIYVEDLKDKKDKVLLSYESQHPSSES GDGVDGKMLM VTLSPTKDFWLQANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNRSFNCVSFECKTDPGVFIGVKD NHLALIKVDHSENLSNENILFKLSEI

ST2-антигенсвязывающие белки.

В настоящем изобретении предложены антигенсвязывающие белки, которые специфически связывают ST2. Варианты осуществления антигенсвязывающих белков включают пептиды и/или полипептиды, которые специфически связывают ST2. Такие пептиды или полипептиды в некоторых случаях могут включать одну или более посттрансляционных модификаций. Варианты осуществления антигенсвязывающих белков включают антитела и их фрагменты согласно приведенным в данном описании определениям, которые специфически связывают ST2. Они включают антитела, которые специфически связывают человеческий ST2, включая те, которые подавляют связывание и/или активацию ST2 IL-33.

Антигенсвязывающие белки согласно изобретению специфически связываются с ST2. Употребляемое в данном описании выражение "специфически связывает" означает, что антигенсвязывающий белок среди других белков предпочтительно связывает ST2. В некоторых вариантах осуществления выражение "специфически связывает" означает, что ST2-антигенсвязывающий белок обладает более высокой аффинностью к ST2, чем к другим белкам. ST2-антигенсвязывающие белки, которые специфически связывают ST2, могут обладать аффинностью связывания к человеческому ST2, составляющей менее или равной 1×10^{-7} М, менее или равной 2×10^{-7} М, менее или равной 3×10^{-7} М, менее или равной 4×10^{-7} М, менее или равной 5×10^{-7} М, менее или равной 6×10^{-7} М, менее или равной 7×10^{-7} М, менее или равной 8×10^{-7} М, менее или равной 9×10^{-7} М, менее или равной 1×10^{-8} М, менее или равной 2×10^{-8} М, менее или равной 3×10^{-8} М, менее или равной 4×10^{-8} М, менее или равной 5×10^{-8} М, менее или равной 6×10^{-8} М, менее или равной 7×10^{-8} М, менее или равной 8×10^{-8} М, менее или равной 9×10^{-8} М, менее или равной 1×10^{-9} М, менее или равной 2×10^{-9} М, менее или равной 3×10^{-9} М, менее или равной 4×10^{-9} М, менее или равной 5×10^{-9} М, менее или равной 6×10^{-9} М, менее или равной 7×10^{-9} М, менее или равной 8×10^{-9} М, менее или равной 9×10^{-9} М, менее или равной 1×10^{-10} М, менее или равной 2×10^{-10} М, менее или равной 3×10^{-10} М, менее или равной 4×10^{-10} М, менее или равной 5×10^{-10} М, менее или равной 6×10^{-10} М, менее или равной 7×10^{-10} М, менее или равной 8×10^{-10} М, менее или равной 9×10^{-10} М, менее или равной 1×10^{-11} М, менее или равной 2×10^{-11} М, менее или равной 3×10^{-11} М, менее или равной 4×10^{-11} М, менее или равной 5×10^{-11} М, менее или равной 6×10^{-11} М, менее или равной 7×10^{-11} М, менее или равной 8×10^{-11} М, менее или равной 9×10^{-11} М, менее или равной 1×10^{-12} М, менее или равной 2×10^{-12} М, менее или равной 3×10^{-12} М, менее или равной 4×10^{-12} М, менее или равной 5×10^{-12} М, менее или равной 6×10^{-12} М, менее или равной 7×10^{-12} М, менее или равной 8×10^{-12} М или менее или равной 9×10^{-12} М.

Способы определения аффинности связывания антигенсвязывающего белка хорошо известны в данной области техники. Общеизвестные способы для определения аффинности включают поверхностный плазмонный резонанс (SPR) (Morton and Myska "Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors" *Methods in Enzymology* (1998) 295, 268-294), биослоевую интерферометрию (Abdiche et al "Determining Kinetics and Affinities of Protein Interactions Using a Parallel Real-time Label-free Biosensor, the Octet" *Analytical Biochemistry* (2008) 377, 209-217), кинетический эксклюзионный анализ (KinExA) (Darling and Brault "Kinetic exclusion assay technology: characterization of molecular interactions" *Assay and Drug Dev Tech* (2004) 2, 647-657), изотермическую калориметрию (Pierce et al "Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions" *Methods* (1999) 19, 213-221) и аналитическое ультрацентрифугирование (Lebowitz et al "Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review" *Protein Science* (2002), 11:2067-2079). Примеры таких способов приведены в примере 3.

Стоит понимать, что при отсылке в данном описании к различным вариантам осуществления ST2-антигенсвязывающих белков последние включают также ST2-связывающие фрагменты. ST2-связывающий фрагмент содержит любой из описанных в данном описании фрагментов или доменов антитела, который сохраняет способность специфически связываться с ST2. ST2-связывающий фрагмент может находиться в любой из описанных в данном описании каркасных структур.

В определенных терапевтических вариантах осуществления ST2-антигенсвязывающий белок подавляет связывание ST2 с IL-33 и/или подавляет одну или более биологических функций, ассоциированных со связыванием ST2 с IL-33, например IL-33-опосредованную передачу сигнала. Считается, что такие антигенсвязывающие белки являются "нейтрализующими". В определенных вариантах осуществления нейтрализующий ST2-антигенсвязывающий белок специфически связывает ST2 и подавляет связывание ST2 с IL-33 на величину от 10 до 100%, например по меньшей мере на примерно 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более. Например, можно исследовать нейтрализующую способность ST2-антигенсвязывающих белков путем определения способности антигенсвязывающего белка блокировать связывание IL-33 с ST2 или IL-33 с корецепторами ST2 и AcP, см., например, анализ блокирования IL-33, приведенный в примере 6. Альтернативно, можно исследовать нейтрализующую способность ST2-антигенсвязывающих белков методом, в котором определяется эффект от присутствия ST2-антигенсвязывающего белка в анализе, определяющем IL-33-опосредованную биологическую функцию. Например, способность IL-33 индуцировать биологический ответ, такой как внутриклеточная передача сигнала или повышенная экспрессия медиаторов мРНК либо секреция медиаторов,

таких как цитокины и хемокины из клеток, таких как эозинофилы, базофилы, Т-клетки, тучные клетки, НК-клетки, NKT-клетки, нейтрофилы или природные хелперные клетки. Альтернативно, способность IL-33 стимулировать дифференциацию, пролиферацию, выживаемость, хемотаксис, изменение формы или адгезивных свойств клеток, таких как эозинофилы, базофилы, Т-клетки, тучные клетки, НК-клетки, NKT-клетки, нейтрофилы или природные хелперные клетки. Альтернативно, способность IL-33 индуцировать поверхностную экспрессию определенных маркеров клеточной активации, таких как CD11b, на клетках, таких как эозинофилы, базофилы, Т-клетки, тучные клетки, НК-клетки, NKT-клетки, нейтрофилы или природные хелперные клетки. Примеры таких способов приведены в примерах 7-10.

Варианты осуществления антигенсвязывающих белков включают каркасные структуры согласно приведенным в данном описании определениям с одним или более определяющими комплементарность участками (CDR). Варианты осуществления дополнительно включают антигенсвязывающие белки, содержащие каркасную структуру с одним или более переменными доменами антитела, как тяжелой цепи, так и легкой цепи. Варианты осуществления включают антитела, которые содержат переменный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из переменного домена легкой цепи (LCv) Ab1, Ab2 LCv, Ab3 LCv, Ab4 LCv, Ab5 LCv, Ab6 LCv, Ab7 LCv, Ab8 LCv, Ab9 LCv, Ab10 LCv, Ab11 LCv, Ab30 LCv, Ab32 LCv и Ab33 LCv (SEQ ID NO: 95-105, 163-165 соответственно), и/или переменный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из переменного домена тяжелой цепи (HCv) Ab1, Ab2 HCv, Ab3 HCv, Ab4 HCv, Ab5 HCv, Ab6 HCv, Ab7 HCv, Ab8 HCv, Ab9 HCv, Ab10 HCv, Ab11 HCv, Ab30 HCv, Ab32 HCv и Ab33 HCv (SEQ ID NO: 29-39, 145-147 соответственно), а также их фрагменты, производные, мутеины и варианты.

Примером легкой цепи, содержащей Ab1 LCv, является легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84.

Примером легкой цепи, содержащей Ab2 LCv, является легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85.

Примером легкой цепи, содержащей Ab3 LCv, является легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86.

Примером легкой цепи, содержащей Ab4 LCv, является легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87.

Примером легкой цепи, содержащей Ab5 LCv, является легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88.

Примером легкой цепи, содержащей Ab6 LCv, является легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89.

Примером легкой цепи, содержащей Ab7 LCv, является легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90.

Примером легкой цепи, содержащей Ab8 LCv, является легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 91.

Примером легкой цепи, содержащей Ab9 LCv, является легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92.

Примером легкой цепи, содержащей Ab10 LCv, является легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93.

Примером легкой цепи, содержащей Ab11 LCv, является легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94.

Примером легкой цепи, содержащей Ab30 LCv, является легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 160.

Примером легкой цепи, содержащей Ab32 LCv, является легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 161.

Примером легкой цепи, содержащей Ab33 LCv, является легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 162.

Примером тяжелой цепи, содержащей Ab1 HCv, является тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18.

Примером тяжелой цепи, содержащей Ab2 HCv, является тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19.

Примером тяжелой цепи, содержащей Ab3 HCv, является тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20.

Примером тяжелой цепи, содержащей Ab4 HCv, является тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21.

Примером тяжелой цепи, содержащей Ab5 HCv, является тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22.

Примером тяжелой цепи, содержащей Ab6 HCv, является тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23.

Примером тяжелой цепи, содержащей Ab7 HCv, является тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24.

Примером тяжелой цепи, содержащей Ab8 HCv, является тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25.

Примером тяжелой цепи, содержащей Ab9 HCv, является тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 26.

Примером тяжелой цепи, содержащей Ab10 HCv, является тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 27.

Примером тяжелой цепи, содержащей Ab11 HCv, является тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28.

Примером тяжелой цепи, содержащей Ab30 HCv, является тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 142.

Примером тяжелой цепи, содержащей Ab32 HCv, является тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 143.

Примером тяжелой цепи, содержащей Ab33 HCv, является тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 144.

Дополнительные примеры предусмотренных каркасных структур включают фибронектин, неокарциностагин CBM4-2, липокалина, рецепторы Т-клеток, домен протеина-А (протеин Z), Im9, TPR белки, цинкпальцевые домены, рVIII, птичий панкреатический полипептид, GCN4, домен WW, домен Src-гомологии 3, домены PDZ, TEM1 бета-лактамазу, тиоредоксин, стафилококковую нуклеазу, PHD-пальцевые домены, CL-2, BPTI, APPI, HPSTI, экотин, LACI-D1, LDTI, MTI-II, токсины скорпиона, пептид дефензин-А насекомых, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, цитохром b-562, домены рецептора Ld1, гамма-кристаллин, убиквитин, трансферрин и/или лектин-подобные домены С-типа. Обзор каркасных структур, не принадлежащих к антителам, а также их применения в качестве терапевтических средств, приведены в Gebauer and Skerra, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13:245-255 (2009) и Binz et al., *Nat. Biotech.*, 23 (10) :1257-1268 (2005), которые в полном объеме включены в данное описание посредством ссылки.

В аспекты осуществления данного изобретения включены антитела, содержащие следующие вариабельные домены: Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO: 95/SEQ ID NO: 29), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO: 96/SEQ ID NO: 30), Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO: 97/SEQ ID NO: 31), Ab4 LCv/Ab4 HCv (SEQ ID NO: 98/SEQ ID NO: 32), Ab5 LCv/Ab5 HCv (SEQ ID NO: 99/SEQ ID NO: 33), Ab6 LCv/Ab6 HCv (SEQ ID NO: 100/SEQ ID NO: 34), Ab7 LCv/Ab7 HCv (SEQ ID NO: 101/SEQ ID NO: 35), Ab8 LCv/Ab8 HCv (SEQ ID NO: 102/SEQ ID NO: 36), Ab9 LCv/Ab9 HCv (SEQ ID NO: 103/SEQ ID NO: 37), Ab10 LCv/Ab10 HCv (SEQ ID NO: 104/SEQ ID NO: 38), Ab11 LCv/Ab11 HCv (SEQ ID NO: 105/SEQ ID NO: 39), Ab30 LCv/Ab30 HCv (SEQ ID NO: 163/SEQ ID NO: 145), Ab32 LCv/Ab32 HCv (SEQ ID NO: 164/SEQ ID NO: 146), Ab33 LCv/Ab33 HCv (SEQ ID NO: 165/SEQ ID NO: 147) и их комбинации, а также их фрагменты, производные, мутеины и варианты.

Примеры антител согласно изобретению включают Ab1 (SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 18), Ab2 (SEQ ID NO: 85/SEQ ID NO: 19), Ab3 (SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 20), Ab4 (SEQ ID NO: 87/SEQ ID NO: 21), Ab5 (SEQ ID NO: 88/SEQ ID NO: 22), Ab6 (SEQ ID NO: 89/SEQ ID NO: 23), Ab7 (SEQ ID NO: 90/SEQ ID NO: 24), Ab8 (SEQ ID NO: 91/SEQ ID NO: 25), Ab9 (SEQ ID NO: 92/SEQ ID NO: 26), Ab10 (SEQ ID NO: 93/SEQ ID NO: 27), Ab11 (SEQ ID NO: 94/SEQ ID NO: 28), Ab30 (SEQ ID NO: 160/SEQ ID NO: 142), Ab32 (SEQ ID NO: 161/SEQ ID NO: 143) и Ab33 (SEQ ID NO: 162/SEQ ID NO: 144).

Как правило, каждый вариабельный домен легкой или тяжелой цепи антитела содержит три CDR. Вариабельный домен тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3). Вариабельный домен легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3). В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит один или более CDR, находящихся в пределах описанных в данном описании предпочтительных вариабельных доменов.

Примеры CDR включают, но не ограничиваются этим:

CDR, принадлежащие Ab1 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 106), LCDR2 (SEQ ID NO: 117) и LCDR3 (SEQ ID NO: 128);

CDR, принадлежащие Ab2 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 107), LCDR2 (SEQ ID NO: 118) и LCDR3 (SEQ ID NO: 129);

CDR, принадлежащие Ab3 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 108), LCDR2 (SEQ ID NO: 119) и LCDR3 (SEQ ID NO: 130);

CDR, принадлежащие Ab4 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 109), LCDR2 (SEQ ID NO: 120) и LCDR3 (SEQ ID NO: 131);

CDR, принадлежащие Ab5 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 110), LCDR2 (SEQ ID NO: 121) и LCDR3 (SEQ ID NO: 132);

CDR, принадлежащие Ab6 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 111), LCDR2 (SEQ ID NO: 122) и LCDR3 (SEQ ID NO: 133);

CDR, принадлежащие Ab7 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 112), LCDR2 (SEQ ID NO: 123) и LCDR3 (SEQ ID NO: 134);

CDR, принадлежащие Ab8 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 113), LCDR2 (SEQ ID NO: 124) и LCDR3

(SEQ ID NO: 135);

CDR, принадлежащие Ab9 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 114), LCDR2 (SEQ ID NO: 125) и LCDR3 (SEQ ID NO: 136);

CDR, принадлежащие Ab10 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 115), LCDR2 (SEQ ID NO: 126) и LCDR3 (SEQ ID NO: 137);

CDR, принадлежащие Ab11 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 116), LCDR2 (SEQ ID NO: 127) и LCDR3 (SEQ ID NO: 138);

CDR, принадлежащие Ab30 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 166), LCDR2 (SEQ ID NO: 169) и LCDR3 (SEQ ID NO: 172);

CDR, принадлежащие Ab32 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 167), LCDR2 (SEQ ID NO: 170) и LCDR3 (SEQ ID NO: 173);

CDR, принадлежащие Ab33 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO: 168), LCDR2 (SEQ ID NO: 171) и LCDR3 (SEQ ID NO: 174);

CDR, принадлежащие Ab1 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 40), HCDR2 (SEQ ID NO: 51) и HCDR3 (SEQ ID NO: 62);

CDR, принадлежащие Ab2 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 41), HCDR2 (SEQ ID NO: 52) и HCDR3 (SEQ ID NO: 63);

CDR, принадлежащие Ab3 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 42), HCDR2 (SEQ ID NO: 53) и HCDR3 (SEQ ID NO: 64);

CDR, принадлежащие Ab4 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 43), HCDR2 (SEQ ID NO: 54) и HCDR3 (SEQ ID NO: 65);

CDR, принадлежащие Ab5 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 44), HCDR2 (SEQ ID NO: 55) и HCDR3 (SEQ ID NO: 66);

CDR, принадлежащие Ab6 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 45), HCDR2 (SEQ ID NO: 56) и HCDR3 (SEQ ID NO: 67);

CDR, принадлежащие Ab7 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 46), HCDR2 (SEQ ID NO: 57) и HCDR3 (SEQ ID NO: 68);

CDR, принадлежащие Ab8 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 47), HCDR2 (SEQ ID NO: 58) и HCDR3 (SEQ ID NO: 69);

CDR, принадлежащие Ab9 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 48), HCDR2 (SEQ ID NO: 59) и HCDR3 (SEQ ID NO: 70);

CDR, принадлежащие Ab10 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 49), HCDR2 (SEQ ID NO: 60) и HCDR3 (SEQ ID NO: 71);

CDR, принадлежащие Ab11 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 50), HCDR2 (SEQ ID NO: 61) и HCDR3 (SEQ ID NO: 72);

CDR, принадлежащие Ab30 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 148), HCDR2 (SEQ ID NO: 151) и HCDR3 (SEQ ID NO: 154);

CDR, принадлежащие Ab32 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 149), HCDR2 (SEQ ID NO: 152) и HCDR3 (SEQ ID NO: 155); и

CDR, принадлежащие Ab33 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO: 150), HCDR2 (SEQ ID NO: 153) и HCDR3 (SEQ ID NO: 156).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит А) полипептид, например легкую цепь, которая содержит LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167 и 168; LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170 и 171; и/или LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173 и 174; и/или В) полипептид, например тяжелую цепь, которая содержит HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149 и 150; HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152 и 153; и/или HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155 и 156.

В дополнительных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит А) аминокислотную последовательность легкой цепи, которая содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, принадлежащие любому из Ab1 LCv, Ab2 LCv, Ab3 LCv, Ab4 LCv, Ab5 LCv, Ab6 LCv, Ab7 LCv, Ab8 LCv, Ab9 LCv, Ab10 LCv, Ab11 LCv, Ab30 LCv, Ab32 LCv и Ab33 LCv, и В) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, принадлежащие любому из Ab1 HCv, Ab2 HCv, Ab3 HCv, Ab4 HCv, Ab5 HCv, Ab6 HCv, Ab7 HCv, Ab8 HCv, Ab9 HCv, Ab10 HCv, Ab11 HCv, Ab30 HCv, Ab32 HCv и Ab33 HCv.

В определенных вариантах осуществления CDR содержат не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти или не более шести аминокислотных вставок, делеций или замен

относительно приведенного в данном описании в качестве примера CDR.

В аспекты осуществления данного изобретения включены антитела, содержащие переменный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 и 165. В аспекты осуществления данного изобретения включены антитела, содержащие переменный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 и 147. В дополнительные аспекты осуществления данного изобретения включены антитела, содержащие А) переменный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 и 165, и В) переменный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 и 147.

Антитела согласно изобретению могут содержать любую известную в данной области техники константную область. Константной областью легкой цепи может являться, например, константная область легкой цепи каппа- или ламбда-типа, например человеческая константная область легкой цепи каппа-или ламбда-типа. Константной областью тяжелой цепи может являться, например, константная область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа, например, человеческая константная область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа. В одном варианте осуществления константной областью легкой или тяжелой цепи является фрагмент, производное, вариант или мутант константной области природного происхождения.

В аспекты осуществления данного изобретения включены антитела, содержащие переменный участок легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 и 165, содержащий не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти, не более шести, не более семи, не более восьми, не более девяти или не более десяти аминокислотных вставок, делеций или замен. В аспекты осуществления данного изобретения включены антитела, содержащие переменный участок тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 и 147, содержащий не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти, не более шести, не более семи, не более восьми, не более девяти или не более десяти аминокислотных вставок, делеций или замен. В дополнительные аспекты осуществления данного изобретения включены антитела, содержащие А) переменный участок легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 и 165, содержащий не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти, не более шести, не более семи, не более восьми, не более девяти или не более десяти аминокислотных вставок, делеций или замен, и В) переменный участок тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 и 147, содержащий не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти, не более шести, не более семи, не более восьми, не более девяти или не более десяти аминокислотных вставок, делеций или замен.

В одном из вариантов реализации антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 и 165. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 и 147. В дополнительном варианте осуществления антигенсвязывающий белок содержит А) аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164 и 165, и В) аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по

меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146 и 147.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит CDR3 легкой цепи и/или тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173, 174, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155 и 156. В определенных вариантах осуществления данная аминокислотная последовательность содержит не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти или не более шести аминокислотных вставок, делеций или замен относительно примерной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173, 174, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155 и 156. Таким образом, варианты осуществления данного изобретения включают антигенсвязывающий белок, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173, 174, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155 и 156.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит CDR2 легкой цепи и/или тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170, 171, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152 и 153. В определенных вариантах осуществления данная аминокислотная последовательность содержит не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти или не более шести аминокислотных вставок, делеций или замен относительно примерной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170, 171, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152 и 153. Таким образом, варианты осуществления данного изобретения включают антигенсвязывающий белок, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170, 171, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152 и 153.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит CDR1 легкой цепи и/или тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167, 168, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149 и 150. В определенных вариантах осуществления данная аминокислотная последовательность содержит не более одной, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти или не более шести аминокислотных вставок, делеций или замен относительно примерной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167, 168, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149 и 150. Таким образом, варианты осуществления данного изобретения включают антигенсвязывающий белок, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167, 168, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149 и 150.

Антигенсвязывающие белки согласно изобретению содержат каркасные структуры традиционных антител, включая человеческие и моноклональные антитела, биспецифические антитела, диатела, мини-

тела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые "миметиками антител")/химерные антитела, слитые антитела (иногда называемые "конъюгатами антител") и фрагменты каждого из перечисленных элементов. Вышеописанные CDR, включая различные комбинации CDR, могут быть привиты в любую из следующих каркасных структур.

Употребляемый в данном описании термин "антитело" относится к различным формам мономерных или мультимерных белков, содержащих одну или более полипептидных цепей, которые специфически связываются с антигеном согласно приведенным в тексте описаниям. В определенных вариантах осуществления антитела получают при помощи рекомбинантных ДНК-технологий. В дополнительных вариантах осуществления антитела получают при помощи ферментативного или химического расщепления антител природного происхождения. В другом аспекте осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из а) человеческого антитела; б) гуманизированного антитела; в) химерного антитела; г) моноклонального антитела; е) поликлонального антитела; ф) рекомбинантного антитела; г) антигенсвязывающего фрагмента; h) одноцепочечного антитела; i) диатела; j) триатела, k) тетраатела, l) фрагмента Fab; m) фрагмента F(ab')₂, n) антитела IgA, o) антитела IgD, p) антитела IgE, q) антитела IgG1, r) антитела IgG2, s) антитела IgG3, t) антитела IgG4 и u) антитела IgM.

Вариабельный участок или домен содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепей, заключенные в пределах каркасной области (каркасные области обозначают как FR1, FR2, FR3 и FR4) (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD). Структурные единицы традиционного антитела, как правило, содержат тетрамер. Каждый тетрамер обычно состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара содержит одну "легкую" и одну "тяжелую" цепь. Аминотерминальная часть каждой цепи содержит вариабельный участок длиной от примерно 100 до 110 или более аминокислот, отвечающий главным образом за распознавание антигена. Карбокситерминальная часть каждой цепи определяет константную область, отвечающую главным образом за эффекторную функцию. Человеческие легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда легкие цепи. Тяжелые цепи классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и именно они определяют изотип антитела, соответственно как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. IgG имеет несколько подклассов, включая, но не ограничиваясь этим, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включая, но не ограничиваясь этим, IgM1 и IgM2. Варианты осуществления изобретения включают все подобные классы и подклассы антител, которые содержат вариабельный домен или CDR антигенсвязывающих белков, как описано в данном описании.

Некоторые антитела природного происхождения, такие как обнаруживаемые у верблюдов и лам, представляют собой димеры, состоящие из двух тяжелых цепей и не содержащие легких цепей. В данное изобретение включены димерные антитела, состоящие из двух тяжелых цепей, или их фрагменты, которые могут связываться с ST2.

Как правило, вариабельные участки тяжелой и легкой цепей обладают одинаковой общей структурой консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными участками, т.е. определяющими комплементарность участками, или CDR. CDR главным образом отвечают за распознавание и связывание антигена. CDR из двух цепей каждой пары выравниваются посредством каркасных областей, что обеспечивает возможность связывания со специфическим эпитопом. От N-конца до C-конца и легкая и тяжелая цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Отнесение аминокислот к каждому из доменов проводят согласно определениям Kabat.

CDR определяют основные поверхностные точки контакта для связывания антигена. CDR3 легкой цепи и в особенности CDR3 тяжелой цепи определяют наиболее важные детерминанты для связывания антигена в пределах вариабельных участков легкой и тяжелой цепей. Для некоторых антител CDR3 тяжелой цепи может определять основную область контакта между антигеном и антителом. Схемы *in vitro* отбора, в которых варьируется только CDR3, можно использовать для изменения связывающих свойств антитела или для определения, какие остатки являются важными для связывания антигена.

Как правило, антитела природного происхождения содержат сигнальную последовательность, которая способствует участию антитела в клеточном пути, связанном с секрецией белка, и которая обычно не присутствует в зрелом антителе. Полинуклеотид, кодирующий антитело согласно изобретению, может кодировать сигнальную последовательность природного происхождения либо гетерологичную сигнальную последовательность, как описано ниже.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, содержащее от одного до шести CDR, приведенных в качестве примеров, как описано в данном описании. Антитела согласно изобретению могут принадлежать любому типу, включая антитела IgM, IgG (включая IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgD, IgA или IgE. В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой антитело типа IgG, например антитело IgG1.

В некоторых вариантах осуществления, например, когда антигенсвязывающий белок представляет собой антитело с полноразмерными тяжелой и легкой цепями, все CDR принадлежат одному виду, например человеку. Альтернативно, например в вариантах осуществления, в которых антигенсвязывающий белок содержит менее шести CDR из приведенных выше последовательностей, дополнительные CDR могут принадлежать как к другим видам, так и являться человеческими CDR, отличными от тех, которые

приведены в примерных последовательностях. Например, участки HCDR3 и LCDR3 из определенных в данном описании соответствующих последовательностей можно использовать с HCDR1, HCDR2, LCDR1 и LCDR2, необязательно выбранными из принадлежащих другим видам или различных человеческих последовательностей антител либо их комбинаций. Например, CDR согласно изобретению можно замещать участки CDR имеющих коммерческую ценность химерных или гуманизированных антител.

В конкретных вариантах осуществления применяют каркасные компоненты антигенсвязывающих белков, которые являются компонентами человеческого происхождения. При этом в некоторых вариантах осуществления каркасные компоненты могут представлять собой смесь компонентов от разных видов. В таком случае, если антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, такое антитело может являться химерным антителом и/или гуманизированным антителом. В общем случае как "химерные антитела", так и "гуманизированные антитела" относятся к антителам, в которых объединены участки, принадлежащие более чем одному виду. Например, "химерные антитела" обычно содержат переменный участок(-и), принадлежащий мыши (или, в некоторых случаях, крысе), и константную область(-и), принадлежащую человеку.

"Гуманизированные антитела", как правило, относятся к антителам нечеловеческого происхождения, в которых каркасные области переменного домена были заменены последовательностями из антител человека. В общем случае в гуманизированном антителе все антитело, за исключением одного или более CDR, кодируется полинуклеотидом человеческого происхождения либо является идентичным такому антителу, за исключением одного или более CDR. CDR, некоторые или все из которых кодируются нуклеиновыми кислотами, принадлежащими организму нечеловеческого происхождения, прививают в каркас складчатого бета-слоя переменного участка человеческого антитела, чтобы получить антитело, специфичность которого определяется привитыми CDR. Получение подобных антител описано, например, в WO 92/11018, Jones 1986, Nature 321:522-525, Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-1536. Также гуманизированные антитела можно получить, используя мышей с и сконструированной методами генной инженерии иммунной системой. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. В описанных в данном описании примерных вариантах осуществления идентифицированные CDR являются человеческими, и следовательно, в данном контексте как гуманизированные, так и химерные антитела содержат некоторое количество CDR нечеловеческого происхождения; например могут быть получены гуманизированные антитела, содержащие участки HCDR3 и LCDR3, при этом один или более других участков CDR принадлежат другому виду.

В одном варианте осуществления ST2-антигенсвязывающий белок представляет собой мультиспецифическое антитело и, в частности, биспецифическое антитело, иногда также называемое "диателом". Это такие антитела, которые связываются с двумя или более различными антигенами или различными эпитопами на одном антигене. В определенных вариантах осуществления биспецифическое антитело связывает ST2 и антиген на человеческой эффекторной клетке (например, Т-клетке). Такие антитела полезны при нацеливании на ответ эффекторных клеток против экспрессирующих ST2 клеток, таких как экспрессирующие ST2 опухолевые клетки. В предпочтительных вариантах осуществления человеческим антигеном эффекторной клетки является CD3 (патент США № 7235641). Способы получения специфических антител известны в данной области техники. Один из таких способов включает конструирование Fc-фрагмента тяжелых цепей таким образом, чтобы создать "выпуклости" и "впадины", которые способствуют образованию гетеродимеров из тяжелых цепей при их совместной экспрессии в клетке (США № 7695963). Другой способ также включает конструирование Fc-фрагмента тяжелой цепи, но при этом использует электростатическое взаимодействие для стимуляции образования гетеродимеров, в то же время подавляя образование гомодимеров тяжелых цепей при их совместной экспрессии в клетке (WO 09/089,004, которая в полном объеме включена в данное описание посредством ссылки).

В одном варианте осуществления ST2-антигенсвязывающий белок представляет собой мини-тело. Мини-тела являются минимизированными антителоподобными белками, содержащими scFv, соединенный с доменом CH3 (Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061).

В одном варианте осуществления ST2-антигенсвязывающий белок представляет собой доменное антитело (см., например, патент США № 6248516). Доменные антитела (dAb) представляют собой функциональные связывающие домены антител, соответствующие переменным участкам тяжелой (VH) или легкой (VL) цепей человеческих антител. dAb имеют молекулярную массу приблизительно 13 кДа либо менее одной десятой от массы полноразмерного антитела. dAb хорошо экспрессируются в большом количестве организмов-хозяев, включая клеточные системы бактерий, дрожжей и млекопитающих. Вдобавок, dAb являются высокостабильными и сохраняют активность даже в жестких условиях, таких как при лиофилизации или тепловой денатурации (см., например, патенты США №№ 6291158; 6582915; 6593081; 6172197; заявку на патент США № 2004/0110941; Европейский патент № 0368684; патент США № 6696245, WO 04/058821, WO 04/003019 и WO 03/002609).

В одном варианте осуществления ST2-антигенсвязывающий белок представляет собой фрагмент антитела, который является фрагментом любого из приведенных в данном описании антител, который сохраняет специфичность связывания с ST2. В разных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки содержат без ограничений фрагменты F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv или одноцепочечного Fv. Как мини-

мум антитело согласно данному описанию содержит полипептид, который может специфически связываться с ST2, содержащий полностью либо частично переменный домен легкой или тяжелой цепи, например один или более CDR.

Дополнительные примеры фрагментов ST2-связывающего антитела включают, но не ограничиваясь этим, (i) фрагмент Fab, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, (ii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1, (iii) фрагмент Fv, состоящий из VL и VH доменов одного антитела; (iv) фрагмент dAb (Ward et al., 1989, *Nature* 341:544-546), который состоит из одиночного переменного домена, (v) выделенные участки CDR, (vi) фрагмент F(ab')₂ - бивалентный фрагмент, содержащий два связанных фрагмента Fab, (vii) одноцепочечные молекулы Fv (scFv), в которых домен VH и домен VL соединены пептидным линкером, который делает возможной ассоциацию двух доменов для образования антигенсвязывающего участка (Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426, Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883), (viii) биспецифические одноцепочечные димеры Fv (PCT/US92/09965) и (ix) "диатела" или "триатела" - мультивалентные или мультиспецифические фрагменты, сконструированные путем генного слияния (Tomlinson et al., 2000, *Methods Enzymol.* 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448). Фрагменты антител можно модифицировать. Например, молекулы можно стабилизировать путем внедрения дисульфидных мостиков, соединяющих домены VH и VL (Reiter et al., 1996, *Nature Biotech.* 14:1239-1245). Аспекты данного изобретения включают те варианты осуществления, в которых компоненты этих фрагментов, не принадлежащие CDR, являются человеческими последовательностями.

В одном варианте осуществления ST2-антигенсвязывающий белок представляет собой полностью человеческое антитело. В этом варианте осуществления, как указано выше, отдельные структуры содержат полноразмерные тяжелую и легкую цепи, содержащие CDR участки. В дополнительных вариантах осуществления используют один или более CDR согласно изобретению совместно с другими CDR, каркасными областями, J и D участками, константными областями и т.д., полученными из других человеческих антител. Например, CDR согласно изобретению можно замещать CDR любого количества человеческих антител, в частности имеющих коммерческую ценность антител.

Одноцепочечные антитела могут образовываться при соединении фрагментов переменного домена (Fv участок) тяжелой и легкой цепей при помощи аминокислотного мостика (короткого пептидного линкера), что приводит к образованию одиночной полипептидной цепи. Такие одноцепочечные Fv (scFv) получали при помощи внесения ДНК, кодирующей пептидный линкер, между ДНК, кодирующими два полипептида переменного домена (V_L и V_H). Полученные в результате полипептиды могут конъюгировать сами с собой, образуя антигенсвязывающие мономеры, либо они могут образовывать мультимеры (например, димеры, тримеры или тетрамеры) в зависимости от длины гибкого линкера между двумя переменными доменами (Kortt et al., 1997, *Prot. Eng.* 10:423; Kortt et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18:95-108). Комбинируя различные полипептиды, содержащие V_L и V_H, можно получать мультимерные scFvs, которые связываются с разными эпитопами (Kriangkum et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18:31-40). Методы, разработанные для получения одноцепочечных антител, включают те, что описаны в патенте США № 4946778; Bird, 1988, *Science* 242:423; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879; Ward et al., 1989, *Nature* 334:544; de Graaf et al., 2002, *Methods Mol Biol.* 178:379-87. В настоящее изобретение включены одноцепочечные антитела, полученные из предложенных в данном описании антител (включая, но не ограничиваясь scFv, содержащими такие комбинации переменных доменов: Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO: 95/SEQ ID NO: 29), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO: 96/SEQ ID NO: 30), Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO: 97/SEQ ID NO: 31), Ab4 LCv/Ab4 HCv (SEQ ID NO: 98/SEQ ID NO: 32), Ab5 LCv/Ab5 HCv (SEQ ID NO: 99/SEQ ID NO: 33), Ab6 LCv/Ab6 HCv (SEQ ID NO: 100/SEQ ID NO: 34), Ab7 LCv/Ab7 HCv (SEQ ID NO: 101/SEQ ID NO: 35), Ab8 LCv/Ab8 HCv (SEQ ID NO: 102/SEQ ID NO: 36), Ab9 LCv/Ab9 HCv (SEQ ID NO: 103/SEQ ID NO: 37), Ab10 LCv/Ab10 HCv (SEQ ID NO: 104/SEQ ID NO: 38), и Ab11 LCv/Ab11 HCv (SEQ ID NO: 105/SEQ ID NO: 39), Ab30 LCv/Ab30 HCv (SEQ ID NO: 163/SEQ ID NO: 145), Ab32 LCv/Ab32 HCv (SEQ ID NO: 164/SEQ ID NO: 146), Ab33 LCv/Ab33 HCv (SEQ ID NO: 165/SEQ ID NO: 147)), и их комбинации.

В одном варианте осуществления ST2-антигенсвязывающий белок представляет собой слитый белок антитела (иногда называемый в данном описании "конъюгатом антитела"). Партнер по конъюгации может иметь белковую или небелковую природу; в общем случае последний получают, используя функциональные группы на антигенсвязывающем белке и на партнере по конъюгации. В определенных вариантах осуществления антитело конъюгируют с химическим (лекарственным) веществом небелковой природы для получения конъюгата из антитела и лекарственного средства.

В одном варианте осуществления ST2-антигенсвязывающий белок представляет собой аналог антитела, иногда называемый "синтетическим антителом". Например, во многих работах используют как альтернативные белковые каркасы, так и искусственные каркасы с привитыми CDR. Такие каркасы включают, но не ограничиваются этим, мутации, введенные для стабилизации трехмерной структуры связывающего белка, а также полностью синтетические каркасы, состоящие, к примеру, из биосовместимых полимеров (см., например, Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Volume 53, Issue 1:121-129. Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654). В дополнение, можно применять пеп-

тидные миметики антител ("РАМ"), а также работу на основе миметиков антител, в которой компоненты фибронектина используются в качестве каркасов.

При употреблении в данном описании под термином "белок" подразумевается по меньшей мере две ковалентно связанных аминокислоты, а сам термин включает белки, полипептиды, олигопептиды и пептиды. В некоторых вариантах осуществления две или более ковалентно связанных аминокислоты соединены при помощи пептидной связи. Белок может состоять из аминокислот природного происхождения и пептидных связей, например, в случае, когда белок получен рекомбинантным методом с использованием экспрессионных систем и клеток-хозяев, как описано ниже. В другом варианте белок может содержать синтетические аминокислоты (например, гомофенилаланин, цитруллин, орнитин и норлейцин) или пептидомиметические структуры, т.е. "пептидные или белковые аналоги", такие как пептоиды (см. Simon et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:9367, включенную в данное описание посредством ссылки), которые могут быть устойчивыми к протеазам или в других физиологических условиях и/или в условиях хранения. Такие синтетические аминокислоты можно вносить, в частности, когда антигенсвязывающий белок синтезируют *in vitro*, при помощи стандартных методов, хорошо известных в данной области техники. Вдобавок, можно использовать любую комбинацию из пептидомиметика и синтетических и природных остатков/структур. Термин "аминокислота" также включает иминокислотные остатки, такие как пролин и гидроксипролин. "R-группа" или "боковая цепь" аминокислоты может иметь как (L)-, так и (S)-конфигурацию. В конкретном варианте осуществления аминокислоты находятся в (L)- или (S)-конфигурации.

В отдельных аспектах реализации в изобретении предложены рекомбинантные антигенсвязывающие белки, которые связывают ST2 и, в некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный человеческий ST2 или его часть. В этом контексте "рекомбинантным белком" называется белок, полученный при помощи рекомбинантных технологий с использованием любых известных в данной области техники способов и методов, т.е. посредством экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано в данном описании. Способы и методы получения рекомбинантных белков хорошо известны в данной области техники. Варианты осуществления изобретения включают рекомбинантные антигенсвязывающие белки, которые связывают ST2 дикого типа и его варианты.

"Состоящий, по существу, из" означает, что аминокислотная последовательность может изменяться в пределах примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15% относительно перечисленных как SEQ ID NO: последовательностей и при этом сохраняет биологическую активность, как описано в данном описании.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению являются выделенными белками или в значительной степени очищенными белками. "Выделенный" белок не содержит, по меньшей мере, некоторые вещества, с которыми он обычно связан в своем природном состоянии, например, в заданном образце он составляет по меньшей мере 5 мас.% или по меньшей мере 50 мас.% от общего белка. Понятно, что выделенный белок может составлять от 5 до 99,9 мас.% от общего содержания белка в зависимости от обстоятельств. Например, белок может быть получен при значительно более высокой концентрации путем использования индуцибельного промотора или промотора высокого уровня экспрессии, при этом получают повышенный уровень концентрации белка. Данное определение включает выработку антигенсвязывающего белка в большом количестве организмов и/или клеток-хозяев, которые известны в данной области техники.

В случае аминокислотных последовательностей идентичность и/или схожесть последовательностей определяют, используя стандартные известные в данной области методы, включая, но не ограничиваясь этим, алгоритм локальной идентичности последовательностей Смита и Ватермана, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритм выравнивания последовательностей Нидлмана и Вунша, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, метод поиска сходства Пирсона и Липмана, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, компьютеризированные реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA, входящие в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), программу для выравнивания последовательностей Best Fit, описанную Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, предпочтительно используя настройки по умолчанию либо путем подбора. Предпочтительно процент идентичности рассчитывается при помощи FastDB на основании следующих параметров: штраф за нарушение комплементарности - 1; штраф за наличие гэпа - 1; штраф за размер гэпа - 0,33 и штраф за соединение - 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Примером подходящего алгоритма является PILEUP. PILEUP позволяет проводить множественное выравнивание последовательностей из группы родственных последовательностей, используя прогрессивное попарное выравнивание. Также в нем есть функция построения дерева, показывающего кластерные взаимосвязи, используемые для создания выравнивания. В PILEUP используется упрощенный метод прогрессивного выравнивания Фенга и Дулиттла, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; данный метод сходен с тем, который был описан Хиггинсом и Шарпом, 1989, CABIOS 5:151-153. Подходящие параметры PILEUP включают вес гэпа по умолчанию в 3,00, вес длины гэпа по умолчанию в 0,10 и взвешенные конечные гэпы.

Другим примером подходящего алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 и Karin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5787. В особенности подходящей программой BLAST является программа WU-BLAST-2, которая была создана Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. WU-BLAST-2 использует несколько поисковых параметров, значения большинства из которых установлены по умолчанию. Для подгоночных параметров устанавливают следующие значения: интервал перекрытия=1, доля перекрытий=0,125, предельные размеры участка (T)= Π . Параметры HSP S и HSP S2 являются динамическими величинами и устанавливаются программой в зависимости от содержания конкретной последовательности и содержания конкретной базы данных, относительно которых проводится поиск представляющей интерес последовательности; при этом значения могут быть подобраны так, чтобы увеличить чувствительность.

Дополнительным подходящим алгоритмом является BLAST с гэпами, описанный Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. BLAST с гэпами использует показатели замен BLOSUM-62; пороговый параметр T, установленный на 9; метод двух совпадений для запуска продлений без гэпов, затраты при длине гэпа k, составляющие $10+k$; величину X_u , установленную на 16, и величину X_g , установленную на 40 на этапе поиска по базе данных и на 67 на выходном этапе алгоритмов. Выравнивание с гэпами запускается при показателе, который соответствует приблизительно 22 бит.

В общем случае аминокислотная гомология, сходство или идентичность между отдельными вариантами CDR и приведенными в данном описании последовательностями, составляет по меньшей мере 80%, и более часто, имеет предпочтительно увеличивающуюся степень гомологии или идентичности, составляющую по меньшей мере 85, 90, 91, 92, 93, 94%, 95, 96, 97, 98, 99 и практически 100%. Аналогично "процент (%) идентичности нуклеотидных последовательностей" относительно определенных в данном описании нуклеотидных последовательностей определяется как процентное содержание нуклеотидных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными нуклеотидным остаткам кодирующей последовательности антигенсвязывающего белка. В конкретном методе используется BLASTN модуль WU-BLAST-2 с установленными по умолчанию параметрами с интервалом перекрытия и долей перекрытия, составляющими соответственно 1 и 0,125.

В общем, гомология, сходство или идентичность между нуклеотидными последовательностями, кодирующими индивидуальные варианты CDR, и приведенными в данном описании нуклеотидными последовательностями составляет по меньшей мере 80%, и более часто, имеет предпочтительно увеличивающуюся степень гомологии или идентичности, составляющую по меньшей мере 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и практически 100%.

Таким образом, "вариантным CDR" является участок, обладающий определенной гомологией, сходством или идентичностью родительскому CDR, являющемуся объектом изобретения, и характеризующийся биологическим действием, составляющим, без ограничений, по меньшей мере 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% от специфичности и/или активности родительского CDR.

В случае если участок или область внедрения вариации аминокислотной последовательности является предопределенным нет необходимости в предопределении самой мутации. Например, с целью оптимизации введения мутации на заданном участке можно провести случайный мутагенез в целевом кодоне или области и провести скрининг экспрессируемых вариантов CDR антигенсвязывающих белков, чтобы выбрать оптимальную комбинацию необходимой активности. Методы введения мутаций замещения в предопределенные участки ДНК с известной последовательностью хорошо известны, например это мутагенез с использованием праймеров M13 и мутагенез с использованием ПЦР. Скрининг мутантов проводят при помощи анализа антигенсвязывающей активности белка, например связывания ST2.

Аминокислотные замены обычно состоят из одиночных остатков; инсерции обычно составляют от примерно одного до примерно 20 аминокислотных остатков, хотя допустимы и значительно большие по размеру инсерции. Диапазон делеций составляет от примерно одного до примерно 20 аминокислотных остатков, хотя в некоторых случаях делеции могут быть и большими.

Замены, делеции, инсерции или любые их комбинации можно использовать для получения конечного производного либо варианта. В общем случае такие изменения проводят для нескольких аминокислот, чтобы минимизировать изменение молекулы, в частности иммуногенность и специфичность антигенсвязывающего белка. Однако при определенных обстоятельствах допустимы и более значительные изменения. Консервативные замены проводят, как правило, согласно следующей схеме, приведенной в виде табл. 3.

Таблица 3

Исходный остаток	Примеры замен
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Значительные изменения функциональности или иммунологической идентичности осуществляют, выбирая замены менее консервативные, чем замены, приведенные в табл. 3. Например, можно проводить замены, которые заметно влияют на структуру полипептидного скелета в области изменения, например структуру альфа-спирали или бета-складчатого слоя; заряд или гидрофобность молекулы на участке-мишени или на размер боковой цепи. Заменами, для которых, как правило, предполагается, что они приводят к наибольшим изменениям в свойствах полипептидов, являются такие замены, в которых (а) гидрофильный остаток, например серил или треонил, заменен на гидрофобный остаток, например лейцил, изолейцил, фенилаланил, валил или аланил; (b) цистеин или пролин заменен на любой другой остаток; (с) остаток, содержащий электроположительную боковую цепь, например лизил, аргинил или гистидил, заменен на электроотрицательный остаток, например глутамил или аспартил; или (d) остаток, содержащий объемную боковую цепь, например фенилаланин, заменен на остаток, не имеющий боковой цепи, например глицин.

Обычно варианты проявляют такую же качественную биологическую активность и вызывают такой же иммунный ответ, как и аналог природного происхождения, хотя при необходимости выбирают также варианты для того, чтобы модифицировать характеристики антигенсвязывающих белков. Альтернативно, вариант можно сконструировать таким образом, чтобы изменить биологическую активность антигенсвязывающего белка. Например, можно изменить или удалить сайт гликозилирования, как обсуждается в данном описании.

Другие производные антител к ST2, которые входят в объем данного изобретения, включают ковалентные или агрегационные конъюгаты антител к ST2 или их фрагментов с другими белками или полипептидами, полученные, например, при экспрессии рекомбинантных слитых белков, содержащих гетерологичные полипептиды, слитые с N-концом либо C-концом полипептида антитела к ST2. Например, конъюгированный пептид может быть гетерологичным сигнальным (или лидерным) полипептидом, например лидером альфа-фактора дрожжей, или пептидом, таким как эпитопная метка. Слитые белки, содержащие антитело к ST2, могут содержать пептиды, добавленные для того, чтобы способствовать очистке или идентификации антитела к ST2 (например, поли-His). Полипептид антитела к ST2 также может быть соединен с пептидом FLAG, как описано в Hopp et al., *Bio/Technology* 6:1204, 1988 и в патенте США № 5011912. Пептид FLAG является высокоантигенным и обеспечивает наличие эпитопа, обратимо связанного специфическим моноклональным антителом (mAb), создавая возможность для быстрого анализа и легкой очистки экспрессируемого рекомбинантного белка. Реагенты, подходящие для получения слитых белков, в которых пептид FLAG слит с заданным полипептидом, являются коммерчески доступными (Sigma, Сент-Луис, Миссури).

В одном варианте осуществления получают олигомер, используя полипептид, выделенный из иммуноглобулинов. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными фрагментами выделенных из антител полипептидов (включая Fc-домен), было описано, например, Ashkenazi et al., 1991, *PNAS USA* 88:10535; Byrn et al., 1990, *Nature* 344:677 и Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", в *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, с. 10.19.1-10.19.11.

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к димерам, содержащим два слитых белка, полученных путем слияния ST2-связывающего фрагмента антитела к ST2 с Fc-областью антитела. Димер можно получить, к примеру, путем вставки гибридного гена, кодирующего слитый белок, в подходящий экспрессионный вектор, экспрессии гибридного гена в клетках-хозяевах, трансформированных при помощи рекомбинантного экспрессионного вектора, и обеспечения возможности сборки экспрессируемого слитого белка наподобие молекул антител, вследствие чего между Fc-элементами образуются межцепевые дисульфидные связи, что приводит к образованию димера.

Употребляемый в данном описании термин "Fc-полипептид" включает нативные и мутеиновые

формы полипептидов, выделенные из Fc-области антитела. Также включены процессированные формы таких полипептидов, содержащие шарнирный участок, который стимулирует димеризацию. Слитые белки, содержащие Fc-элементы (и образованные ими олигомеры) имеют преимущество, состоящее в легкости очистки при помощи аффинной хроматографии на колонках с протеином А или протеином G.

Одним из подходящих Fc-полипептидов, который описан в заявке согласно РСТ WO 93/10151 (включенной в данное описание посредством ссылки), является одноцепочечный полипептид, располагающийся от N-концевого шарнирного участка до нативного C-конца Fc-области человеческого антитела IgG. Другим подходящим Fc-полипептидом является Fc-мутеин, описанный в патенте США № 5457035 и в Baum et al., 1994, EMBO J. 13:3992-4001. Аминокислотная последовательность этого мутеина идентична нативной последовательности Fc, приведенной в WO 93/10151, за исключением того, что произведена замена аминокислоты 19 с Leu на Ala, аминокислоты 20 с Leu на Glu и аминокислоты 22 с Gly на Ala. Данный мутеин демонстрирует сниженную аффинность к рецепторам Fc.

В других вариантах осуществления вариабельный фрагмент тяжелой и/или легкой цепей антитела к ST2 можно заменить вариабельным фрагментом тяжелой и/или легкой цепи другого антитела.

Другой способ получения олигомерных производных антитела к ST2 включает применение лейциновой молнии. Домены лейциновой молнии представляют собой пептиды, которые стимулируют олигомеризацию белков, в которых они находятся. Изначально лейциновые молнии были обнаружены в нескольких ДНК-связывающих белках (Landschulz et al., 1988, Science 240:1759) и с тех пор были найдены в большом количестве различных белков. Среди известных лейциновых молний присутствуют пептиды природного происхождения и их производные, которые димеризуются или тримеризуются. Примеры доменов лейциновых молний, подходящих для получения растворимых олигомерных белков, описаны в заявке согласно РСТ WO 94/10308, а лейциновая молния, выделенная из поверхностно-активного протеина D (SPD) легких, описана в Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191, обе работы включены в данное описание посредством ссылки. Применение модифицированной лейциновой молнии, которая обеспечивает стабильную тримеризацию слитого с ней гетерологичного белка, описано в Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. В одном из подходов рекомбинантные слитые белки, содержащие фрагмент или производное антитела к ST2, слитые с пептидом лейциновой молнии, экспрессируются в подходящих клетках-хозяевах, и образующиеся растворимые олигомерные фрагменты или производные антитела к ST2 выделяют из супернатанта клеточной культуры.

Ковалентные модификации антигенсвязывающих белков также включены в объем данного изобретения, и как правило, но не всегда, осуществляются посттрансляционно. Например, некоторые виды ковалентных модификаций антигенсвязывающего белка вносят в молекулу путем проведения реакции между конкретными аминокислотными остатками антигенсвязывающего белка и органическим дериватирующим веществом, которое способно реагировать с выбранными боковыми цепями либо N- или C-концевыми остатками.

Наиболее часто проводят реакцию между остатками цистенила и α -галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, для получения производных карбоксиметила или карбоксиамидометила. Также остатки цистенила дериватизируют при помощи проведения реакции с бромтрифторацетоном, α -бром- β -(5-имидозоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлормеркурбензоатом, 2-хлормеркур-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Остатки гистидила дериватизируют при помощи реакции с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, так как этот агент является относительно специфичным к боковой цепи гистидила. Также применяют парабромфенацилбромид; реакцию проводят предпочтительно в 0,1 М какодилате натрия при pH 6,0.

Для остатков лизинила и аминоконцевых остатков проводят реакцию с ангидридами янтарной или другой карбоновой кислоты. Дериватизация этими веществами приводит к изменению полярности лизиновых остатков. Другие подходящие реагенты для дериватизации альфа-аминосодержащих остатков включают имидоэфиры, такие как метилпикколинимидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборгидрид; тринитробензолсульфоновую кислоту; O-метилизомочевину; 2,4-пентандион и катализируемую трансаминазой реакцию с глиоксидом.

Остатки аргинила модифицируют при помощи реакции с одним или несколькими общепринятыми реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Дериватизация остатков аргинина требует, чтобы реакция проводилась в щелочных условиях вследствие высокого значения pK_a функциональной группы гуанидина. Кроме того, эти реагенты могут вступать в реакцию с группами лизина, а также с эpsilon-аминогруппой аргинина.

Можно проводить определенные модификации остатков тирозила с акцентом на внесении спектральных меток в остатки тирозила при помощи проведения реакции с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометана. Наиболее часто для образования молекул O-ацетилтирозила и 3-нитропроизводных используют соответственно N-ацетилимидизол и тетранитрометан. Остатки тирозила йодируют при помощи ^{125}I или ^{131}I для получения меченых белков для применения в радиоиммунологическом анализе, при этом подходит вышеописанный способ с использованием хлорамина T.

Карбоксильные боковые группы (аспартил или глутамил) избирательно модифицируют при помощи реакции с карбодиимидами ($R'-N=C=N-R'$), где R и R' необязательно являются различными алкильными группами, такими как 1-циклогексил-3-(3-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азониа-4,4-диметилпентил)карбодиимид. Кроме того, остатки аспартила и глутамила преобразуют в остатки аспарагинила и глутаминила при помощи реакции с ионами аммония.

Дериватизация с бифункциональными веществами подходит для перекрестного сшивания антиген-связывающих белков с водонерастворимой матрицей подложки или поверхностью для применения в разных методах. Обычно применяемые перекрестно сшивающие вещества включают, например, 1,1-бис-(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, N-гидроксисукцинимидэфиры, например эфиры с 4-азидо-салициловой кислотой, гомобифункциональные имидоэфиры, включая дисукцинимидилэфиры, такие как 3,3'-дитиобис-(сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан. Дериватирующие вещества, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропиоимидат, позволяют получить фотоактивируемые промежуточные продукты, которые способны к образованию перекрестных связей под действием света. Альтернативно, для иммобилизации белка используют реактивные водонерастворимые матрицы, такие как цианоген-бромид-активируемые углеводы, и реакционноспособные подложки, описанные в патентах США №№ 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440.

Остатки глутаминила и аспарагинила часто дезамидируют для получения соответственно остатков глутамила и аспартила. Альтернативно, эти остатки дезамидируют в мягких кислых условиях. Все формы этих остатков входят в объем данного изобретения.

Другие модификации включают гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп остатков серила или треонина, метилирование α -аминогрупп лизина, аргинина и боковых цепей гистидина (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любых C-концевых карбоксильных групп.

Другой вид ковалентной модификации антигенсвязывающего белка, входящий в объем данного изобретения, включает изменение профиля гликозилирования белка. Как известно в данной области техники, профили гликозилирования могут зависеть как от белковой последовательности (например, наличия или отсутствия определенных аминокислотных остатков гликозилирования, что обсуждается ниже), так и от клетки- или организма-хозяина, в котором продуцируется белок. Конкретные экспрессионные системы обсуждаются ниже.

Гликозилирование полипептидов обычно является N-связанным или O-связанным. N-связанное гликозилирование означает присоединение углеводного соединения к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X является любой аминокислотой, за исключением пролина, представляют собой последовательности узнавания для ферментативного присоединения углеводной группы к боковой цепи аспарагина. Таким образом, наличие в полипептиде любой из этих трипептидных последовательностей создает потенциальный участок гликозилирования. O-связанное гликозилирование означает присоединение одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбонильной группе, как правило, серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Добавление участков гликозилирования в антигенсвязывающий белок удобно проводить путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более из вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-связанных участков гликозилирования). Также изменение можно осуществить путем добавления или замещения одного или более остатков серина либо треонина в исходной последовательности (для O-связанных участков гликозилирования). Для удобства аминокислотную последовательность антигенсвязывающего белка предпочтительно преобразуют путем внесения изменений на уровне ДНК, в частности, при помощи введения в кодирующую целевой полипептид ДНК мутаций в заранее выбранных основаниях, таким образом, чтобы получить кодоны, которые будут транслироваться в необходимые аминокислоты.

Другие способы увеличения количества углеводных соединений в антигенсвязывающем белке состоят в химическом или ферментативном сопряжении гликозидов с белком. Преимуществом подобных способов является то, что они не требуют выработки белка в клетке-хозяине, для которой возможно N- или O-гликозилирование. В зависимости от используемого способа сопряжения сахар(-а) можно присоединить к (а) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, таким как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Данные способы описаны в WO 87/05330, опубликованной 11 сентября 1987 г., и в Aplin and Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306.

Удаление углеводных групп, присутствующих в исходном антигенсвязывающем белке, можно осуществить химически или ферментативно. Химическое дегликозилирование требует обработки белка соединением трифторметансульфоновой кислоты или аналогичным соединением. Эта обработка приво-

дит к отщеплению большинства либо всех сахаров, за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), при этом полипептид остается неповрежденным. Химическое дегликозилирование описано Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Ферментативное отщепление углеводных соединений от полипептида можно осуществить при помощи большого количества эндо- и экзогликозидаз, как описано в Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Гликозилирование в потенциальных участках гликозилирования можно предотвратить, используя соединение туникамицина, как описано в Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Туникамицин блокирует образование связей белок-N-гликозид.

Другой вид ковалентной модификации антигенсвязывающего белка включает соединение антигенсвязывающего белка с различными небелковыми полимерами, включая, но не ограничиваясь этим, различные полиолы, такие как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксиалкилены, способами, описанными в патентах США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. В дополнение, как известно в данной области техники, аминокислотные замены можно проводить в различных позициях в пределах антигенсвязывающего белка для облегчения добавления полимеров, таких как ПЭГ.

В некоторых вариантах осуществления ковалентная модификация антигенсвязывающих белков согласно изобретению включает добавление одной или более меток.

Термин "метящая группа" обозначает любую детектируемую метку. Примеры подходящих метящих групп включают, но не ограничиваются этим, следующие элементы: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные группы (например, FITC, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов), ферментативные группы (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемолюминисцентные группы, биотинильные группы, predetermined полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, металлосвязывающие домены, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления метящая группа сопряжена с антигенсвязывающим белком посредством спейсерных "ножек" различной длины для снижения потенциального стерического несоответствия. В данной области техники известно большое количество способов для мечения белков, которые можно применять в реализации настоящего изобретения.

В общем, метки делятся на множество классов в зависимости от способа их детекции: а) изотопные метки, которые могут быть радиоактивными или тяжелыми изотопами; б) магнитные метки (например, магнитные частицы); в) редокс-активные вещества; г) оптические красители; ферментативные группы (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза); е) биотинильные группы; и ф) predetermined полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, металлосвязывающие домены, эпитопные метки и т.д.). В некоторых вариантах осуществления метящая группа сопряжена с антигенсвязывающим белком посредством спейсерных "ножек" различной длины для снижения потенциального стерического несоответствия. Большое количество способов, известных в данной области техники, можно применять для мечения белков в осуществлении настоящего изобретения.

Специфические метки включают оптические красители, включая, но не ограничиваясь этим, хромофоры, люминофоры и флуорофоры, при этом последние являются специфическими во многих случаях. Флуорофоры могут быть как низкомолекулярными флуорофорами, так и белковоподобными флуорофорами.

Под "флуоресцентной меткой" подразумевается любая молекула, которую можно детектировать по ее характерным флуоресцентным свойствам. Подходящие флуоресцентные метки включают, но не ограничиваются этим, флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, люциферовый желтый, каскад синий, техасский красный, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, зеленый Орегон, красители Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), каскад синий, каскад желтый и R-фикоэритрин (PE) (Molecular Probes, Юджин, Орегон), FITC, родамин и техасский красный (Pierce, Рокфорд, Иллинойс), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Питтсбург, Пенсильвания). Подходящие оптические красители, включая флуорофоры, описаны в Molecular Probes Handbook авторства Richard P. Haugland, отдаленно включенной в данное описание посредством ссылки.

Подходящие белковоподобные флуоресцентные метки также включают, но не ограничиваются этим, зеленый флуоресцентный белок, включая виды GFP Renilla, Ptilosarcus или Aequorea (Chalfie et al., 1994, Science 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., номер доступа в Genbank U55762), голубой флуоресцентный белок (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), усиленный желтый флуоресцентный белок (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), люциферазу (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β -галактозидазу (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci.

U.S.A. 85:2603-2607) и Renilla (WO 92/15673, WO 95/07463, WO 98/14605, WO 98/26277, WO 99/49019, патенты США №№ 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558). Все вышеперечисленные ссылки включены в данное описание посредством ссылки.

Приведенные в качестве примеров антигенсвязывающие белки, описанные в данном описании, обладают свойствами, обусловленными уникальным эпитопом на ST2, связываемом антигенсвязывающим белком. Термин "эпитоп" обозначает аминокислоты молекулы-мишени, с которыми контактирует антигенсвязывающий белок, например антитело, когда антигенсвязывающий белок связывается с молекулой-мишенью. Эпитоп может быть заменимым или незаменимым (например, (i) в одноцепочечном полипептиде это аминокислотные остатки, которые не являются заменимыми по отношению друг к другу в полипептидной последовательности, но в контексте молекулы-мишени они связываются антигенсвязывающим белком, или (ii) в мультимерном рецепторе, содержащем два или более индивидуальных компонента, например ST2 и АсР, это аминокислотные остатки, присутствующие в одном или более из индивидуальных компонентов, но которые связываются при этом антигенсвязывающим белком. Эпитопные детерминанты могут включать химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические зарядовые характеристики. В общем, антигенсвязывающие белки, специфические в отношении конкретной молекулы-мишени, распознают преимущественно эпитоп на молекуле-мишени в комплексной смеси из белков и/или макромолекул.

Методы характеристики связывания эпитопа антигенсвязывающим белком хорошо известны в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, сортировку (перекрестное конкурирование) (Miller et al. "Epitope binning of murine monoclonal antibodies by a multiplexed pairing assay" J Immunol Methods (2011) 365, 118-25), пептидное картирование (например, PEPSPOT™) (Albert et al. "The B-cell Epitope of the Monoclonal Anti-Factor VIII Antibody ESH8 Characterized by Peptide Array Analysis" 2008 Thromb Haemost 99, 634-7), методы мутагенеза, такие как получение химер (Song et al. "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients" J. Virol. (2010) 84, 6935-6942), аланиновое сканирование (Cunningham and Wells "High-resolution epitope mapping of HGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis" Science (1989) 244, 1081-1085), аргининовое сканирование (Lim et al. "A diversity of antibody epitopes can induce signaling through the erythropoietin receptor" Biochemistry (2010) 49, 3797-3804), метод HD-обмена (Coates et al. "Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry" Rapid Commun. Mass Spectrom. (2009) 23 639-647), ЯМР-метод с перекрестным насыщением (Morgan et al. "Precise epitope mapping of malaria parasite inhibitory antibodies by TROSY NMR cross-saturation" Biochemistry (2005) 44, 518-23) и кристаллографию (Gerhardt et al. "Structure of IL-17A in complex with a potent, fully human neutralizing antibody" J. Mol. Biol (2009) 394, 905-21). Данные методы различаются по уровню детализации, который они обеспечивают, в отношении аминокислот, составляющих эпитоп.

Антигенсвязывающие белки согласно изобретению включают те, которые содержат перекрывающиеся эпитопы с описанными в данном описании примерными антигенсвязывающими белками, например Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 или Ab33. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит эпитопы, аналогичные эпитопам примерных антигенсвязывающих белков. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает только подгруппу из аминокислот, аналогичных аминокислотам примерных антигенсвязывающих белков.

В определенных вариантах осуществления ST2-антигенсвязывающий белок содержит эпитоп, идентичный или перекрывающийся с Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 или Ab33, и содержит а) варибельный домен легкой цепи, являющийся по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или являющийся идентичным аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164 или SEQ ID NO: 165; б) варибельный домен тяжелой цепи, являющийся по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или являющийся идентичным аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146 или SEQ ID NO: 147; или с) варибельный домен легкой цепи согласно а) и варибельный домен тяжелой цепи согласно б).

В определенных вариантах осуществления ST2-антигенсвязывающий белок содержит эпитоп, идентичный или перекрывающийся с Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 или Ab33, и содержит варибельный домен легкой цепи, являющийся по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или являющийся идентичным аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 95, и варибельный домен тяжелой цепи, являющийся по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или являющийся идентичным аминокислотной последовательности, приведенной в

В определенных вариантах осуществления ST2-антигенсвязывающий белок содержит эпитоп, идентичный или перекрывающийся с Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 или Ab33, и содержит а) вариабельный домен легкой цепи, содержащий не более десяти или не более пяти аминокислотных вставок, делеций или замен относительно аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164 или SEQ ID NO: 165; б) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий не более десяти или не более пяти аминокислотных вставок, делеций или замен относительно аминокислот-

- 23 -

- 24 -

приведенной в SEQ ID NO: 148; HCDR2, содержащий не более трех аминокислотных вставок, делеций или замен относительно последовательности HCDR2, приведенной в SEQ ID NO: 151; и HCDR3, содержащий не более трех аминокислотных вставок, делеций или замен относительно последовательности HCDR3, приведенной в SEQ ID NO: 154; aa) HCDR1, содержащий не более трех аминокислотных вставок, делеций или замен относительно последовательности HCDR1, приведенной в SEQ ID NO: 149; HCDR2, содержащий не более трех аминокислотных вставок, делеций или замен относительно последовательности HCDR2, приведенной в SEQ ID NO: 152; и HCDR3, содержащий не более трех аминокислотных вставок, делеций или замен относительно последовательности HCDR3, приведенной в SEQ ID NO: 155; или bb) HCDR1, содержащий не более трех аминокислотных вставок, делеций или замен относительно последовательности HCDR1, приведенной в SEQ ID NO: 150; HCDR2, содержащий не более трех аминокислотных вставок, делеций или замен относительно последовательности HCDR2, приведенной в SEQ ID NO: 153; и HCDR3, содержащий не более трех аминокислотных вставок, делеций или замен относительно последовательности HCDR3, приведенной в SEQ ID NO: 156.

Предпочтительные ST2-антигенсвязывающие белки, описанные непосредственно выше, включают те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно a) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно o); те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно b) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно p); те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно c) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно q); те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно d) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно r); те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно e) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно s); те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно f) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно t); те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно g) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно u); те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно h) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно v); те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно i) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно w); те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно j) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно x); те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно k) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно y); те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно l) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно z); те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно m) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно aa); и те, которые содержат вариабельный домен легкой цепи согласно n) и вариабельный домен тяжелой цепи согласно bb).

Антигенсвязывающие белки, которые содержат идентичный или перекрывающийся эпитоп, часто перекрестно конкурируют за связывание антигена. Таким образом, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению перекрестно конкурирует с Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32 или Ab33. Выражения "перекрестно конкурировать" или "перекрестная конкуренция" означают, что антигенсвязывающие белки конкурируют за один и тот же эпитоп или участок связывания на мишени. Такую конкуренцию можно обнаружить при помощи метода, в котором контрольный антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) предотвращает или подавляет специфическое связывание исследуемого антигенсвязывающего белка и наоборот. Для того чтобы определить, конкурирует ли исследуемая молекула с контрольной молекулой за связывание, можно использовать многочисленные виды анализа конкурентного связывания. Примеры применимых аналитических методов включают твердофазный прямой и непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой и непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный "сэндвич"-метод (см., например, Stahli et al. (1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253), твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см., например, Kirkland et al., (1986) *J. Immunol.* 137:3614-3619), твердофазный прямой анализ с использованием меток, твердофазный прямой "сэндвич"-анализ с использованием меток, Luminex (Jia et al. "A novel method of Multiplexed Competitive Antibody Binning for the characterization of monoclonal antibodies" *J. Immunological Methods* (2004) 288, 91-98) и поверхностный плазмонный резонанс (Song et al. "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients" *J. Virol.* (2010) 84, 6935-6942). Примерный метод для определения перекрестной конкуренции описан в примере 5. Обычно, если конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избыточном количестве, он подавляет связывание контрольного антигенсвязывающего белка с общим антигеном по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70 или 75%. В некоторых случаях связывание подавляется по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или более.

Ab2 связывает ST2 человека и яванского макака с высокой аффинностью и блокирует связывание IL-33 с ST2, таким образом блокируя IL-33-опосредованную передачу сигнала ST2. Антитела, содержащие идентичные, сходные или перекрывающиеся с Ab2 эпитопы, также могут иметь эти характерные особенности. В предпочтительных вариантах осуществления ST2-антигенсвязывающий белок перекрестно конкурирует с Ab2 за связывание с ST2. Примеры ST2-антигенсвязывающих белков, которые перекрестно конкурируют с Ab2, включают Ab1, Ab3, Ab5, Ab7, Ab8 и Ab30 (см. пример 5). Чтобы найти антитела, которые связывают перекрывающийся, сходный или идентичный эпитоп, что и Ab2, можно исследовать одно или более антител на предмет перекрестного конкурирования с Ab2. Более того, полу-

чая варианты антитела, которое перекрестно реагирует с Ab2, можно исследовать такие антитела, чтобы определить, сохраняется ли перекрестная конкуренция после вариации, предполагая, что эпитоп варианта несущественно изменен по сравнению с родительской молекулой. Таким образом, в определенных вариантах осуществления в изобретении предложены варианты антитела, которые перекрестно конкурируют с Ab2 за связывание с ST2.

Кроме перекрестного конкурирования друг с другом на антитела с перекрывающимися, сходными или идентичными эпитопами может аналогично воздействовать мутагенез ST2. Определенные мутации могут подавлять связывание антитела; другие могут усиливать или активировать связывание. В примере 11 проводили аргинин/аланин сканирующий мутагенез части внеклеточного домена ST2 и определяли его воздействие на приведенные в качестве примеров антитела. В объем данного изобретения включены ST2-связывающие белки, характеризующиеся аналогичным воздействием на них мутагенеза, что и приведенные в качестве примеров антитела.

В определенных вариантах осуществления связывание ST2-антигенсвязывающего белка подавляется введением одиночной мутации в ST2, при этом одиночная мутация выбрана из группы, состоящей из L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R и V176R. В предпочтительных вариантах осуществления любые две или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более либо все одиночные мутации из вышеприведенной группы независимо подавляют связывание ST2-связывающего белка. В других вариантах осуществления связывание ST2-антигенсвязывающего белка активируется введением одиночной мутации в ST2, при этом одиночная мутация выбрана из группы, состоящей из L53R, R72A и S73R. В предпочтительных вариантах осуществления все одиночные мутации из вышеприведенной группы независимо активируют связывание ST2-связывающего белка. В предпочтительных вариантах осуществления ST2-антигенсвязывающий белок обладает характерными свойствами Ab2, которые подавляются любой из L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R и V176R и активируются любой из L53R, R72A, S73R.

Другим методом анализа антитела на основании его эпитопа является амидный водородно-дейтериевый обмен (HDX). HDX широко применялся в изучении белковой конформации и динамики, взаимодействий белок-лиганд и белок-белковых взаимодействий (Zhang and Smith 1993, Engen and Smith 2001). Масс-спектрометрические измерения обеспечивают эффективный инструмент для определения степени обмена, так как замещение одного водорода дейтерием приводит к увеличению массы на 1 Да при каждом обмене. Степень HDX легко можно определить на уровне пептида, анализируя протеолитическое расщепление белка при помощи жидкостной хроматографии совместно с tandemной масс-спектрометрией в регулируемых условиях (Engen and Smith 2001, Baerga-Ortiz, Hughes et al. 2002, Codreanu, Ladner et al. 2002, Hamuro, Coales et al. 2006, Coales, Tuske et al. 2009, Zhang, Zhang et al. 2012).

Путем сравнения HDX-профилей антигена для протеолитического расщепления ST2 в отсутствие или в присутствии антитела (в свободном и связанном состоянии) можно обнаружить участки взаимодействия. В частности, когда антитело связывается с ST2, доступные для растворителя водороды амида свободного ST2 могут оказаться защищенными, и в результате чего наблюдается более низкая скорость обмена. Следовательно, те участки, которые в присутствии антитела получают меньше дейтерия, чем в его отсутствие, потенциально являются связывающими эпитопами. Другие факторы, включающие скорость обмена в свободном состоянии, знание белковой структуры антигена, а также результаты других методов картирования эпитопов, учитываются при определении эпитопов.

Связывание Ab2 с ST2 анализировали при помощи HDX, как описано в примере 12. Анализ показывает, что Ab2 связывается с/изменяет скорость обмена фрагмента структуры ST2, содержащей аминокислоты 33-44 и 88-94 из аминокислот 19-322 из SEQ ID NO: 1 (аминокислоты 15-26 и 70-76 зрелого ST2 соответственно). Антитела с перекрывающимися эпитопами, сходными или идентичными эпитопами с Ab2, также будут связываться с/изменять скорость обмена аминокислот в пределах 33-44 и 88-94 из SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ST2-связывающий белок, например антитело, защищает любую из аминокислот 33-44 из SEQ ID NO: 1 при связывании с ST2 и анализе при помощи HDX. В других вариантах осуществления защищены любые из аминокислот 88-94. Оба варианта указывают на частичное перекрывание связывающих эпитопов с Ab2. В предпочтительных вариантах осуществления защищены любые аминокислоты из 33-44 и любые из 88-94. В определенных вариантах осуществления ST2-связывающий белок, например антитело, защищает все аминокислоты 33-44 из SEQ ID NO: 1 при связывании с ST2 и анализе при помощи HDX. В других вариантах осуществления защищены все аминокислоты 88-94. Оба варианта указывают на наличие сходного связывающего эпитопа с Ab2. В предпочтительных вариантах осуществления защищены все аминокислоты из 33-44 и все из 88-94, что указывает на наличие идентичного или практически идентичного эпитопа с Ab2.

Связывание Ab2 с ST2 дополнительно анализировали при помощи рентгеновской кристаллографии. Данные рентгеновской кристаллографии согласовывались с данными HDX-анализа. Область контакта между Ab и антигеном можно определить/выявить большим количеством способов. В примере 13 область контакта определяли по разнице в площади поверхности, доступной для растворителя, и по расстоянию. Остатками ST2, находящимися в пределах области контакта с Ab2, определенными по разнице

в площади поверхности, доступной для растворителя, и по расстоянию менее 5 Å, являются (в соответствии с позициями в зрелом ST2 (с отсутствующей лидерной последовательностью)) K1, F2, P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79 и Y81. В определенных вариантах осуществления ST2-связывающий белок образует область контакта с ST2, которая перекрывается с таковой у Ab2, включая те варианты, в которых любые из K1, F2, P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79 или Y81 находятся в пределах области контакта. В некоторых вариантах осуществления ST2-связывающий белок образует область контакта с ST2, где P19, R20, Q21, G22, K23 и/или Y26 находятся в пределах области контакта. В других вариантах осуществления I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79 и/или Y81 находятся в пределах области контакта. В предпочтительных вариантах осуществления K1, F2, P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79 и Y81 находятся в пределах области контакта.

Кристаллическая структура указывает на то, что определенные аминокислотные остатки образуют водородные связи или соляные мостики с аминокислотами Ab2. Такие остатки включают K1, R20, K23, Y26, T75, N77, R78 и T79. В определенных вариантах осуществления ST2-антигенсвязывающий белок образует водородные связи или соляные мостики с одним или более из K1, R20, K23, Y26, T75, N77, R78 и T79.

Кристаллическая структура дополнительно дает информацию относительно того, какие остатки Ab2 образуют область контакта с ST2. На фиг. 10 показаны остатки в вариабельном участке легкой цепи и вариабельном участке тяжелой цепи, которые образуют область контакта с ST2. Также показаны остатки, которые образуют водородные связи или соляные мостики с аминокислотами в ST2. Эту информацию можно использовать для конструирования вариантов Ab2, включая те, которые содержат вариабельные домены, являющиеся на 90% идентичными, на 95% идентичными, и 10 или менее инсерций, делеций и/или замен в пределах вариабельного домена легкой цепи или тяжелой цепи Ab2. Может возникнуть необходимость сохранения аминокислот в пределах области контакта, и при этом изменения остатков, не входящих в эту область. Таким образом, можно сконструировать и получить варианты Ab2, содержащие одну или более аминокислотных вставок, замен и/или делеций в пределах одного или более CDR, принадлежащих Ab2, которые поддерживают связывание с ST2.

В некоторых вариантах осуществления ST2-связывающий белок содержит вариант вариабельного участка легкой цепи Ab2 (SEQ ID NO: 96), в котором D28, I29, S30, N31, Y32, Y49, D50, N53, E55, T56, D91, D92, N93, F94 и/или L96 остаются неизменными или содержат консервативные замены, и/или вариант вариабельного участка тяжелой цепи Ab2 (SEQ ID NO: 30), в котором W33, I50, D57, R59, H99, G100, T101, S102, S103, D104, Y105 и/или Y106 остаются неизменными или содержат консервативные мутации. В предпочтительных вариантах осуществления D28, N31, D50, N53, E55, D91 и D92 вариабельного участка легкой цепи остаются неизменными и S102, S103, D104 и Y105 тяжелой цепи остаются неизменными.

Полинуклеотиды, кодирующие ST2-антигенсвязывающие белки.

В данное изобретение включены нуклеиновые кислоты, кодирующие ST2-антигенсвязывающие белки, включая антитела, определенные в данном описании. Предпочтительные нуклеиновые кислоты включают те, которые кодируют приведенные в качестве примеров и описанные в данном описании легкие и тяжелые цепи.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab1 LC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab2 LC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab3 LC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab4 LC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab5 LC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 77.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab6 LC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 78.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab7 LC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 79.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab8 LC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab9 LC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab10 LC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab11 LC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab30 LC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 157.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab32 LC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 158.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab33 LC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 159.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab1 HC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab2 HC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab3 HC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab4 HC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab5 HC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab6 HC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab7 HC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab8 HC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab9 HC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab10 HC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab11 HC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab30 HC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 139.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab32 HC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 140.

Примером нуклеиновой кислоты, кодирующей Ab33 HC, является нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 141.

Аспекты осуществления данного изобретения включают полинуклеотидные варианты (полученные, например, вследствие дегенерации), которые кодируют описанные в данном описании аминокислотные последовательности.

Аспекты осуществления данного изобретения включают множество вариантов реализации, включая, но не ограничиваясь этим, следующие приведенные в качестве примеров варианты осуществления.

Выделенный полинуклеотид, где указанный полинуклеотид кодирует один или более полипептидов, содержащих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

А) 1) последовательности варибельного домена легкой цепи, являющейся по меньшей мере на 90% идентичной последовательности варибельного домена легкой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 95-105, 163-165;

2) последовательности варибельного домена тяжелой цепи, являющейся по меньшей мере на 90% идентичной последовательности варибельного домена тяжелой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 29-39, 145-147;

3) варибельного домена легкой цепи согласно (1) и варибельного домена тяжелой цепи согласно (2); и

В) варибельного домена легкой цепи, содержащего CDR1, CDR2, CDR3, и/или варибельного домена тяжелой цепи, содержащего CDR1, CDR2, CDR3, которые являются одинаковыми или различаются не более чем на три аминокислотные вставки, замены и/или делеции в каждом CDR из следующих последовательностей:

1) CDR1 (SEQ ID NO: 106), CDR2 (SEQ ID NO: 117), CDR3 (SEQ ID NO: 128) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 40), CDR2 (SEQ ID NO: 51), CDR3 (SEQ ID NO: 62) тяжелой цепи, принадлежащие Ab1;

2) CDR1 (SEQ ID NO: 107), CDR2 (SEQ ID NO: 118), CDR3 (SEQ ID NO: 129) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 41), CDR2 (SEQ ID NO: 52), CDR3 (SEQ ID NO: 63) тяжелой цепи, принадлежащие Ab2;

3) CDR1 (SEQ ID NO: 108), CDR2 (SEQ ID NO: 119), CDR3 (SEQ ID NO: 130) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 42), CDR2 (SEQ ID NO: 53), CDR3 (SEQ ID NO: 64) тяжелой цепи, принадлежащие Ab3;

4) CDR1 (SEQ ID NO: 109), CDR2 (SEQ ID NO: 120), CDR3 (SEQ ID NO: 131) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 43), CDR2 (SEQ ID NO: 54), CDR3 (SEQ ID NO: 65) тяжелой цепи, принадлежащие Ab4;

5) CDR1 (SEQ ID NO: 110), CDR2 (SEQ ID NO: 121), CDR3 (SEQ ID NO: 132) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 44), CDR2 (SEQ ID NO: 55), CDR3 (SEQ ID NO: 66) тяжелой цепи, принадлежащие Ab5;

6) CDR1 (SEQ ID NO: 111), CDR2 (SEQ ID NO: 122), CDR3 (SEQ ID NO: 133) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 45), CDR2 (SEQ ID NO: 56), CDR3 (SEQ ID NO: 67) тяжелой цепи, принадлежащие Ab6;

7) CDR1 (SEQ ID NO: 112), CDR2 (SEQ ID NO: 123), CDR3 (SEQ ID NO: 134) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 46), CDR2 (SEQ ID NO: 57), CDR3 (SEQ ID NO: 68) тяжелой цепи, принадлежащие Ab7;

8) CDR1 (SEQ ID NO: 113), CDR2 (SEQ ID NO: 124), CDR3 (SEQ ID NO: 135) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 47), CDR2 (SEQ ID NO: 58), CDR3 (SEQ ID NO: 69) тяжелой цепи, принадлежащие Ab8;

9) CDR1 (SEQ ID NO: 114), CDR2 (SEQ ID NO: 125), CDR3 (SEQ ID NO: 136) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 48), CDR2 (SEQ ID NO: 59), CDR3 (SEQ ID NO: 70) тяжелой цепи, принадлежащие Ab9;

10) CDR1 (SEQ ID NO: 115), CDR2 (SEQ ID NO: 126), CDR3 (SEQ ID NO: 137) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 49), CDR2 (SEQ ID NO: 60), CDR3 (SEQ ID NO: 71) тяжелой цепи, принадлежащие Ab10;

11) CDR1 (SEQ ID NO: 116), CDR2 (SEQ ID NO: 127), CDR3 (SEQ ID NO: 138) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 50), CDR2 (SEQ ID NO: 61), CDR3 (SEQ ID NO: 72) тяжелой цепи, принадлежащие Ab11;

12) CDR1 (SEQ ID NO: 166), CDR2 (SEQ ID NO: 169), CDR3 (SEQ ID NO: 172) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 148), CDR2 (SEQ ID NO: 151), CDR3 (SEQ ID NO: 154) тяжелой цепи, принадлежащие Ab30;

13) CDR1 (SEQ ID NO: 167), CDR2 (SEQ ID NO: 170), CDR3 (SEQ ID NO: 173) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 149), CDR2 (SEQ ID NO: 152), CDR3 (SEQ ID NO: 155) тяжелой цепи, принадлежащие Ab32; и

14) CDR1 (SEQ ID NO: 168), CDR2 (SEQ ID NO: 171), CDR3 (SEQ ID NO: 174) легкой цепи или CDR1 (SEQ ID NO: 150), CDR2 (SEQ ID NO: 153), CDR3 (SEQ ID NO: 156) тяжелой цепи, принадлежащие Ab33.

В предпочтительных вариантах осуществления полипептид, кодируемый выделенной нуклеиновой кислотой, является компонентом антигенсвязывающего белка, который связывает ST2.

Нуклеотидные последовательности, соответствующие описанным в данном описании аминокислотным последовательностям, предназначенные для того, чтобы служить зондами или праймерами для выделения нуклеиновых кислот или поисковыми последовательностями для проведения поиска по базам данных, можно получить при помощи "обратной трансляции" аминокислотных последовательностей или при помощи определения участков аминокислотной идентичности с полипептидами, для которых была определена кодирующая последовательность ДНК. Хорошо известную процедуру полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно применять для выделения и амплификации последовательности ДНК, кодирующей ST2-антигенсвязывающие белки или необходимую комбинацию полипептидных фрагментов ST2-антигенсвязывающего белка. Олигонуклеотиды, которые определяют необходимые концы в комбинации из фрагментов ДНК, применяют в качестве 5'- и 3'-праймеров. Олигонуклеотиды могут дополнительно содержать участки распознавания рестрикционных эндонуклеаз, чтобы облегчить инсерцию амплифицированной комбинации из фрагментов ДНК в экспрессионный вектор. Методы ПЦР описаны в Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196 и *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Молекулы нуклеиновых кислот согласно изобретению включают ДНК и РНК как в одноцепочечной, так и в двухцепочечной формах, а также соответствующие комплементарные последовательности. ДНК включают, например, кДНК, геномную ДНК, химически синтезированную ДНК, ДНК, амплифицированную при помощи ПЦР, и их комбинации. Молекулы нуклеиновых кислот согласно изобретению включают полноразмерные гены или молекулы кДНК, а также комбинации из их фрагментов. Нуклеиновые кислоты согласно изобретению предпочтительно получены из источников человеческого происхождения, но в изобретение также включены нуклеиновые кислоты, полученные от других видов.

"Выделенной нуклеиновой кислотой" является нуклеиновая кислота, которая была отделена от смежных генетических последовательностей, присутствующих в геноме организма, из которого была выделена нуклеиновая кислота, в случае нуклеиновых кислот, выделенных из источников природного происхождения. В случае нуклеиновых кислот, ферментативно синтезированных с матрицы или синтезированных химически, таких как продукты ПЦР, молекулы кДНК или, например, олигонуклеотиды,

понятно, что нуклеиновые кислоты, полученные при помощи данных процессов, являются выделенными нуклеиновыми кислотами. Выделенной молекулой нуклеиновой кислоты называется молекула нуклеиновой кислоты в виде отдельного фрагмента или в виде компонента более крупной нуклеотидной конструкции. В одном предпочтительном варианте осуществления нуклеиновые кислоты являются в значительной степени чистыми от примесного эндогенного материала. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты получена из ДНК или РНК, которые по меньшей мере один раз были выделены, по существу, в чистом виде в количестве или при концентрации, которые позволяют провести идентификацию, обработку и выделение компонентов их нуклеотидных последовательностей стандартными биохимическими методами (такими как те, что описаны в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Такие последовательности предпочтительно предоставляются и/или конструируются в виде открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними нетранслируемыми последовательностями, или интронами, которые обычно присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслируемой ДНК могут присутствовать в направлениях 5' или 3' от открытой рамки считывания, где они не мешают манипуляциям с или экспрессии кодирующей области.

Также в настоящее изобретение включены нуклеиновые кислоты, которые гибридизируются в условиях умеренной жесткости и более предпочтительно в условиях высокой жесткости с нуклеиновыми кислотами, кодирующими описанные в данном описании ST2-антигенсвязывающие белки. Базовые параметры, влияющие на выбор условий гибридизации, и руководство по выбору подходящих условий приведены в Sambrook, Fritsch and Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., главы 9 и 11; и *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., разделы 2.10 и 6.3-6.4), и могут быть легко определены специалистами в данной области техники на основании, например, длины и/или состава оснований ДНК. Один из способов обеспечения условий умеренной жесткости включает использование раствора для предварительной отмывки, содержащего 5×SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0), гибридизационного буфера из приблизительно 50%-го формамида, 6×SSC, и температуры гибридизации примерно 55°C (либо других сходных гибридизационных растворов, таких как раствор, содержащий приблизительно 50%-ный формамид, с температурой гибридизации примерно 42°C), и отмывочных условий при примерно 60°C, в 0,5×SSC, 0,1% SDS. В общем случае условия высокой жесткости определяются так же, как и приведенные выше условия гибридизации, но с отмывкой при приблизительно 68°C, 0,2×SSC, 0,1% SDS. В гибридизационном и отмывочном буферах SSC (1×SSC представляет собой 0,15 M NaCl и 15 mM цитрата натрия) можно заменить на SSPE (1×SSPE представляет собой 0,15 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ и 1,25 mM EDTA, pH 7,4); отмывку проводят через 15 мин после завершения гибридизации.

Стоит понимать, что отмывочную температуру и концентрацию соли можно при необходимости доводить так, как это необходимо для достижения желаемой степени жесткости, опираясь на основные принципы, которые влияют на реакции гибридизации и стабильность спиралей, как известно специалистам в данной области техники и дополнительно описано ниже (см., например, Sambrook et al., 1989). При гибридизации нуклеиновой кислоты с целевой нуклеиновой кислотой из неизвестной последовательности за длину гибрида принимают длину гибридизирующейся нуклеиновой кислоты. При гибридизации нуклеиновых кислот с известными последовательностями длину гибрида можно определить путем выравнивания нуклеотидных последовательностей и выявления области или областей с оптимальной комплементарностью последовательностей. Температура гибридизации для гибридов с предполагаемой длиной менее 50 пар оснований должна быть на 5-10°C ниже температуры плавления (T_m) гибрида, при этом T_m определяют согласно следующим уравнениям. Для гибридов длиной менее 18 пар оснований: $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2(\# \text{ оснований } A+T) + 4(\# \text{ оснований } G+C)$. Для гибридов длиной более 18 пар оснований: $T_m (^{\circ}\text{C}) = 81,5 + 16,6(\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41(\%G+C) - (600/N)$, где N - количество оснований в гибриде, а $[\text{Na}^+]$ - концентрация ионов натрия в гибридизационном буфере ($[\text{Na}^+]$ для 1×SSC=0,165 M).

Предпочтительно каждая из гибридизирующихся нуклеиновых кислот имеет длину, составляющую по меньшей мере 15 нуклеотидов (или более предпочтительно по меньшей мере 18 нуклеотидов, или по меньшей мере 20 нуклеотидов, или по меньшей мере 25 нуклеотидов, или по меньшей мере 30 нуклеотидов, или по меньшей мере 40 нуклеотидов, или наиболее предпочтительно по меньшей мере 50 нуклеотидов) либо по меньшей мере 25% (более предпочтительно по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%) от длины нуклеиновой кислоты согласно изобретению, с которой она гибридизируется, и является по меньшей мере на 60% (более предпочтительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99,5%) идентичной последовательностям с нуклеиновой кислотой согласно изобретению, с которой она гибридизируется, причем

идентичность последовательностей определяют путем сравнения последовательностей гибридизирующихся нуклеиновых кислот при выравнивании их таким образом, чтобы максимизировать перекрывание и идентичность, при этом минимизируя гэпы в последовательностях, как более детально описано выше.

Варианты согласно изобретению получают при помощи стандартного сайт-специфического мутагенеза нуклеотидов в ДНК, кодирующей антигенсвязывающий белок, используя кассету или ПЦР-мутагенез либо другие известные в данной области техники способы для получения ДНК, кодирующей вариант, и впоследствии экспрессируя рекомбинантную ДНК в клеточной культуре, как описывается в данном описании. При этом фрагменты антигенсвязывающего белка, содержащие варианты CDR, имеющие в своем составе до примерно 100-150 остатков, можно получать при помощи *in vitro* синтеза, используя известные методы. Обычно варианты демонстрируют такую же качественную биологическую активность, что и их аналоги природного происхождения, например связывание с ST2, хотя варианты также можно выбирать так, чтобы они имели модифицированные характеристики, как более детально будет описано ниже.

Для специалиста в данной области техники понятно, что вследствие дегенерации генетического кода можно получить очень большое количество нуклеиновых кислот, все из которых кодируют CDR (а также тяжелые и легкие цепи или другие компоненты антигенсвязывающего белка) согласно изобретению. Таким образом, определив состав конкретной аминокислотной последовательности, специалисты в данной области техники могут получить любое количество различных нуклеиновых кислот, просто модифицируя последовательность одного или более кодонов способом, который не приводит к изменению аминокислотной последовательности кодируемого белка.

Также в настоящем изобретении предложены экспрессионные системы и конструкции в виде плазмид, экспрессионных векторов, транскрипционных или экспрессионных кассет, которые содержат по меньшей мере один из вышеописанных полинуклеотидов. Дополнительно в изобретении предложены клетки-хозяева, содержащие такие экспрессионные системы или конструкции.

Обычно экспрессионные векторы применяют в любых клетках-хозяевах, которые содержат последовательности для поддержания плазмид и для клонирования и экспрессии экзогенных нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности, в совокупности называемые "фланкирующими последовательностями", в определенных вариантах осуществления обычно содержат одну или более из следующих нуклеотидных последовательностей: промотор, одну или более энхансерных последовательностей, точку начала репликации, последовательность терминации транскрипции, полную интронную последовательность, содержащую донорный и акцепторный сайт сплайсинга, последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептида, участок связывания рибосомы, последовательность полиаденилирования, полилинкерный участок для инсерции нуклеиновой кислоты, кодирующей предназначенный для экспрессии полипептид, и селективируемый маркерный элемент. Каждая из этих последовательностей обсуждается ниже.

Необязательно, вектор может содержать последовательность, кодирующую "метку", т.е. молекулу олигонуклеотида, расположенную в 5' или 3' конце кодирующей последовательности ST2-антигенсвязывающего белка; олигонуклеотидная последовательность кодирует полиHis (например, гексаHis) или любую другую "метку", такую как FLAG, HA (гемагглютинин вируса гриппа) или тус, для которых существуют коммерчески доступные антитела. Обычно такая метка сливается с полипептидом при экспрессии полипептида и может служить в качестве средства для аффинной очистки или детекции ST2-антигенсвязывающего белка в клетке-хозяине. Аффинную очистку можно осуществить, например, при помощи хроматографии на колонках, используя в качестве аффинной матрицы антитела к метке. Необязательно, метку из очищенного ST2-антигенсвязывающего белка можно впоследствии удалить различными способами, такими как применение определенных пептидаз для расщепления.

Фланкирующие последовательности могут быть гомологичными (т.е. полученными от тех же видов и/или штаммов, что и клетка-хозяин), гетерологичными (т.е. полученными от видов, отличных от вида или штамма клетки-хозяина), гибридными (т.е. представляющими комбинацию из фланкирующих последовательностей из более чем одного источника), синтетическими или нативными. Следовательно, источником фланкирующей последовательности может быть любой прокариотический или эукариотический организм, любой организм позвоночного или беспозвоночного животного либо любое растение, при условии, что фланкирующая последовательность является функциональной и может быть активирована механизмом клетки-хозяина.

Фланкирующие последовательности, применяемые в векторах согласно изобретению, можно получить любым из нескольких известных в данной области техники способов. Обычно фланкирующие последовательности, применяемые в данной работе, являются предварительно идентифицированными при помощи картирования и/или расщепления рестрикционными эндонуклеазами и, следовательно, могут быть выделены из соответствующего тканевого источника при помощи подходящих рестрикционных эндонуклеаз. В некоторых случаях может быть известна полная нуклеотидная последовательность фланкирующей последовательности. В данном случае фланкирующую последовательность можно синтезировать при помощи описанных в данном описании методов синтеза или клонирования нуклеиновых кислот.

В случае если известна вся последовательность или фрагмент фланкирующей последовательности, ее можно получить, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и/или при помощи скрининга геномной библиотеки с подходящим зондом, таким как олигонуклеотид и/или фрагмент фланкирующей последовательности того же или другого вида. В случае если фланкирующая последовательность неизвестна, можно выделить фрагмент ДНК, содержащий фланкирующую последовательность, из более крупного участка ДНК, который может содержать, например, кодирующую последовательность или даже другой ген или гены. Выделение можно осуществить при помощи расщепления рестрикционными эндонуклеазами для получения необходимого фрагмента ДНК с последующим выделением с использованием очистки в агарозном геле, хроматографии на колонках Qiagen® (Чатсворт, Калифорния) или других известных специалисту в данной области техники методов. Выбор подходящих ферментов для реализации данной цели не вызовет трудностей у специалиста в данной области техники.

Точкой начала репликации обычно является фрагмент прокариотических векторов экспрессии, приобретаемых на коммерческой основе, и такая точка помогает при амплификации вектора в клетке-хозяине. Если выбранный вектор не содержит начала участка репликации, его можно синтезировать химически на основании известной последовательности и лигировать в вектор. Например, точка начала репликации из плазмиды pBR322 (New England Biolabs, Беверли, Массачусетс) подходит для большинства грамотрицательных бактерий, а большое количество вирусных точек (например, SV40, полиомы, аденовируса, вируса везикулярного стоматита (VSV) или папилломавирусов, таких как HPV или BVP) подходят для клонирующих векторов в клетках млекопитающих. В общем, компонент точки начала репликации не является необходимым для векторов экспрессии млекопитающих (например, точку из SV40 часто используют только потому, что она также содержит ранний вирусный промотор).

Последовательность терминации транскрипции обычно располагается в 3' конце кодирующей области полипептида и служит для терминации транскрипции. Обычно в прокариотических клетках последовательность терминации транскрипции представляет собой богатый G-C фрагмент, за которым следует поли-Т последовательность. Так как данную последовательность легко клонировать из библиотеки или даже приобрести на коммерческой основе как часть вектора, ее также легко синтезировать, используя методы для нуклеотидного синтеза, такие как те, что описаны в данном описании.

Ген селективируемого маркера кодирует белок, необходимый для выживания и роста клетки-хозяина, выращенной в селективной культуральной среде. Типичные гены селективных маркеров кодируют белки, которые (а) придают прокариотическим клеткам-хозяевам устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, тетрациклину или канамицину; (б) восполняют ауксотрофные недостатки в клетках или (с) поставляют необходимые питательные вещества, недоступные в комплексной среде или среде с определенным составом. Конкретными селективируемыми маркерами являются ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину и ген устойчивости к тетрациклину. Также удобно использовать ген устойчивости к неомицину для селекции как в прокариотических, так и в эукариотических клетках-хозяевах.

Другие селективируемые гены можно использовать для амплификации гена, предназначенного для экспрессии.

Амплификация представляет собой процесс, в котором гены, требуемые для выработки белка, необходимого для роста или клеточной выживаемости, многократно повторяются один за другим в пределах хромосом последовательных генераций рекомбинантных клеток. Примеры подходящих для клеток млекопитающих селективируемых маркеров включают гены дегидрофолатредуктазы (DHFR) и беспромоторной тимидинкиназы. Трансформанты клеток млекопитающих попадают под селекционное давление, когда только трансформанты однозначно приспособлены к выживанию благодаря присутствию в векторе селективируемого гена. Селекционное давление обусловлено культивированием трансформированных клеток в условиях, в которых концентрация селекционного вещества в среде значительно повышена, что приводит к амплификации как селективируемого гена, так и ДНК, которая кодирует другой ген, такой как антигенсвязывающий белок антитела, которое связывается с полипептидом ST2. В результате из амплифицированной ДНК синтезируется повышенное количество полипептида, такого как ST2-антигенсвязывающий белок.

Участок связывания рибосомы обычно необходим для инициации трансляции мРНК и представляет собой последовательность Шайна-Дальгарно (прокариоты) или последовательность Козака (эукариоты). Данный элемент обычно расположен в направлении 3' к промотору и в направлении 5' к кодирующей последовательности экспрессируемого полипептида. В определенных вариантах осуществления одна или более кодирующих областей могут быть функционально связанными с внутренним участком связывания рибосомы (IRES), что делает возможной трансляцию двух открытых рамок считывания с одного РНК-транскрипта.

В некоторых случаях, например, если необходимо гликозилирование в экспрессионной системе эукариотической клетки-хозяина, можно оперировать разными пре- и пропоследовательностями для того, чтобы улучшить гликозилирование либо выход продукта. Например, можно внести изменения в участок расщепления пептидазой определенного сигнального пептида либо добавить пропоследовательности, которые также могут влиять на гликозилирование. Конечный белковый продукт может содержать в -1

позиции (по отношению к первой аминокислоте зрелого белка) одну или более дополнительных аминокислот, свойственных для экспрессии, которые могли оказаться не полностью удаленными. Например, конечный белковый продукт может содержать один или два аминокислотных остатка, обнаруживаемых в участке расщепления пептидазой, присоединенных к аминоконцу. Альтернативно, использование некоторых участков расщепления ферментами может привести к появлению слегка усеченной формы требуемого полипептида, в случае, если фермент делает надрез в такой области в пределах зрелого полипептида.

Экспрессионные и клонирующие векторы согласно изобретению обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой, кодирующей ST2-антигенсвязывающий белок. Промоторы являются нетранскрибируемыми последовательностями, расположенными выше (т.е. в направлении 5') стартового кодона структурного гена (обычно в пределах от примерно 100 до 1000 п.о.), которые управляют транскрипцией структурного гена. Традиционно промоторы объединяют в два класса: индуцибельные промоторы и конститутивные промоторы. Индуцибельные промоторы инициируют повышение уровня транскрипции из контролируемой ими ДНК в ответ на некоторые изменения условий культивирования, такие как наличие или отсутствие питательных веществ или изменение температуры. Конститутивные промоторы, с другой стороны, постоянно транскрибируют ген, с которым они функционально связаны, при этом контроль генной экспрессии является слабым или отсутствует. Большое количество промоторов, распознаваемых потенциальными клетками-хозяевами, являются хорошо известными. Подходящий промотор функционально связывают с ДНК, кодирующей тяжелую цепь или легкую цепь, содержащую ST2-антигенсвязывающий белок согласно изобретению, путем удаления промотора из исходной ДНК при помощи расщепления рестрикционными ферментами и вставки требуемой промоторной последовательности в вектор.

В данной области техники также известны промоторы, подходящие для применения с дрожжевыми организмами-хозяевами. Дрожжевые энхансеры предпочтительно используются с дрожжевыми промоторами. Промоторы, подходящие для использования в клетках-хозяевах млекопитающих, хорошо известны и включают, но не ограничиваются этим, те, которые получены из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как аденовирус-2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирусы, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно вирус обезьян 40 (SV40). Другие подходящие для млекопитающих промоторы включают гетерологичные промоторы для млекопитающих, например промоторы теплового шока и промотор актина.

Дополнительные промоторы, которые могут представлять интерес, включают, но не ограничиваются этим: ранний промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); промотор CMV (Thornsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); промотор, находящийся в 3' длинном концевом повторе вируса саркомы Payca (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-797); промотор герпесной тимидинкиназы (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); промотор и регуляторные последовательности из гена металлотинина (Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42) и прокариотические промоторы, такие как промотор бета-лактамазы (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); или тас-промотор (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). Также интерес представляют следующие транскрипционные контрольные области животного происхождения, которые проявляют тканевую специфичность и использовались на трансгенных животных: контрольная область гена эластазы I, которая активна в панкреатических ациноцитах (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); контрольная область гена инсулина, которая активна в панкреатических бета-клетках (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); контрольная область гена иммуноглобулина, которая активна в лимфоцитах (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); контрольная область вируса опухоли молочной железы мышей, которая активна в клетках тестикул, молочной железы, лимфоцитах и тучных клетках (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); контрольная область гена альбумина, которая активна в печени (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); контрольная область гена альфа-фетопротеина, которая активна в печени (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53-58); контрольная область гена 1-антитрипсина, которая активна в печени (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); контрольная область гена бета-глобина, которая активна в миелоидных клетках (Mogam et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94); контрольная область гена основного белка миелина, которая активна в олигодендроцитах головного мозга (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); контрольная область гена легкой цепи-2 миозина, которая активна в скелетных мышцах (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); и контрольная область гена гонадотропного рилизинг-гормона, которая активна в гипоталамусе (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378).

Энхансерную последовательность можно вставить в вектор, чтобы усилить транскрипцию ДНК, кодирующей легкую цепь или тяжелую цепь, содержащую ST2-антигенсвязывающий белок по изобретению, высшими эукариотами. Энхансеры представляют собой цис-действующие элементы ДНК, длиной, как правило, примерно 10-300 п.о., которые воздействуют на промотор так, чтобы усилить транскрипцию. Энхансеры относительно ориентационно и позиционно независимы и обнаруживаются как в 5', так

и в 3' позициях относительно транскрипционной единицы. Известно несколько энхансерных последовательностей, доступных из генов животных (например, глобина, эластазы, альбумина, альфа-фетопротеина и инсулина). Однако используются, как правило, энхансеры, полученные из вирусов. Известные в данной области техники энхансер SV40, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы и энхансеры аденовирусов являются примерами энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов. Хотя энхансер может находиться в векторе как в 5', так и в 3' положении относительно кодирующей последовательности, обычно он расположен в позиции 5' от промотора. В экспрессионный вектор можно включить последовательность, кодирующую соответствующую нативную или гетерологичную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальный пептид) для того, чтобы стимулировать внеклеточную секрецию антител. Выбор сигнального пептида или лидера зависит от типа клеток-хозяев, в которых будут вырабатываться антитела, а гетерологичная сигнальная последовательность может заменить нативную сигнальную последовательность. Примеры функциональных в клетках-хозяевах млекопитающих сигнальных пептидов включают следующие: сигнальную последовательность для интерлейкина-7 (IL-7), описанную в патенте США № 4965195; сигнальную последовательность для рецептора интерлейкина-2, описанную в Cosman et al., 1984, *Nature* 312:768; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-4, описанный в Европейском патенте № 0367566; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа I, описанный в патенте США № 4968607; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа II, описанный в Европейском патенте № 0460846.

Вектор может содержать один или более элементов, которые способствуют экспрессии в случае, когда вектор интегрирован в геном клетки-хозяина. Примеры включают элемент EASE (Aldrich et al. 2003 *Biotechnol Prog.* 19:1433-38) и участок прикрепления к ядерному матриксу (MAR - от англ. "matrix attachment region"). MAR опосредуют структурное упорядочение хроматина и могут защитить интегрированный вектор от эффекта "положения". Таким образом, MAR исключительно полезны в случае использования векторов для получения стабильных трансфектантов. В данной области техники известно множество природных и синтетических MAR-содержащих нуклеиновых кислот, описанных, например, в патентах США №№ 6239328; 7326567; 6177612; 6388066; 6245974; 7259010; 6037525; 7422874; 7129062.

Векторы экспрессии согласно изобретению можно конструировать на основе исходного вектора, такого как коммерчески доступный вектор. Такие векторы могут содержать или не содержать все необходимые фланкирующие последовательности. Если одна или более из описанных в данном описании фланкирующих последовательностей не присутствуют в векторе изначально, их можно получить отдельно и лигировать в вектор. Способы, используемые для получения любой из фланкирующих последовательностей, хорошо известны специалисту в данной области техники.

После того как вектор был сконструирован, а молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь, тяжелую цепь или легкую цепь и тяжелую цепь, содержащие ST2-антигенсвязывающую последовательность, была вставлена в соответствующий участок вектора, полноценный вектор можно вносить в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Трансформацию вектора экспрессии для ST2-антигенсвязывающего белка в выбранную клетку-хозяина можно осуществить при помощи широко известных методов, включая трансфекцию, инфицирование, совместное осаждение фосфата кальция, электропорацию, микроинъекцию, липофекцию, DEAE-декстран опосредованную трансфекцию или другие известные методы. Выбранный метод будет частично зависеть от типа используемой клетки-хозяина. Эти методы и другие подходящие методы хорошо известны специалисту в данной области техники и приведены, например, в Sambrook et al., 2001, выше.

Клетка-хозяин при культивировании в соответствующих условиях синтезирует ST2-антигенсвязывающий белок, который впоследствии можно изъять из культуральной среды (если клетка-хозяин секретирует в среду) либо прямо из продуцирующей его клетки-хозяина (если он не секретируется). Выбор подходящей клетки-хозяина зависит от различных факторов, таких как требуемые уровни экспрессии, полипептидные модификации, которые желательны или необходимы для активности (такой как гликозилирование или фосфорилирование) и легкости фолдинга в биологически активную молекулу. Клетка-хозяин может быть эукариотической или прокариотической.

Доступные в качестве организмов-хозяев для экспрессии клеточные линии млекопитающих хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются этим, иммортализованные клеточные линии, доступные из Американской коллекции типовых культур (ATCC), и любые клеточные линии, используемые в известной в данной области экспрессионной системе, можно применять для получения рекомбинантных полипептидов согласно изобретению. В общем, клетки-хозяев трансформируют при помощи рекомбинантных векторов экспрессии, которые содержат ДНК, кодирующую требуемый полипептид антитела к ST2. Среди клеток-хозяев, которые можно применять в данных целях, находятся прокариоты, дрожжевые или высшие эукариотические клетки. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например *E. coli* или бациллы. Высшие эукариотические клетки включают клетки насекомых и устойчивые клеточные линии, происходящие от млекопитающих. Примеры подходящих клеточных линий млекопитающих включают линию COS-7 клеток почек обезьян (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, *Cell* 23:175), L-клетки, клетки 293, клетки C127, клетки 3T3 (ATCC CCL 163), клетки яичников китайского хомячка (CHO) или их производные, такие как Veggie CHO и родст-

венные клеточные линии, которые растут в бессывороточных средах (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31), клетки HeLa, клеточные линии BHK (ATCC CRL 10) и клеточную линию CVI/EBNA, полученную из клеточной линии почек африканской зеленой марышки CVI (ATCC CCL 70), как описано в McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821, человеческие эмбриональные клетки почек, такие как 293, 293 EBNA или MSR 293, человеческие эпидермальные клетки A431, человеческие клетки Colo205, другие трансформированные клеточные линии приматов, нормальные диплоидные клетки, клеточные штаммы, полученные из *in vitro* культуры первичной ткани, первичные эксплантаты, HL-60, U937, HaK или клетки Юрката. В некоторых случаях клеточные линии млекопитающих, такие как, например, HepG2/3B, KB, NIH 3T3 или S49, можно использовать для экспрессии полипептида, когда полипептид необходимо использовать в различных методах сигнальной трансдукции или репортерных методах. Альтернативно, можно осуществлять выработку полипептида в низших эукариотах, таких как дрожжи, или в прокариотах, таких как бактерии. Подходящие виды дрожжей включают *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, штаммы *Kluyveromyces*, *Candida* или любые дрожжевые штаммы, способные экспрессировать гетерологичные полипептиды. Подходящие бактериальные штаммы включают *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* или любые бактериальные штаммы, способные экспрессировать гетерологичные полипептиды. Если полипептид получен из дрожжей или бактерий, может возникнуть необходимость модифицировать вырабатываемый ими полипептид, например, при помощи фосфорилирования или гликозилирования соответствующих участков, с целью получения функционального полипептида. Такие ковалентные присоединения можно осуществить, используя известные химические или ферментативные методы. Также полипептид можно получить, функционально связав выделенную нуклеиновую кислоту, являющуюся объектом изобретения, с подходящими контрольными последовательностями в одном или более векторе экспрессии насекомых и используя экспрессионную систему насекомых. Материалы и методы для экспрессионных систем на основе клеток бакуловирусов/насекомых коммерчески доступны в виде наборов, к примеру, от Invitrogen, Сан-Диего, Калиф., США (MaxBac® kit), а такие методы хорошо известны в данной области техники и описаны в Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) и Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). Также можно применять бесклеточные трансляционные системы для получения полипептидов при помощи РНК, полученных из раскрытых в данном описании нуклеотидных конструкций. Подходящие клонирующие и экспрессионные векторы для применения в клетках-хозяевах бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих описаны в Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985). Клетка-хозяин, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту по изобретению, предпочтительно функционально связанную по меньшей мере с одной экспрессионной контрольной последовательностью, называется "рекомбинантной клеткой-хозяином".

В определенных вариантах осуществления клеточные линии могут быть выбраны путем определения, какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии, и постоянно вырабатывают антигенсвязывающие белки со свойствами связывания ST2. В другом варианте осуществления может быть выбрана клеточная линия из линии В-клеток, которая не вырабатывает собственных антител, но обладает способностью вырабатывать и секретировать гетерологичные антитела.

ST2-антигенсвязывающие белки, разрушающие клетки.

В предпочтительных вариантах осуществления ST2-антигенсвязывающий белок связывает ST2 и подавляет связывание IL-33, тем самым снижая IL-33-опосредованную передачу сигнала в экспрессирующих ST2 клетках. При этом в определенных вариантах осуществления ST2-антигенсвязывающий белок связывает ST2 и нацелен на разрушение экспрессирующих ST2 клеток. Конечно ST2-антигенсвязывающий белок может подавлять связывание IL-33 и быть нацеленным на разрушение ST2-клеток.

Разрушающие клетки ST2-антигенсвязывающие белки исключительно эффективны при лечении заболеваний, связанных со сверхэкспрессией ST2, например воспалительных заболеваний или экспрессирующих ST2 опухолей. Методы нацеливания на клетки антигенсвязывающих белков, например антител, хорошо известны в данной области техники. Примеры вариантов реализации обсуждаются ниже.

Конъюгаты антитела с лекарственным средством.

Варианты осуществления данного изобретения включают конъюгаты антитела с лекарственным веществом (ADC - от англ. "antibody drug conjugates"). В общем случае ADC содержит антитело, конъюгированное с химиотерапевтическим агентом, например цитотоксическим агентом, цитостатическим агентом, токсином или радиоактивным агентом. Для конъюгации лекарственного средства с антителом можно использовать линкерную молекулу. В данной области техники известно множество линкеров и лекарственных средств, которые подходят для применения в ADC и могут быть использованы в осуществлении настоящего изобретения (см. US 20090028856; US 2009/0274713; US 2007/0031402; WO 2005/084390; WO 2009/099728; US 5208020; US 5416064; US 5475092; US 5585499; US 6436931; US 6372738 и US 6340701, которые все включены в данное описание посредством ссылки).

Линкеры.

В определенных вариантах осуществления ADC содержит линкер, состоящий из одного или более связующих компонентов. Примеры связующих компонентов включают 6-малеимидокапроил, малеими-

допропаноил, валин-цитруллин, аланин-фенилаланин, п-аминобензилоксикарбонил и те, которые получают вследствие конъюгации со связующими реагентами, включая, но не ограничиваясь этим, N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат ("SPP"), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат ("SMCC," также называемый в данном описании "MCC") и N-сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоат ("SIAB").

Линкеры могут быть "отщепляемыми" линкерами или "неотщепляемыми" линкерами (Ducry and Stump, Bioconjugate Chem. 2010, 21, 5-13; в полном объеме включенная в данное описание посредством ссылки). Отщепляемые линкеры сконструированы так, чтобы высвобождать лекарственное средство при воздействии определенных внешних факторов, например при интернализации клеткой-мишенью. Отщепляемые линкеры включают кислотолабильные линкеры, линкеры, чувствительные к протеазам, фотоллабильные линкеры, диметилловые линкеры или дисульфидсодержащие линкеры. Неотщепляемые линкеры остаются ковалентно связанными по меньшей мере с одной аминокислотой антитела и лекарственным средством при интернализации и деградации внутри клетки-мишени. Примером неотщепляемого линкера является MCC.

Лекарственные средства.

В определенных вариантах осуществления антитело конъюгировано с химиотерапевтическим агентом. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN.TM.); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (в особенности буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетические аналоги топотекана); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его адозелезиновые, карзелезиновые и бизелезиновые синтетические аналоги); криптофицины (в особенности криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CBI-TMI); элетутербин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, меклоретамин, гидрохлорид оксида мехлоретамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урацилиприл; нитромочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, в особенности калихеамицин гамма 1 и калихеамицин тета I, см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); динемидин, включая динемидин А, эсперамицин; а также неокарциностатиновый хромофор и родственные хромопротеинэнединовые антибиотические хромофоры), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин; хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин (включая морфолино-доксорубин, цианоморфолино-доксорубин, 2-пирролино-доксорубин и дезоксидоксорубин), эпирубин, эзорубин, идарубин, марцелломицин, митомицины, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромидин, квеламицин, родорубин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностатин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; антиадренальные вещества, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фролиниевая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиковон; эльфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK.RTM.; разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогерманиум; тенауазоновую кислоту; триазиковон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (в особенности токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например паклитаксел (TAXOL.TM., Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Йорк) и доксетаксел (TAXOTERE.RTM., Rhone-Poulenc Rorer, Энтони, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоклутетин; кселоду; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноевую кислоту, капецитабин и фармацевтические приемлемые соли, кислоты или производные любых вышеперечисленных соединений. Также в данное определение включены антигормональные агенты, которые регулируют или ингибируют гормональную активность в опухолях, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и

торемифен (Fareston); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гoserелин; миРНК и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых вышеперечисленных соединений. Другие химиотерапевтические агенты, которые можно применять в рамках настоящего изобретения, раскрыты в публикации США № 20080171040 или публикации США 20080305044 и в полном объеме включены в данное описание посредством ссылки.

Предполагается, что антитело может быть конъюгировано с двумя или более разными химиотерапевтическими агентами, либо фармацевтическая композиция может содержать смесь антител, где компоненты антител являются одинаковыми, за исключением того, что они конъюгированы с разными химиотерапевтическими агентами. Такие варианты осуществления могут быть целесообразны при нацеливании на множественные биологические процессы в клетке-мишени.

В предпочтительных вариантах осуществления ADC содержит антитело, конъюгированное с одной или более молекулами майтанзиноида, которые являются митотическими ингибиторами, которые действуют путем подавления полимеризации тубулина. Майтанзиноиды, включая разные модификации, описаны в патентах США №№ 3896111; 4151042; 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; 4371533 и WO 2009/099728. Лекарственные средства на основе майтанзиноидов могут быть выделены из природных источников, получены при помощи рекомбинантных технологий либо изготовлены синтетически. Примеры майтанзиноидов включают C-19-дехлор (патент США № 4256746), C-20-гидроксид (или C-20-деметил)/-C-19-дехлор (патенты США №№ 4307016 и 4361650), C-20-деметокси (или C-20-ацилокси (-OCOR), +/-дехлор (патент США № 4294757), C-9-SH (патент США № 4424219), C-14-алкоксиметил (деметокси/CH₂OR) (патент США № 4331598), C-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH₂OH или CH₂OAc) (патент США № 4450254), C-15-гидроксид/ацилокси (патент США № 4364866), C-15-метокси (патенты США №№ 4313946 и 4315929), C-18-N-деметил (патенты США №№ 4362663 и 4322348) и 4,5-дезоксид (патент США № 4371533).

В зависимости от требуемого типа связи в качестве позиций для связывания можно использовать различные позиции в соединениях майтанзиноидов. Например, для образования эфирной связи хорошо подходят позиция C-3, содержащая гидроксильную группу, позиция C-14, модифицированная гидрокси-метилом, позиция C-15, модифицированная гидроксильной группой, и позиция C-20, содержащая гидроксильную группу (патенты США №№ 5208020, RE39151 и 6913748; патентные публикации США №№ 20060167245 и 20070037972 и WO 2009099728).

Предпочтительные майтанзиноиды включают известные в данной области техники соединения DM1, DM3 и DM4 (патентные публикации США №№ 2009030924 и 20050276812, включенные в данное описание посредством ссылки).

Содержащие майтанзиноиды ADC, способы получения таких ADC и их терапевтические применения описаны в патентах США №№ 5208020 и 5416064, патентной публикации США №№ 20050276812 и WO 2009099728 (которые все включены в данное описание посредством ссылки). Линкеры, подходящие для получения содержащих майтанзиноиды ADC, известны в данной области техники (патент США № 5208020 и патентные публикации США №№ 2005016993 и 20090274713; которые все включены в данное описание посредством ссылки). Содержащие майтанзиноиды ADC, содержащие линкеры SMCC, можно получить согласно описанию, приведенному в патентной публикации США № 2005/0276812.

Антитела с усиленной эффекторной функцией.

Одной из функций Fc-фрагмента антитела является взаимодействие с иммунной системой при связывании антителом своей мишени. Это называется "эффекторной функцией". Данное взаимодействие приводит к антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимому клеточному фагоцитозу (ADCP) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). ADCC и ADCP опосредуются через связывание Fc с Fc-рецепторами на поверхности клеток иммунной системы. CDC опосредуется через связывание Fc с белками системы комплемента, например C1q.

Подклассы IgG различаются по своей способности опосредовать эффекторные функции. Например, IgG1 намного превосходит IgG2 и IgG4 в опосредовании ADCC и CDC. Следовательно, в вариантах осуществления, которые нацелены на разрушение экспрессирующей ST2 клетки, предпочтительным будет IgG1-антитело к ST2.

Эффекторную функцию антитела можно повысить или понизить посредством введения одной или более мутаций в Fc. Варианты осуществления данного изобретения включают антигенсвязывающие белки, например антитела, содержащие Fc, сконструированные так, чтобы повышать эффекторную функцию (США № 7317091 и Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009; которые обе в полном объеме включены в данное описание посредством ссылки). Примеры IgG1 Fc молекул, обладающих повышенной эффекторной функцией, включают (на основе системы нумерации Kabat) те, которые содержат следующие замены:

S239D/I332E,
S239D/A330S/I332E,
S239D/A330L/I332E,
S298A/D333A/K334A,

P247I/A339D,
 P247I/A339Q,
 D280H/K290S,
 D280H/K290S/S298D,
 D280H/K290S/S298V,
 F243L/R292P/Y300L,
 F243L/R292P/Y300L/P396L,
 F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L,
 G236A/S239D/I332E,
 K326A/E333A,
 K326W/E333S,
 K290E/S298G/T299A,
 K290N/S298G/T299A,
 K290E/S298G/T299A/K326E,
 K290N/S298G/T299A/K326E.

Дополнительные варианты осуществления данного изобретения включают антигенсвязывающие белки, например антитела, содержащие Fc, сконструированные так, чтобы понижать эффекторную функцию. Примеры Fc молекул, обладающих пониженной эффекторной функцией, включают (на основе системы нумерации Kabat) те, которые содержат следующие замены:

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

Другим способом повышения эффекторной функции IgG Fc-содержащих белков является снижение фукозилирования Fc. Удаление коровой фукозы из 2-антенарных олигосахаридов комплексного типа, присоединенных к Fc, значительно повышает эффекторную функцию ADCC без изменения в связывании антигена или эффекторной функции CDC. Известно несколько способов снижения либо прекращения фукозилирования Fc-содержащих молекул, например антител. Они включают рекомбинантную экспрессию в определенных клеточных линиях млекопитающих, включая клеточную линию с генным нокаутом FUT8, вариантную CHO-линию Lec13, клеточную линию гибридомы крыс YB2/0, клеточную линию, содержащую малую интерферирующую РНК, специфическую против гена FUT8, и клеточную линию, совместно экспрессирующую β -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III и Гольджи α -маннозидазу II. Альтернативно, Fc-содержащие молекулы могут экспрессироваться в не принадлежащей млекопитающему клетке, такой как растительная клетка, дрожжевая или прокариотическая клетка, например *E. coli*. Следовательно, в определенных вариантах осуществления изобретения композиция содержит антитело, например Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10 или Ab11, характеризующееся сниженным фукозилированием или отсутствием фукозилирования.

Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество одного из множества антигенсвязывающих белков согласно изобретению совместно с фармацевтически эффективными разбавителями, носителями, растворителями, эмульгаторами, консервантами и/или адъювантами. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок является антителом. Фармацевтические композиции согласно изобретению включают, но не ограничиваются этим, жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции.

Предпочтительно вещества для составления лекарственных препаратов нетоксичны для пациента при применяемых дозировках и концентрациях. В конкретных вариантах осуществления предложены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество ST2-антигенсвязывающего белка, например ST2-связывающего антитела.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать вещества для составления лекарственных препаратов для модификации, поддержания или сохранения, например, уровня pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, поглощения или проницаемости композиции. В таких вариантах осуществления подходящие вещества для составления лекарственных препаратов включают, но не ограничиваются этим, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, пролин или лизин); противомикробные вещества; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, Трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); объемобразующие агенты (например, маннит или глицин);

хелатирующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие агенты (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин), наполнители; моносахариды; дисахариды; и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); окрашивающие, ароматизирующие и разбавляющие агенты; эмульгаторы; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как бензалконийхлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимерозал, фенолиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, полипропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты (такие как плуроники, ПЭГ, эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин или тилоксапал); агенты, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); агенты, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия или маннит-сорбит); средства доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адъюванты (см. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company).

В определенных вариантах осуществления оптимальная фармацевтическая композиция определяется специалистом в данной области техники в зависимости от, например, выбранного способа введения, формы доставки и требуемой дозировки (см., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше). В определенных вариантах осуществления такие композиции могут оказывать влияние на физическое состояние, стабильность, скорость *in vivo* высвобождения и скорость *in vivo* выведения антигенсвязывающих белков согласно изобретению. В определенных вариантах осуществления первичный наполнитель или носитель в фармацевтической композиции может быть водного или неводного происхождения. Например, подходящим наполнителем или носителем может быть вода для инъекции, физиологический раствор или искусственная цереброспинальная жидкость, по возможности, с добавлением других веществ, часто употребляемых в композициях для парентерального введения. Дополнительными примерами носителей являются нейтральный буферный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином. В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат Трис-буфер с уровнем pH примерно 7,0-8,5 или ацетатный буфер с pH примерно 4,0-5,5, и могут дополнительно содержать сорбит или его подходящий заменитель. В определенных вариантах осуществления изобретения композиции, содержащие ST2-антигенсвязывающий белок, можно подготовить для хранения путем смешивания выбранной композиции, имеющей необходимую степень очистки, с произвольными агентами для составления лекарственного препарата (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше) в виде лиофилизированной таблетки или водного раствора. Кроме того, в определенных вариантах осуществления продукт, содержащий ST2-антигенсвязывающий белок, можно составить в виде лиофилизата, используя соответствующие вспомогательные вещества, такие как сахароза.

Для фармацевтических композиций согласно изобретению можно избрать парентеральный способ доставки. Альтернативно, для композиций можно избрать ингаляционный способ или доставку через пищеварительный тракт, например пероральную. Получение таких фармацевтически приемлемых композиций известно в данной области техники. Компоненты для составления лекарственного препарата предпочтительно содержатся в концентрациях, которые являются приемлемыми для данного места введения. В определенных вариантах осуществления используют буферы для поддержания в композиции физиологического уровня pH или незначительно меньшего pH, как правило, в интервале от примерно 5 до примерно 8.

В случаях когда предполагается парентеральное введение, терапевтические композиции для применения в данном изобретении могут предоставляться в виде апиrogenного, парентерально приемлемого водного раствора, содержащего необходимый ST2-антигенсвязывающий белок в фармацевтически приемлемом носителе. Особенно подходящим носителем для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой ST2-антигенсвязывающий белок составляют в виде стерильного изотонического раствора с добавлением соответствующих консервантов. В определенных вариантах осуществления получение состава может включать смешивание необходимой молекулы с агентами, такими как инъецируемые микросферы, биоразрушаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечить контролируемое или длительное высвобождение продукта, который затем можно доставить при помощи инъекции веществ замедленного всасывания. В определенных вариантах осуществления можно также применять гиалуроновую кислоту, которая способствует длительному нахождению в системе циркуляции. В определенных вариантах осуществления для внесения необходимого антигенсвязывающего белка можно использовать имплантируемые устройства для доставки лекарственных средств.

Фармацевтические композиции согласно изобретению можно составлять для введения путем ингаляции. В этих вариантах осуществления ST2-антигенсвязывающие белки предпочтительно составляют в виде сухого ингалируемого порошка. В конкретных вариантах осуществления ингаляционные растворы,

содержащие ST2-антигенсвязывающий белок, также можно составлять вместе с пропеллентом для аэрозольной доставки. В определенных вариантах осуществления растворы могут распыляться. Ингаляционное введение и способы составления дополнительно описаны в международной патентной заявке № PCT/US94/001875, которая включена в данное описание посредством ссылки и описывает ингаляционное введение химически модифицированных белков.

Также предполагается, что составы можно вводить перорально. ST2-антигенсвязывающие белки, которые вводят таким способом, можно составлять с или без носителей, обычно используемых при получении твердых дозированных форм, таких как таблетки и капсулы. В определенных вариантах осуществления капсулу можно изготовить таким образом, чтобы высвобождение активной части состава происходило в том месте желудочно-кишечного тракта, где максимизирована биологическая доступность и минимизирована пресистемная деградация. Для облегчения абсорбции ST2-антигенсвязывающего белка можно добавлять дополнительные агенты. Также можно применять разбавители, ароматизаторы, легкоплавкие воски, растительные масла, лубриканты, суспендирующие агенты, вещества для улучшения распадаемости таблеток и связывающие вещества.

Наличие дополнительных фармацевтических композиций очевидно для специалистов в данной области техники, включая составы, содержащие ST2-антигенсвязывающие белки в виде, который обеспечивает длительную или контролируемую доставку. Способы составления большого количества средств длительной или контролируемой доставки, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и инъекция веществ замедленного всасывания, также известны специалистам в данной области техники (см., например, международную патентную заявку № PCT/US 93/00829, которая включена в данное описание посредством ссылки и описывает контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций). Препараты длительного высвобождения могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Матрицы с длительным высвобождением могут содержать сложные полиэфиры, гидрогели, полилактиды (что раскрыто в патенте США № 3773919 и публикации Европейской патентной заявки № EP 058481, которые включены в данное описание посредством ссылки), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 2:547-556), поли-(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 и Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, *supra*) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (публикация Европейской патентной заявки № EP 133988). Композиции с длительным высвобождением могут также содержать липосомы, которые можно получить одним из нескольких известных в данной области техники способов (см., например, Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3688-3692; публикации Европейских патентных заявок № EP 036676; EP 088046 и EP 143949, включенные посредством ссылки).

Фармацевтические композиции для *in vivo* введения обычно получают в виде стерильных препаратов. Стерилизацию можно осуществить путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. В случае, если композиция лиофилизирована, стерилизацию с применением указанного метода можно провести как до, так и после лиофилизации и восстановления. Композиции для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в растворе. Парентеральные композиции обычно помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например пакет для внутривенного раствора или емкость с пробкой, через которую вводится гиподермальная игла для инъекции.

Аспекты данного изобретения включают составы ST2-антигенсвязывающего белка, которые сами служат буфером и которые можно применять в качестве фармацевтических композиций, как описано в международной патентной заявке WO 06138181A2 (PCT/US 2006/022599), которая в полном объеме включена в данное описание посредством ссылки.

Как обсуждалось выше, в определенных вариантах осуществления предложены композиции, содержащие ST2-антигенсвязывающие белки, в частности фармацевтические композиции, содержащие ST2-антигенсвязывающие белки, которые помимо ST2-антигенсвязывающего белка содержат одно или более вспомогательных веществ, таких как те, что описаны в иллюстративных целях в данном разделе и в других частях текста. В связи с этим вспомогательные вещества можно использовать в изобретении для разных целей, таких как регулирование физических, химических или биологических свойств составов, например регулирование вязкости, и/или в процессах согласно изобретению для того, чтобы улучшить эффективность и/или стабилизировать такие составы или процессы в отношении деградации и порчи вследствие, к примеру, воздействий, которые могут иметь место во время производства, перевозки, хранения, предварительного приготовления, введения и так далее.

Доступно большое количество работ по стабилизации белка и используемым в связи с этим методам и веществам для составления препаратов, таких как Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," *Pharm Res.* 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," в *RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE*, Carpenter and Manning, eds. *Pharmaceutical Biotechnology*. 13: 61-84 (2002) и Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," *Pharm Biotechnol.* 13: 159-75 (2002), которые все в полном объеме включены в данное описание посредством ссылки, в частности, в разделах, относящихся к вспомогательным веществам.

вам и соответствующим процессам для получения белковых составов согласно настоящему изобретению, которые сами служат буфером, в особенности к белковым фармацевтическим продуктам и процессам для применения в ветеринарии и/или медицине человека.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения можно использовать соли для того, чтобы, например, регулировать ионную силу и/или изотоничность состава и/или улучшить растворимость и/или физическую стабильность белка либо другого ингредиента композиции согласно изобретению.

Как хорошо известно, ионы могут стабилизировать нативное состояние белков посредством связывания с заряженными остатками на поверхности белка и посредством экранирования заряженных и полярных групп на белке и уменьшения силы их электростатического взаимодействия, притяжения и отталкивания. Также ионы могут стабилизировать денатурированное состояние белка, в частности, посредством связывания с денатурированными пептидными связями ($--CONH$) белка. Более того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами на белке также может уменьшить внутримолекулярное электростатическое взаимодействие и, тем самым, предотвратить или снизить агрегацию пептида и нерастворимость.

Разновидности ионов существенно различаются по своему воздействию на белки. Было создано большое число классификаций для ионов и их воздействия на белки, которые можно использовать при составлении фармацевтических композиций согласно изобретению. Одним из примеров является ряд Гофмейстера, в котором ионные и полярные неионные растворы располагаются в соответствии со своим воздействием на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворы называются "космотропными". Дестабилизирующие растворы называются "хаотропными". Космотропы обычно используют при высоких концентрациях (например, >1 -молярного сульфата аммония) для преципитации белков из раствора ("высаливание"). Хаотропы обычно используют для денатурации и/или растворения белков ("всаливание"). Относительная эффективность ионов при "всаливании" и "высаливании" определяет их положение в ряде Гофмейстера.

Согласно различным вариантам осуществления изобретения в составах, содержащих ST2-антигенсвязывающий белок, можно применять свободные аминокислоты в качестве объемообразующих агентов, стабилизаторов и антиоксидантов, а также для других стандартных применений. Лизин, пролин, серин и аланин можно использовать для стабилизации белков в составах. Глицин подходит для применения в лиофилизации для того, чтобы гарантировать правильную структуру и свойства таблеток. Аргинин можно применять для подавления агрегации белка как в жидких, так и в лиофилизированных составах. Метионин подходит в качестве антиоксиданта.

Полиолы включают сахара, например манит, цукрозу и сорбит, и многоатомные спирты, такие как, к примеру, глицерин и пропиленгликоль, и в целях обсуждения в данном описании полиэтиленгликоль (ПЭГ) и родственные соединения. Полиолы являются космотропными. Они являются приемлемыми стабилизирующими агентами как в жидких, так и в лиофилизированных составах для защиты белка от физических и химических процессов деградации. Также полиолы применимы для регулирования тоничности составов.

Среди полиолов, применяемых в избранных вариантах осуществления, можно назвать манит, который обычно используют для гарантии структурной стабильности таблетки в лиофилизированных составах. Он обеспечивает структурную стабильность таблетки. Как правило, его используют вместе с лиопротектантом, например сахарозой. Сорбит и сахароза являются одними из предпочтительных агентов для регулирования тоничности и в качестве стабилизаторов для защиты при замораживании-размораживании во время транспортировки либо при получении больших объемов препаратов во время процесса производства. Восстановительные сахара (которые содержат альдегидные либо кетонные группы), такие как глюкоза и лактоза, могут гликировать поверхностные остатки лизина и аргинина. Следовательно, в общем случае они не являются предпочтительными полиолами для применения согласно изобретению. В дополнение, сахара, которые образуют такие реактивные соединения, такие как сахароза, которая в кислотных условиях гидролизует до фруктозы и глюкозы и, следовательно, стимулирует гликирование, также не являются в данном отношении предпочтительными полиолами согласно изобретению. ПЭГ применим для стабилизации белков и в качестве криопротектанта, и также может быть в данном отношении применен в изобретении.

Варианты осуществления составов, содержащих ST2-антигенсвязывающие белки, дополнительно включают поверхностно-активные вещества. Белковые молекулы могут адсорбироваться на поверхностях и денатурировать с последующей агрегацией на поверхностях раздела воздух-жидкость, твердое тело-жидкость и жидкость-жидкость. В общем случае эти эффекты обратно пропорциональны концентрации белка. Эти вредные взаимодействия, как правило, обратно пропорциональны концентрации белка и обычно усиливаются при физическом воздействии, таком как то, что возникает во время транспортировки и эксплуатации продукта.

Поверхностно-активные вещества обычно используют для предотвращения, минимизации или снижения физической адсорбции. Полезные в этом отношении поверхностно-активные вещества согласно изобретению включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие эфиры жирных кислот полиэтоксилатов

сорбитана и полоксамер 188.

Поверхностно-активные вещества обычно используют для контроля конформационной стабильности белка. В этой связи использование поверхностно-активных веществ является белок-специфическим, так как любое заданное поверхностно-активное вещество, как правило, стабилизирует одни белки и дестабилизирует другие.

Полисорбаты восприимчивы к окислительной деградации и часто в том виде, в котором они поставляются, содержат достаточное количество пероксидов для того, чтобы привести к окислению боковых цепей белковых остатков, в особенности метионина. Следовательно, применять полисорбаты следует осторожно и использовать при самой низкой эффективной концентрации. В данном отношении полисорбаты отображают общее правило, что вспомогательные вещества следует применять при самых низких эффективных концентрациях.

Варианты осуществления составов, содержащих ST2-антигенсвязывающие белки, дополнительно включают один или более антиоксидантов. Вредный эффект от окисления белков в фармацевтических составах можно в некоторой степени предотвратить посредством поддержания надлежащего уровня атмосферного кислорода и температуры и посредством предотвращения воздействия света. Вспомогательные антиоксиданты можно также использовать для предотвращения окислительной деградации белков. Среди полезных в данном отношении антиоксидантов можно назвать восстановительные агенты, акцепторы кислорода/свободных радикалов и хелатирующие агенты. Антиоксиданты для применения в терапевтических белковых составах согласно изобретению предпочтительно являются водорастворимыми и сохраняют свою активность на протяжении срока хранения продукта. В этом отношении EDTA является предпочтительным антиоксидантом согласно изобретению.

Антиоксиданты могут повредить белки. Например, восстановительные агенты, такие как, в частности, глутатион, могут разрушать внутримолекулярные дисульфидные связи. Следовательно, антиоксиданты для применения в изобретении выбирают так, чтобы, среди прочего, устранить или существенно снизить возможность повреждения ими белков в составах.

Составы согласно изобретению могут содержать ионы металлов, которые являются кофакторами белка и необходимы для образования белковых координационных комплексов, такие как цинк, который необходим для получения определенных инсулиновых суспензий. Ионы металлов также могут подавлять некоторые процессы, в ходе которых происходит деградация белка. При этом ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, в ходе которых происходит деградация белка.

Ионы магния (10-120 мМ) можно применять для подавления изомеризации аспарагиновой кислоты до изоаспарагиновой кислоты. Ионы Ca^{+2} (до 100 мМ) могут увеличивать стабильность дезоксирибонуклеазы человека. Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} при этом могут дестабилизировать рчДНКазу. Аналогично, Ca^{+2} и Sr^{+2} могут стабилизировать фактор VIII, но он может быть дестабилизирован Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} и Fe^{+2} , а его агрегация может быть усилена ионами Al^{+3} .

Варианты осуществления составов, содержащих ST2-антигенсвязывающие белки, дополнительно включают один или более консервантов. Консерванты необходимы при разработке парентеральных составов, рассчитанных на многодозовое дозирование, которое подразумевает неодноразовое использование из одного и того же контейнера. Их первостепенной функцией является подавление микробного роста и гарантия стерильности продукта на протяжении срока хранения или термина использования лекарственного продукта. Обычно используемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты имеют долгую историю совместного применения с низкомолекулярными парентеральными составами, разработка белковых составов, которые содержат консерванты, может быть затруднена. Консерванты практически всегда оказывают дестабилизирующий эффект (агрегации) на белки, и это стало основным фактором, ограничивающим их применение в составах, рассчитанных на многодозовое дозирование. В настоящее время большинство белковых лекарственных средств составляют только для однократного применения. Однако в тех случаях, когда возможны составы, рассчитанные на многодозовое дозирование, они имеют дополнительное преимущество, состоящее в удобстве для пациента, и повышенную конкурентоспособность на рынке продаж. Хорошим примером является человеческий гормон роста (hGH), для которого разработка содержащих консерванты составов привела к коммерческой реализации более удобного многодозового шприца-ручки. По меньшей мере четыре таких устройства-ручки, содержащих составы hGH с консервантами, доступны на данный момент на рынке продаж. Нордитропин (жидкость, Novo Nordisk), нутропин AQ (жидкость, Genentech) и генотропин (лиофилизированный, с двухкамерным картриджем, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как соматроп (Eli Lilly) составлен с добавлением м-крезола.

При составлении и разработке содержащих консерванты дозированных форм нужно принимать во внимание некоторые аспекты. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном продукте должна быть оптимизированной. Это требует исследования заданного консерванта в дозированной форме в диапазоне концентраций, который обеспечивает противомикробное действие без снижения стабильности белка.

Следует ожидать, что разработка жидких составов, содержащих консерванты, является более трудной задачей, чем в случае лиофилизированных составов. Сублимированные продукты можно лиофили-

зировать без консервантов и восстановить в содержащем консервант разбавителе перед использованием. Это снижает время контакта консерванта и белка, что существенно минимизирует связанный с таким контактом риск дестабилизации. В случае жидких составов эффективность консерванта и стабильность должны поддерживаться на протяжении всего срока хранения продукта (приблизительно от 18 до 24 месяцев). Важным моментом является то, что консервант должен проявлять эффективность в конечном составе, содержащем активное лекарственное средство и все вспомогательные компоненты.

В общем случае составы ST2-антигенсвязывающих белков должны разрабатываться с учетом определенных способов и методов применения, для определенных применяемых дозировок и частоты применения, для определенных видов лечения определенных заболеваний и в определенных диапазонах биологической доступности и устойчивости среди прочего. Следовательно, составы согласно изобретению можно разработать для доставки любым подходящим способом, включая, но не ограничиваясь этим, пероральный, внутриушной, офтальмологический, ректальный и вагинальный, а также парентеральными способами, включая внутривенную и внутриартериальную инъекцию, внутримышечную инъекцию и подкожную инъекцию.

После составления фармацевтической композиции можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, в твердом состоянии, в кристаллическом состоянии или в виде дегидратированного либо лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить как в готовой для применения форме, так и в форме (например, лиофилизированной), которая восстанавливается перед применением. Также в изобретении предложены наборы для получения одноразовой дозы препарата. Наборы согласно изобретению могут содержать первый контейнер, содержащий сухой белок, и второй контейнер, содержащий водный состав. В определенных вариантах осуществления данного изобретения предложены наборы, содержащие мультикамерные предварительно наполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью или шприцы с лиофилизатом).

Применяемое терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей ST2-антигенсвязывающий белок, зависит, например, от терапевтического контекста и обстоятельств. Для специалиста в данной области техники понятно, что подходящие уровни дозирования для лечения частично зависят от доставляемой молекулы, в роли которой используется ST2-антигенсвязывающий белок, способа применения и параметров (масса тела, площадь поверхности тела и размер органов) и/или состояния (возраста и общего здоровья) пациента. В определенных вариантах осуществления лечащий врач может титровать дозировку и модифицировать способ применения для получения оптимального терапевтического эффекта. Типичный диапазон дозировок составляет от примерно 0,1 мкг/кг вплоть до примерно 30 мг/кг или более в зависимости от вышеупомянутых факторов. В конкретных вариантах осуществления диапазон дозировок может составлять от 1,0 мкг/кг вплоть до примерно 20 мг/кг, необязательно от 10 мкг/кг вплоть до примерно 10 мг/кг или от 100 мкг/кг вплоть до примерно 5 мг/кг.

Применение терапевтически эффективного количества ST2-антигенсвязывающего белка предпочтительно приводит к снижению степени тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты или продолжительности периодов отсутствия симптомов заболевания или предотвращению появления патологий или инвалидности вследствие поражения болезнью.

Фармацевтические композиции можно вводить при помощи медицинских инструментов. Примеры медицинских инструментов для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США №№ 4475196, 4439196, 4447224, 4447233, 4486194, 4487603, 4596556, 4790824, 4941880, 5064413, 5312335, 5312335, 5383851 и 5399163, которые все включены в данное описание посредством ссылки.

Методы диагностики или лечения заболеваний и нарушений, связанных с ST2.

ST2-антигенсвязывающие белки согласно изобретению применимы, в частности, для детекции ST2 в биологическом образце. В определенных вариантах осуществления биологический образец, полученный от пациента, приводят в контакт с ST2-антигенсвязывающим белком. Затем детектируют связывание ST2-антигенсвязывающего белка с ST2, чтобы определить наличие относительного количества ST2 в образце. Такие методы могут быть полезны для диагностики или выявления пациентов, которые восприимчивы к лечению ST2-антигенсвязывающим белком.

В определенных вариантах осуществления ST2-антигенсвязывающий белок по изобретению применяют для диагностики, детекции или лечения аутоиммунных или воспалительных заболеваний. При лечении аутоиммунных или воспалительных заболеваний ST2-антигенсвязывающий белок может быть нацелен на экспрессирующие ST2 клетки иммунной системы для их разрушения и/или может блокировать взаимодействие ST2 и IL-33.

Заболевания, которые связаны опосредованной IL-33 передачей сигнала, особенно восприимчивы к лечению одним или более ST2-антигенсвязывающими белками, раскрытыми в данном описании. Такие заболевания включают, но не ограничиваются этим, воспаление, аутоиммунное заболевание, паранеопластические аутоиммунные заболевания, воспаление хрящевой ткани, фиброзирующие болезни и/или разрушение костной ткани, артрит, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, пауциартикулярный ювенильный ревматоидный артрит, полиартикулярный ювенильный ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит с системным началом, ювенильный анкилози-

рующий спондилит, ювенильный энтеропатический артрит, ювенильный реактивный артрит, ювенильный синдром Рейтера, SEA-синдром (синдром серонегативной энтезопатии и артропатии), ювенильный дерматомиозит, ювенильный псориатический артрит, ювенильную склеродермию, ювенильную системную красную волчанку, ювенильный васкулит, пауциартикулярный ревматоидный артрит, полиартикулярный ревматоидный артрит, ревматоидный артрит с системным началом, анкилозирующий спондилит, энтеропатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, SEA-синдром (синдром серонегативной энтезопатии и артропатии), дерматомиозит, псориатический артрит, склеродермию, системную красную волчанку, васкулит, миелит, полиомиелит, дерматомиозит, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, артериит, ревматическую полимиалгию, саркоидоз, склеродерму, склероз, первичный склероз желчных протоков, склерозирующий холангит, синдром Шегрена, псориаз, пятнистый псориаз, каплевидный псориаз, псориаз складок, пустулезный псориаз, эритродермический псориаз, дерматит, атопический дерматит, атеросклероз, волчанку, болезнь Стилла, системную красную волчанку (SLF), миастению гравис, воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, глютенную болезнь, множественный склероз (MS), астму, COPD, риносинусит, риносинусит с полипами, эозинофильный эзофагит, эозинофильный бронхит, болезнь Гийена-Барре, сахарный диабет типа I, тиреоидит (например, болезнь Грейвса), болезнь Аддисона, феномен Рейно, аутоиммунный гепатит, хроническую БТПХ (GVHD), отторжение при трансплантации, повреждение почек и тому подобное.

В предпочтительных вариантах осуществления аутоиммунным или воспалительным заболеванием является астма, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), легочный фиброз, сепсис и травмы, ВИЧ-инфекция, системная красная волчанка, воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит, склероз, гранулематоз Вегенера, болезнь Бехчета, сердечно-сосудистое заболевание, риносинусит, назальный полипоз и эозинофильный бронхит.

В определенных вариантах осуществления ST2-антигенсвязывающий белок по изобретению применяют для диагностики, детекции или лечения рака или опухолевого заболевания. При лечении рака или опухолевого заболевания ST2-антигенсвязывающий белок может быть нацелен на экспрессирующие ST2 клетки для их разрушения и/или может блокировать взаимодействие ST2 и IL-33, тем самым снижая опосредованную IL-33 передачу сигнала. Например, высокая экспрессия растворимого ST2 связана с повышением выживаемости среди пациентов с раком молочной железы (Prechtel et al., Lab Invest (2001) 81:159-165). Так как растворимый ST2 связывает и блокирует опосредованную IL-33 передачу сигнала, предполагается, что ST2-антигенсвязывающие белки, которые блокируют опосредованную IL-33 передачу сигнала, окажутся эффективными, способствуя повышению выживаемости среди пациентов с раком молочной железы. Рак или опухолевые заболевания, которые можно диагностировать, детектировать или лечить при помощи ST2-антигенсвязывающего белка, включают, но не ограничиваются этим, солидные опухоли в целом, рак легких, рак яичников, рак молочной железы, рак простаты, рак эндометрия, рак почек, рак пищевода, рак поджелудочной железы, плоскоклеточную карциному, увеальную меланому, рак шейки матки, колоректальный рак, рак мочевого пузыря, мозга, поджелудочной железы, головы, шеи, печени, лейкемию, лимфому и болезнь Ходжкина, множественную миелому, меланому, рак желудочно-кишечного тракта, астроцитому, рак желудка и аденокарциному легкого.

Антигенсвязывающие белки можно использовать для подавления роста опухолей, прогрессирования и/или метастаза. Такое подавление можно отслеживать при помощи различных методов. Например, подавление может привести к снижению размера опухоли и/или снижению метаболической активности внутри опухоли. Оба эти параметра можно определить, например, при помощи МРТ- или ПЭТ-сканирования. Также подавление можно отслеживать по биопсии, для того чтобы установить уровень некроза, гибели опухолевых клеток и уровню васкуляризации внутри опухоли. Степень метастаза можно отслеживать при помощи известных методов.

Примеры

Следующие примеры, практические и теоретические, приведены для того, чтобы проиллюстрировать конкретные варианты осуществления или отличительные признаки настоящего изобретения, но при этом не ограничивают его объема.

Пример 1. Антитела к ST2 эффективны в мышинной модели астмы.

Данный пример демонстрирует, что введение антител, которые связывают ST2 и подавляют IL-33-опосредованную передачу сигнала, эффективно в животной модели воспалительного заболевания, т.е. астмы. Нейтрализующее мышинное ST2 mAb (ST2-суррогатное mAb) подавляло активность вводимого экзогенно IL-33 *in vivo*. Мышам интраназально вводили 200 нг рекомбинантного мышинного IL-33 через два часа после внутривенной инъекции 100 мкг анти-ST2 mAb. На следующий день определяли концентрации IL-5 в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF) при помощи ELISA. Контрольные концентрации IL-5 получали из BALF мышей, обработанных солевым раствором перед введением солевого раствора. Максимальные концентрации IL-5 в BALF были получены для изотипических контрольных обработанных Ig мышей, которым вводили IL-33. По сравнению с изотипической контрольной обработкой Ig обработка ST2 mAb привела к существенному подавлению IL-33-индуцированного IL-5 в BALF обоих мышинных штаммов BALB/c и C57BL/6 (фиг. 1).

ST2-суррогатное mAb проявило эффективность в индуцированной тараканьим аллергеном (CRA)

модели астмы, при этом в BALF мышей, обработанных антителами к ST2, содержалось существенно меньше эозинофилов, чем у изотипических контрольных обработанных Ig мышей. Мышам BALB/c вводили 100 мкг CRA на 1, 3, 6, 8, 10 и 13 дни. Мышам делали инъекцию 250 мкг либо анти-ST2 mAb, либо изотипического контрольного Ig на 0, 7 и 13 дни, причем на 13 день инъекцию антител проводили перед последним интраназальным введением CRA. На 14 день мышей анестезировали и проводили лаваж легких. Клеточные популяции BALF оценивали количественно, а обработка анти-ST2 mAb привела к существенно меньшему общему количеству клеток BALF, при этом эозинофилы составляли незначительную часть клеточной популяции (фиг. 2).

Пример 2. Получения антител к ST2 с использованием платформы Xenomouse®.

Исследования генерации полностью человеческих антител, направленных против человеческого ST2, проводили, используя технологию XENOMOUSE® (патенты США №№ 6114598, 6162963, 6833268, 7049426, 7064244, которые в полном объеме включены в данное описание посредством ссылки; Green et al., 1994, Nature Genetics 7:13-21; Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15:146-156; Green and Jakobovitis, 1998, J. Ex. Med. 188:483-495, Kellermann and Green, 2002, Current Opinion in Biotechnology, 13:593-597).

Иммунизацию XMG2K, XMG4K и XMG4KL XENOMOUSE® животных проводили как полипептидом, содержащим внеклеточный домен человеческого ST2, слитый с Fc-доменом человеческого антитела, так и человеческим слитым белком ST2-Fc, комплексированным с человеческим IL-33. Подходящее количество иммуногена (т.е. десять мкг/мышь растворимого ST2) использовали для первичной иммунизации XENOMOUSE® животных согласно методу, описанному в патентной заявке США, серийный № 08/759620, зарегистрированной 3 декабря 1996 г., и международных патентных заявках № WO 98/24893, опубликованной 11 июня 1998 г., и WO 00/76310, опубликованной 21 декабря 2000 г., описания которых включены в данное описание посредством ссылки. После первичной иммунизации проводили последовательные бустерные иммунизации иммуногена (пять мкг/мышь растворимого ST2 или комплекса ST2/IL33) согласно схеме и на протяжении срока, необходимого, чтобы индуцировать требуемый титр антител к ST2 у мышей. Титры определяли подходящим методом, например ELISA, или при помощи сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FAC).

Определяли животных с подходящими титрами, и лимфоциты, полученные из дренирующих лимфатических узлов и при необходимости объединенные для каждой группы. Лимфоциты выделяли из лимфоидной ткани при помощи размалывания в подходящей среде (например, среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко; DMEM; предоставляемой Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) для высвобождения клеток из тканей и суспендировали в DMEM. В-клетки отбирали и/или обогащали подходящим методом и проводили слияние с подходящим партнерами по слиянию, например клетками P3X63Ag8.653 несекреторной миеломы (Американская коллекция типовых культур CRL 1580; Kearney et al., J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550), при помощи известных в данной области техники методов.

В одном методе слияния лимфоциты смешивали с клетками-партнерами по слиянию в соотношении 1:4. Клеточную смесь аккуратно пеллетировали посредством центрифугирования при 400×g на протяжении 4 мин, супернатант сцеживали, и клеточную смесь аккуратно перемешивали (например, при помощи 1 мл пипетки). Слияние индуцировали ПЭГ/ДМСО (полиэтиленгликоль/диметилсульфоксид; предоставляемый Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури; 1 мл на миллион лимфоцитов). ПЭГ/ДМСО добавляли медленно, аккуратно встряхивали через одну минуту с последующим перемешиванием на протяжении одной минуты. Затем через 2 мин добавляли IDMEM (DMEM без глутамин; 2 мл на миллион В-клеток), аккуратно встряхивая, с последующим дополнительным добавлением IDMEM (8 мл на миллион В-клеток) через 3 мин.

Слитые клетки аккуратно пеллетировали (400×g, 6 мин) и ресуспендировали в 20 мл селекционной среды (DMEM, содержащий азасерин и гипоксантин [НА] и другие вспомогательные вещества в случае необходимости) на миллион В-клеток. Клетки инкубировали на протяжении 20-30 мин при 37°C и затем ресуспендировали в 200 мл селекционной среды и культивировали от трех до четырех дней в колбах T175 перед высеванием в 96-луночные планшеты.

Клетки распределяли по 96-луночным планшетах, используя стандартные методы для максимизирования клональности полученных в результате колоний. После нескольких дней культивирования супернатанты собирали и проводили скрининговое исследование. Скрининг гибридных супернатантов, полученных из мышей, иммунизированных комплексом ST2-Fc/IL33, проводили методом на основании ELISA, используя 96-луночные полистироловые планшеты ELISA, пассивно покрытые на ночь при 4°C 0,5 мкг/мл ST2-Flag/his, комплексированным к человеческому IL-33. Для определения специфического связывания ST2 проводили второй ELISA-скрининг, используя 96-луночные полистироловые планшеты, пассивно покрытые на ночь при 4°C 10 мкг/мл нейтравидина. Затем планшеты отмывали и загружали 0,5 мкг/мл биотинилированного человеческого IL33. При помощи данного ELISA-скрининга идентифицировали более 1200 анти-ST2 специфических связывающих элементов.

Скрининг гибридных супернатантов, полученных из мышей, иммунизированных растворимым ST2-Fc, для обнаружения ST2-антигенспецифических антител осуществляли методом флуоресцентного микрообъемного исследования (FMAT), проводя скрининг относительно рекомбинантных клеток

НЕК293Т, временно трансфицированных полноразмерным человеческим ST2, и контрскрининг относительно ложнотрансфицированных клеток НЕК293Т. Вкратце, клетки высевали в 384-луночные планшеты FMAT в объеме 40 мкл/лунку с плотностью 6000 ST2-положительных клеток/лунку и 14000 ложнотрансфицированных ST2-отрицательных клеток/лунку. Затем добавляли гибридный супернатант и оставляли для связывания на 1 ч при комнатной температуре с последующей отмывкой и вторичной детекцией с использованием вторичного антитела к человеческому Fc-Су5. При помощи данного FMAT-скрининга идентифицировали более 2200 анти-ST2 специфических связывающих элементов из гибридом, полученных из мышей, иммунизированных внеклеточным доменом ST2.

Затем данную комбинированную панель из 3400 анти-ST2 специфических гибридных супернатантов дополнительно исследовали на предмет способности функционально противодействовать передаче сигнала ST2, применяя анализ высвобождения цитокина интерферон- γ . Вкратце, очищенные человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMNC) или очищенные человеческие NK-клетки высевали в 96-луночные планшеты для тканевого культивирования и стимулировали человеческим IL-33 и IL-12, индуцируя высвобождение интерферона-гамма в супернатант. Проводили количественную оценку уровней интерферона-гамма в супернатанте и обнаружили, что они прямо коррелируют с IL-33/ST2-зависимой передачей сигнала. При помощи данного биоанализа образцы гибридом исследовали на предмет способности блокировать высвобождение интерферона-гамма посредством блокирования сигнального пути ST2. При помощи данного скрининга идентифицировали 578 гибридных супернатантов, полученных путем иммунизации ST2-Fc, которые подавляют высвобождение интерферона-гамма более чем на 80%. В дополнение, идентифицировали 505 гибридных супернатантов, полученных вследствие иммунизации комплексом ST2Fc/IL-33, которые подавляют высвобождение интерферона-гамма более чем на 70%.

Затем данную панель из 1083 гибридных супернатантов дополнительно исследовали на предмет перекрестно-реактивного связывания с ST2 мышей и яванских макаков, на предмет градации относительной аффинности при помощи ограниченного метода ELISA для антигенов, на предмет биохимического блокирования рецепторов/лигандов при помощи ELISA, и на предмет эндогенного связывания при помощи FACS, используя клеточные линии. Данные, полученные в этих вторичных исследованиях, использовали для разделения большой панели на 2 группы по 40 гибридных линий, которые затем субклонировали, наращивали их клеточную массу и очищали.

Пример 3. Определение K_D .

В данном примере определяли аффинность ST2-связывающих антител. Проводили оценку методом поверхностного плазмонного резонанса, используя оптический биосенсор Proteon XPR-36, оборудованный сенсорным чипом GLC (Bio-Rad). Биосенсорный анализ проводили при 25°C в буферной системе HBS-EP+ (1x) (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3,0 mM EDTA, 0,05% сурфактанта P20, GE Healthcare). До инъекции все реагенты хранили при 8°C.

Козлиный античеловеческий IgG (специфический к Fc-фрагменту, Jackson ImmunoResearch) иммобилизовали на поверхности сенсора в вертикальном направлении путем стандартного аминного сопряжения на линиях 1-6 (~4000 к.е.), а затем блокировали этаноламином. Антитела иммобилизовали (~40-100 к.е.) в вертикальном направлении на линиях 1-5. Вертикальную линию 6 оставляли пустой и использовали в качестве контроля. Данные получали для групп, содержащих по 15 антител (три подгруппы по 5).

Реагенты ST2 (человека или яванского макака) доводили в рабочем буфере до концентрации 25 нМ, а затем 3-кратно разбавляли до 309 пМ. При помощи единичной инъекции в горизонтальном направлении доставляли серии молекул ST2, содержащие их полную концентрацию, используя буфер для того, чтобы укомплектовать ряд из шести образцов и обеспечить наличие поточного двойного контроля для ответных данных. Скорости ассоциации (3 мин) и диссоциации (30 мин) фиксировали при скорости потока 100 мкл/мин.

Поверхность восстанавливали при скорости потока 100 мкл/мин, используя 10 mM глицина (pH 1,5, 30 мкл).

Данные корректировали относительно базовой линии, отбирали необходимые, выстраивали в ряд, вычитали контроль (interspot), а затем описывали 1:1 моделью связывания при помощи ProteOn Manager (версия 2.1.2.05). Результаты приведены в табл. 4.

Таблица 4

Антитело	Аналит	k_a	k_d	K_D (нМ)	Антитело	Аналит	k_a	k_d	K_D (нМ)
Ab12	ST2 яв. мак.	2,50E+06	5,60E-05	22,5	Ab12	ST2 чел.	2,35E+06	3,41E-05	14,5
Ab13	ST2 яв. мак.	1,40E+06	1,80E-04	128,0	Ab13	ST2 чел.	1,30E+06	9,12E-05	70,3
Ab14	ST2 яв. мак.	3,57E+06	1,59E-03	445,0	Ab14	ST2 чел.	4,22E+06	2,57E-05	6,1

Ab15	ST2 яв. мак.	2,67E+06	6,23E-05	23,4	Ab15	ST2 чел.	1,83E+06	5,38E-05	29,3
Ab16	ST2 яв. мак.	2,61E+06	2,18E-04	83,7	Ab16	ST2 чел.	1,28E+06	1,47E-04	115,0
Ab17	ST2 яв. мак.	3,38E+06	1,43E-04	42,2	Ab17	ST2 чел.	2,86E+06	1,04E-04	36,4
Ab18	ST2 яв. мак.	3,16E+06	1,44E-04	45,7	Ab18	ST2 чел.	2,67E+06	1,19E-04	44,5
Ab19	ST2 яв. мак.	3,07E+06	1,59E-04	51,8	Ab19	ST2 чел.	2,81E+06	1,25E-04	44,5
Ab20	ST2 яв. мак.	2,61E+06	6,64E-05	25,5	Ab20	ST2 чел.	2,41E+06	5,68E-05	23,5
Ab21	ST2 яв. мак.	3,21E+06	4,92E-05	15,3	Ab21	ST2 чел.	2,83E+06	3,07E-05	10,8
Ab22	ST2 яв. мак.	2,87E+06	5,33E-05	18,6	Ab22	ST2 чел.	2,50E+06	4,05E-05	16,2
Ab23	ST2 яв. мак.	3,29E+06	3,23E-04	98,2	Ab23	ST2 чел.	2,70E+06	2,24E-04	83,1
Ab24	ST2 яв. мак.	2,03E+06	1,54E-04	75,9	Ab24	ST2 чел.	2,89E+06	1,50E-04	51,7
Ab25	ST2 яв. мак.	6,42E+06	5,75E-04	89,6	Ab25	ST2 чел.	4,00E+06	5,44E-04	136,0
Ab26	ST2 яв. мак.	5,65E+06	3,08E-04	54,5	Ab26	ST2 чел.	5,22E+06	2,97E-04	56,9
Ab27	ST2 яв. мак.	1,63E+06	3,75E-04	230,0	Ab27	ST2 чел.	1,35E+06	3,12E-04	230,0
Ab28	ST2 яв. мак.	2,97E+06	1,35E-05	4,5	Ab28	ST2 чел.	2,37E+06	1,98E-05	8,4
Ab29	ST2 яв. мак.	3,97E+05	9,45E-05	238,0	Ab29	ST2 чел.	3,76E+05	8,96E-05	238,0
Ab30	ST2 яв. мак.	3,09E+06	3,17E-05	10,2	Ab30	ST2 чел.	2,79E+06	2,71E-05	9,7
Ab31	ST2 яв. мак.	1,07E+06	2,08E-04	194,0	Ab31	ST2 чел.	8,78E+05	2,43E-04	277,0
Ab32	ST2 яв. мак.	4,81E+06	2,69E-04	55,8	Ab32	ST2 чел.	4,37E+06	2,63E-04	60,2
Ab33	ST2 яв. мак.	4,26E+06	3,31E-04	77,6	Ab33	ST2 чел.	4,04E+06	3,41E-04	84,4
Ab34	ST2 яв. мак.	2,78E+06	4,60E-05	16,5	Ab34	ST2 чел.	2,61E+06	3,19E-05	12,3
Ab35	ST2 яв. мак.	9,76E+05	1,00E-04	103,0	Ab35	ST2 чел.	8,17E+05	1,15E-04	141,0
Ab36	ST2 яв. мак.	4140000	0,000278	67,1	Ab36	ST2 чел.	4,12E+06	2,80E-04	68,1

Аффинность дополнительных антител определяли, используя незначительно измененный протокол для плазмонного резонанса. Оценку антител Ab1, Ab2, Ab3 и Ab4 при помощи поверхностного плазмонного резонанса проводили при 25°C, используя измерительный прибор Biacore 3000 (Biacore International AB, Уппсала, Швеция), оборудованный сенсорным чипом CM5. Специфические к Fc γ захватывающие антитела ковалентно иммобилизовали в двух проточных ячейках на чипе CM4, используя стандартную реакцию аминного сопряжения с HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% сурфактанта P20, GE Healthcare) в качестве рабочего буфера. Вкратце, каждую проточную ячейку активировали 1:1 (об/об) смесью из 0,1 M NHS и 0,4 M EDC. Козлиный античеловеческий IgG AffiniPure, специфическое к Fc γ -фрагменту антитела (Jackson ImmunoResearch Inc., Вест Гров, Пенсильвания), иммобилизовали при 30 мкг/мл в 10 mM ацетате натрия, pH 5,0, с заданным уровнем в 3000 к.е. на двух проточных ячейках. Поверхности с остаточной активностью дезактивировали при помощи инъекции 1 M этаноламина. Затем рабочий буфер меняли на HBS-EP+0,1 мг/мл BCA на все оставшиеся этапы.

Все антитела готовили в рабочем буфере в тройном экземпляре, 3-кратно разбавляли и инъецировали таким образом, чтобы трехминутная инъекция при 10 мкл/мин через испытательную проточную ячейку приводила к появлению приблизительно 75-90 ед. ответа антител, захваченных на поверхности испытательной проточной ячейки. На поверхности контрольной проточной ячейки захвата антител не происходило. Затем ST2 человека или яванского макака при различных концентрациях (200-0,0914 нМ) вместе с пустым буфером проводили через две проточные ячейки. Использовали скорость потока 50 мкл/мин и двухминутную фазу ассоциации, за которой следовала четырехминутная фаза диссоциации. После каж-

дого цикла поверхности восстанавливали 50 мкл инъекцией 10 mM глицина, pH 1,5. Затем свежие анти-тела иммобилизовали на поверхности испытательной проточной ячейки, чтобы подготовить к следующему циклу. Отдельный длительный эксперимент по диссоциации (60 мин) проводили в трех экземплярах при концентрации в 200 nM.

Данные дважды корректировали, вычитая сначала контрольный поверхностный ответ, чтобы исключить изменение объемного коэффициента преломления, а затем вычитая усредненный ответ контрольного буфера, чтобы исключить систематические артефакты для экспериментальных проточных ячеек. Данные по ST2 обрабатывали и описывали в общем случае 1:1 моделью взаимодействия с локальным Rmax при помощи BIA evaluation Software v 4.1. (Biacore International AB, Уппсала, Швеция). Определяли константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d), и использовали эти данные для расчета равновесной константы диссоциации (K_D). Константы скорости диссоциации и равновесные константы диссоциации для Ab1, Ab2, Ab3 и Ab4 приведены в табл. 5.

Таблица 5

Антитело	ST2	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (nM)
Ab1	Человека	1,43E+06	1,11E-04	77,7
Ab1	Макака	1,69E+06	1,97E-04	117
Ab2	Человека	3,33E+05	1,13E-05	33,9
Ab2	Макака	3,60E+05	1,16E-05	32,2
Ab3	Человека	4,00E+05	9,50E-05	238
Ab3	Макака	6,74E+05	8,55E-05	127
Ab4	Человека	2,35E+06	7,06E-04	301
Ab4	Макака	2,50E+06	1,29E-03	516

Пример 4. pH-чувствительное связывание антител.

Терапевтические антитела, которые при низких значениях pH связываются со сниженной аффинностью со своими мишенями, могут иметь усиленные ФК свойства, которые позволяют осуществлять их доставку менее часто либо в более низких дозировках (Nat Biotechnol. 2010 28 (11):1203-7 E. Igawa et al. Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization). Это происходит вследствие высвобождения мишени антителом при низком уровне pH лизосомы с последующей деградацией мишени и возвращением в цикл антитела.

Проводили биосенсорный анализ pH-чувствительного связывания антител Ab1, Ab2, Ab3 и Ab4 при помощи Biacore 4000. Установка была аналогичной таковой в примере 3, в котором проводили определение K_D для этих антител, за исключением того, что данные соответствовали двойной инъекции единичной концентрации в 2,46 nM антитела α -ST2. Фиксировали скорость ассоциации (5 мин) при pH 7,4 и диссоциации (10 мин) при pH 5,5 и 7,4 при скорости потока в 30 мкл/мин. Данные с учетом вычитенного контроля описывали 1:1 моделью при помощи Scrubber. Некоторые из антител демонстрировали намного более высокие скорости диссоциации при более низком уровне pH, как показано в табл. 6.

Таблица 6

Антитело	pH	Расчетная k_d (1/с) *	Кратность изменения pH 7,4/pH 5,5 k_d
Ab1	7,4	0,000134	88,1
Ab1	5,5	0,0118	
Ab2	7,4	0,0000298	8,0
Ab2	5,5	0,000238	
Ab3	7,4	0,0000273	2,9
Ab3	5,5	0,0000791	
Ab4	7,4	0,000632	16,9
Ab4	5,5	0,0107	

Пример 5. Перекрестное конкуритрование антител.

Проведение экспериментов по конкуритрованию является стандартным способом характеристики эпитопов. Антитела, которые конкуритруют друг с другом, можно считать такими, которые связывают один и тот же участок на мишени. В этом примере описан способ определения конкуритрования за связывание ST2, и приведены результаты, полученные согласно данному способу при его применении к описанным в данном описании антителам.

Эксперименты по сортировке можно проводить различными способами, а применяемый метод может оказывать влияние на результаты анализа. Стандартным для данного метода является то, что ST2 обычно связывается одним контрольным антителом, а зондируется другим. В случае если контрольное антитело предотвращает связывание зондирующего антитела, считается, что антитела принадлежат одному сорту. Важен порядок, в котором применяют антитела. Если антитело А применяется в качестве контрольного антитела и блокирует связывание антитела В, то обратное не всегда справедливо: антитело В, применяемое в качестве контрольного антитела, не обязательно будет блокировать антитело А. Суще-

ствует много факторов, которые играют роль в данном случае: связывание антителом может вызывать конформационные изменения мишени, которые предотвращают связывание вторым антителом, либо эпитопы, которые перекрываются, но не полностью экранируют друг друга, могут оставлять возможность высокоаффинного взаимодействия с мишенью для второго антитела, что приводит к связыванию. В общем случае, если конкурентное связывание наблюдается при любом порядке, считается, что антитела принадлежат одному сорту, и если оба антитела могут блокировать друг друга, то существует вероятность того, что эпитопы перекрываются в более полной мере.

В данном примере использовали модификацию мультиплексного метода сортировки, описанного Jia, et al. (J. Immunological Methods, 288 (2004) 91-98). Использовали растворимый ST2-FLAG His. Для меченных разным кодом покрытых стрептавидином гранул Luminex (Luminex, #L100-L1XX-01, XX определяет код гранулы) проводили инкубацию в 100 мкл раствора, содержащего 6 пг/гранула биотинилированных моновалентных мышиных античеловеческих захватывающих антител IgG (BD Pharmingen, #555785), на протяжении 1 ч при комнатной температуре в темноте, затем отмывали 3× PBSA - фосфатно-солевым буфером (PBS) плюс 1% бычий сывороточный альбумин (BSA). Гранулы, несущие разные метки, отдельно инкубировали с 100 мкл 1:10 раствора антител к ST2 (покрывающие антитела) на протяжении 1 ч, а затем отмывали. Гранулы собирали, затем распределяли в 96-луночном фильтровальном планшете (Millipore, #MSBVN1250). В лунки до половины добавляли 100 мкл 2 мкг/мл ST2, а в оставшуюся половину добавляли буфер, и инкубировали на протяжении 1 ч, а затем отмывали. 100 мкл 1:10 раствора антител к ST2 (детекторные антитела) добавляли в одну лунку с ST2 и одну лунку без ST2, инкубировали на протяжении 1 ч, а затем отмывали. В качестве отрицательного контроля использовали нерелевантный человеческий IgG (Jackson, #009-000-003), а также условие, соответствующее отсутствию антител (контроль). В каждую лунку добавляли 20 мкл PE-конъюгированного моновалентного мышиного античеловеческого IgG (BD Pharmingen, #555787) и инкубировали на протяжении 1 ч, а затем отмывали. Гранулы ресуспендировали в 75 мкл PBSA и при помощи установки BioPlex (BioRad) получали по меньшей мере 100 сигналов/код.

Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) пары антител в отсутствие ST2 отнимали от сигнала соответствующей реакции с участием ST2. Для пары антител, для которых принимается, что они связываются одновременно и соответственно принадлежат разным сортам, величина реакции должна отвечать двум критериям: 1) величины должны быть в 2 раза больше, чем для покрывающего антитела, спаренного с самим собой, нерелевантным или контрольным антителом, в зависимости от того, какая из этих трех величин является наибольшей, и 2) величины должны быть больше, чем сигнал от детекторного антитела, которое связано с гранулой, покрытой нерелевантными или контрольными антителами. Было обнаружено как минимум три сорта антител, как показано в табл. 7, приведенной ниже.

Таблица 7

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

Пример 6. Анализ блокирования IL-33.

Исследовали механизм действия антител к ST2 при помощи двух AlphaScreens. Эти два метода применяли в комбинации для того, чтобы определить, могут ли антитела подавлять связывание IL-33 с ST2, или наоборот, могут ли антитела специфически блокировать связывание корцепторов ST2 и AcP и в то же время не препятствовать связыванию IL-33 с ST2. AlphaScreen является аббревиатурой Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay screen (усиленный люминесцентный гомогенный анализ).

В первом исследовании оценивали способность антител блокировать связывание между IL-33 и ST2. В данном анализе определяли способность антител к ST2 блокировать связывание биотинилированного человеческого IL-33 (спаренного со стрептавидиновой донорной гранулой) с 6× гистидин-меченым человеческим ST2 (спаренным с Ni-хелатной акцепторной гранулой). AlphaScreen-анализ IL-33/ST2 проводили, используя 40 мкл реакции, в 96-луночном планшете с половинным объемом лунок (Perkin Elmer). Буфер для анализа, который использовали для обоих AlphaScreens, содержал 40 мМ HEPES (pH 7,4), 1 мМ CaCl₂, 0,1% BSA, 0,05% Твин-20 и 100 мМ NaCl. Каждая лунка для анализа содержала 0,3 нМ биотинилированного человеческого IL-33, 0,3 нМ человеческого ST2-FH (FH является сокращением от FLAG- и 6× гистидин-меток), 10 мкг/мл покрытых стрептавидином донорных гранул (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс), 10 мкг/мл покрытых Ni-хелатом акцепторных гранул (Perkin Elmer) и 12,5 мкг/мл антител к ST2. После добавления всех компонентов анализа планшеты инкубировали на протяжении ночи в темноте при комнатной температуре. На следующий день планшеты считывали на мультиридере 2103 Envision (Perkin Elmer). Лазерное возбуждение донорных гранул при 680 нм использовали для генерации активного кислорода, который может инициировать люминесцентный/флуоресцентный каскад в акцепторных гранулах, которые находятся в непосредственной близости вследствие взаимодействия сопряженных с гранулой белков, что приводит к испусканию света, регистрируемому при 570 нм.

Во втором исследовании оценивали способность антител подавлять IL-33-опосредованное связывание ST2 с ко-рецептором AcP. В данном анализе определяли способность антител к ST2 блокировать IL-33-опосредованное связывание биотинилированного человеческого ST2-Fc (спаренного со стрептавидиновой донорной гранулой) с меченым 6× гистидином человеческим AcP (спаренным с Ni-хелатной акцепторной гранулой). AlphaScreen-анализ ST2/AcP проводили в 8 мкл реакциях в 384-луночном планшете (optiplate, Perkin Elmer). Каждая лунка для анализа содержала 5 нМ человеческого IL-33, 5 нМ биотинилированного человеческого ST2-Fc, 5 нМ человеческого AcP-FH, 10 мкг/мл покрытых стрептавидином донорных гранул, 10 мкг/мл покрытых Ni-хелатом акцепторных гранул и 12,5 мкг/мл антител к ST2. После добавления всех компонентов анализа планшеты инкубировали на протяжении ночи в темноте при комнатной температуре. На следующий день планшеты считывали на мультиридере 2103 Envision (Perkin Elmer), используя те же параметры, которые приведены выше для первого исследования.

Результаты двух AlphaScreens приведены ниже в табл. 8. Подавление для каждого из антител приведено в виде процентной доли подавления сигнала в AlphaScreen при применении заданного антитела в концентрации 12,5 мкг/мл относительно сигнала, полученного в случае, когда в лунке для анализа не было антител. Некоторые антитела подавляли взаимодействие ST2 и IL-33 в более полной мере, чем они подавляли взаимодействие ST2/IL-33/AcP, а некоторые антитела подавляли взаимодействие ST2/IL-33/AcP в более полной мере, чем они подавляли взаимодействие ST2 и IL-33. Все антитела подавляли взаимодействие IL-33 с ST2 по меньшей мере на 50%.

Таблица 8

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

Пример 7. In vitro биоанализ человеческого IL-33.

Примеры человеческих ST2 mAb исследовали в ходе человеческого биоанализа с применением очищенных CD4⁺ Т-клеток, полученных от разных доноров и стимулированных человеческим IL-33 и человеческим IL-2. Процедура анализа состоит в следующем. Клетки высевают в количестве 250000 клеток на лунку в 60 мкл объем в 96-луночный планшет с круглым дном. После предварительной инкубации в каждую лунку добавляют 30 мкл 4× смеси huIL-2+huIL-33. Общий объем в 96-луночном планшете с круглым дном составляет 120 мкл. Начинают с концентрации антител в 20 мкг/мл и проводят разбавление в пропорции 1:3, чтобы получить 10-точечную кривую. Процедуру проводят 4× в 30 мкл. После предварительной инкубации антител с клетками в каждую лунку добавляют 30 мкл 4× смеси из huIL-2+huIL-33. Выдерживают при 37°C, 5% CO₂ на протяжении 48 ч. Супернатанты собирают. Анализируют подавление IL-5 huIL-5 при помощи ELISA.

На фиг. 3 показано подавление ST2 mAb IL-33-индуцированной выработки IL-5 CD4+ Т-клетками, полученными от разных доноров. Линия (—) соответствует значению положительного контроля человеческого IL-33 в комбинации с человеческим IL-2 в отсутствие подавления. (····) соответствует значению положительного контроля человеческого IL-2. Линия (---) соответствует среднему контрольному значению. Человеческие CD4+ Т-клетки предварительно инкубировали на протяжении 30 мин с анти-ST2 mAb, а затем стимулировали на протяжении 48 ч человеческим IL-33 (4 нг/мл) и человеческим IL-2 (10 нг/мл). На фиг. 3 показано, что антитела к ST2 способны подавлять индуцированную человеческим IL-33 активацию ST2, что определено по выработке IL-5 CD4+ Т-клетками. Антитела к ST2 оказались способны противодействовать индуцированной IL-33 выработке IL-5 CD4+ Т-клетками с величинами IC50, составляющими приблизительно <100 нМ. В табл. 9 приведены типичные величины для IC50.

Таблица 9

Ab	IC50 (нМ)
2	5,25
8	6,90
10	6,90
1	10,68
9	62,01
5	64,54
11	479,86

Пример 8. Анализ высвобождения IFN γ CD4+ Т-клетками яванских макак.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) яванских макак обогащали из нормальной донорской периферической крови, обработанной кислой цитрат-декстрозой (ACD), посредством градиентного центрифугирования ISOLYMPH (Gallard-Schlesinger Industries, Plainview, Нью-Йорк). Последующее выделение CD4+ Т-клеток яванских макак проводили при помощи набора для выделения CD4+ Т-клеток яванских макак от Miltenyi Biotec. Выделенные CD4+ Т-клетки макак (2×10^5 клеток/лунку в 96-луночных планшетах) инкубировали с очищенными моноклональными антителами при разных концентрациях на протяжении 30 мин при комнатной температуре, а затем стимулировали IL-33 (10 нг/мл), IL-2 (10 нг/мл) и IL-12p70 (50 нг/мл) на протяжении 84 ч. Затем полученные в результате бесклеточные супернатанты культуры CD4+ Т-клеток яванских макак анализировали на предмет присутствия IFN γ яванских макак при помощи ELISA (примеры данных приведены в табл. 10). Эффективность очищенных моноклональных антител определяли в процессе исследования высвобождения IFN γ CD4+ Т-клетками яванских макак, взятыми от трех различных доноров.

Таблица 10

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

Пример 9. Анализ высвобождения IL-8 эозинофилами человека.

Человеческие эритроциты и гранулоциты обогащали из гепаринизированной нормальной донорской периферической крови посредством градиентного центрифугирования ISOLYMPH (Gallard-Schlesinger Industries, Plainview, Нью-Йорк). Эритроциты удаляли, используя лизирующий буфер ACK (Gibco, Карлсбад, Калифорния). Последующее выделение эозинофилов проводили при помощи набора для выделения эозинофилов от Miltenyi Biotec. Выделенные эозинофилы (2×10^5 клеток/лунку в 96-луночных планшетах) инкубировали с неклональными или клональными супернатантами с разной степенью разведения либо с очищенными моноклональными антителами при разных концентрациях на протяжении 30 мин при комнатной температуре, а затем стимулировали IL-33 (2 нг/мл) и IL-3 (100 нг/мл) на протяжении трех дней. Затем полученные в результате бесклеточные супернатанты культуры эозинофилов анализировали на предмет присутствия IL-8 при помощи ELISA. Примеры данных приведены в табл. 11. Эффективность очищенных моноклональных антител определяли в процессе исследования высвобождения IL-8 эозинофилами, взятыми от трех различных доноров.

Таблица 11

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

Пример 10. Эффективность антител к ST2 по сравнению с коммерчески доступными антителами.

Исследование зависимости доза-эффект для человеческого IL-33 в человеческих NK-клетках.

Первичные CB56-положительные человеческие NK-клетки (5×10^4 клеток) обрабатывали человеческим IL-12 (1 нг/мл), добавляя увеличивающиеся количества человеческого IL-33, как показано на фиг. 4. Через 24 ч бесклеточные супернатанты собирали и измеряли концентрацию IFN- γ , используя коммерческий метод анализа (R&D Systems). 10 нг/мл IL-33 использовали в качестве стимулирующей дозы для подавления антителами к ST2.

Подавление активности IL-33 антителами.

Человеческие NK-клетки стимулировали, как описано выше. За 30 мин до добавления IL-33 и IL-12 в клетки добавляли антитела к ST2 в концентрациях, приведенных на фиг. 5. Через 22 ч после обработки IL-33 бесклеточные супернатанты собирали и измеряли концентрацию IFN- γ , используя коммерческий метод анализа (R&D Systems). Названия клонов указаны для коммерчески доступных антител. Только Ab2 полностью подавляло IL-33-зависимый IFN- γ -ответ и оказалось существенно более эффективным, чем любое из коммерчески доступных антител huST2. Величины IC50, соответствующие каждому антителу, приведены в табл. 12.

Таблица 12

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

Пример 11. Аланин/аргинин сканирующий мутагенез ST2.

Данный пример характеризует антитела к ST2 на основании воздействия мутагенеза ST2 на их способность связывать мишень. Предварительные данные по связыванию указывают на то, что за связывание антител отвечают главным образом домены 1 и 2 ST2 в случае панели антител, которую анализировали при помощи сканирующего мутагенеза ST2 в данном примере. Таким образом, в случае полноразмерного ST2 при конструировании мутационных участков в структурном отношении учитывали только домены 1 и 2 (D1D2) ST2.

Координаты комплексной модели ST2 и IL-33 получали из Lingel et al., Structure (London, England: 1993). Elsevier Ltd 17, 1398-410. Восприимчивость к растворителю, приходящаяся на каждый остаток боковой цепи ST2, рассчитывали при помощи Molecular Operating Environment (Molecular Operating Environment (MOE), 2011.10; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2011.). Затем эти значения восприимчивости к растворителю использовали при выборе поверхностных остатков D1D2 для мутагенеза, выбирая сначала все остатки D1D2, имеющие открытые участки боковой цепи с площадью по меньшей мере в $10 \text{ \AA}^2$, или остатки глицина с общей открытой площадью по меньшей мере в $10 \text{ \AA}^2$. Остатки глицина, имеющие положительное значение угла пи, удаляли, как и остатки пролина, так как существует высокая вероятность того, что мутации в данных позициях приведут к искажению локальной белковой структуры. Остатки цистеина также удаляли из выборки для сохранения дисульфидных связей. Остаток A82 удалили после визуальной проверки. При помощи данного метода получили перечень из 140 остатков для мутагенеза. Все остатки были заменены аргинином, за исключением остатков аргинина и лизина, которые были заменены аланином.

Все мутантные конструкции родительского His-Avi-меченого внеклеточного домена (ECD) ST2 в векторе pTT5 экспрессировали во временно трансфицированных суспензионных клетках 293-6E (NRCC) в 24-луночных планшетах. In-vivo биотинилирование осуществляли посредством котрансфекции BiR A в вектор pTT5. Для удаления излишка биотина супернатанты диализировали с PBS.

Для определения связывания антител к ST2 с точечными мутациями в ST2 использовали анализ связывания BioPlex. Биотинилированные мутанты связывали с 80 мечеными разным кодом покрытыми

стрептавидином гранулами (Luminex, #L100-L1XX-01, XX определяет код гранулы). Наличие 80 разных кодов для гранул дало возможность объединить две группы по 70 мутантов в общую группу из 140. Каждая группа содержала 6 родительских контрольных проб, 3 контрольные пробы, содержащие нерелевантный белок, и одну пустую контрольную пробу. Связывание антител с мутантным белком сравнивали со связыванием антител с родительским белком.

100 мкл 1:7 раствора мутантных ST2, родительских и контрольных проб, предварительно связанных с гранулами, или раствора, не содержащего белка, отмывали $5 \times$ PBS+1% BSA, собирали и разделяли на аликвоты в 96-луночном фильтровальном планшете (Millipore), а затем снова отмывали. Добавляли по 100 мкл 3-кратного раствора антител к ST2, чтобы втрое увеличить объем лунок, инкубировали на протяжении 1 ч при КТ и отмывали. В каждую лунку добавляли 100 мкл 1:500 раствора PE-конъюгированного античеловеческого IgG Fc (Jackson, #109-116-170), инкубировали на протяжении 0,5 ч и отмывали. Гранулы ресуспендировали в 75 мкл, встряхивали на протяжении по меньшей мере 3 мин и считывали на BioPlex.

Перед проведением анализа связывания проводили валидационный эксперимент, чтобы определить вариабельность "участка гранулы" к "участку гранулы" (B-B). В этом валидационном эксперименте все гранулы конъюгировали с одним и тем же контрольным белком дикого типа. Следовательно, различия между участками гранул были связаны исключительно с изменчивостью B-B, а не вызваны различиями между белками дикого типа и мутантными. Титрование антител проводили для 12 реплик в разных лунках.

Целью данного статистического анализа была оценка B-B вариабельности расчетной величины EC50 для кривых связывания. Расчетное стандартное отклонение (SD) для B-B затем использовали для построения доверительных интервалов величины EC50 для белков дикого типа и мутантных в ходе экспериментов по сравнению кривых.

Данные по связыванию для каждого участка гранулы описывали логистической моделью с четырьмя параметрами. Результирующий файл "sumout.xls", содержащий результаты контроля качества (QC) и оценки параметров для наибольшего значения (max), наименьшего значения (min), угла наклона (slope) и натурального логарифма EC50 (xmid) для кривых, использовали в качестве исходных данных для анализа. Затем оценивали B-B вариабельность для каждого из параметров при помощи модели со смешанными эффектами, используя процедуру SAS PROC MIXED. В анализ были включены только те кривые, которые имели "хороший" QC-статус. Конечная модель со смешанными эффектами включала в качестве случайного эффекта только остаток (т.е. отдельные участки гранул). Предел среднего (LS) для каждого параметра также оценивали при помощи модели со смешанными эффектами. SD для B-B рассчитывали, извлекая квадратный корень и B-B вариации. Также рассчитывали кратность изменения между LS+2SD и LS-2SD, которая соответствует приблизительно верхнему и нижнему 97,5 перцентилу популяции.

Для определения мутантов, которые по сравнению с контролем дикого типа не демонстрировали значительного ответа, определяли и помечали как Hitmax мутантов, для которых максимальное значение (MFI) составляет менее 30% от максимального значения (MFI) для контроля дикого типа.

Сравнивали величины EC50 кривых связывания мутантов и кривых связывания белков дикого типа. Статистически значимые отличия определяли как результаты для дальнейшего рассмотрения. Кривые с метками "nofit" и "badfit" исключали из данного анализа.

При сравнении расчетных величин EC50 учитывали два источника вариаций - вариацию из подбора кривой и вариацию гранула-гранула. Белки дикого типа и мутантные белки соединяли с разными гранулами, так как их различия обусловлены различиями гранула-гранула. Вариацию подбора кривой оценивали при помощи стандартной погрешности расчетных величин $\log EC50$. Вариацию гранула-гранула определяли экспериментально, проводя эксперимент, в котором контрольные белки дикого типа связывали с каждой из гранул. Связанную с гранулами вариацию в расчетных величинах EC50 кривых связывания белков дикого типа в этом эксперименте использовали для расчета вариации гранула-гранула в текущем эксперименте по картированию.

Сравнение двух значений EC50 (в логарифмической шкале) проводили, используя t-критерий Стьюдента. t-статистику определяли как соотношение между дельтой (абсолютная разница между расчетными величинами EC50) и стандартным отклонением дельта. Дисперсию дельта оценивали по сумме из трех компонентов - оценочной дисперсии EC50 для кривых мутантных белков и белков дикого типа, характеризующихся нелинейной регрессией, и двойной дисперсии гранула-гранула, определенной в отдельном эксперименте. Умножение на два дисперсии гранула-гранула происходит вследствие предположения, что мутантные гранулы и гранулы дикого типа обладают одинаковой дисперсией.

Степени свободы стандартного отклонения дельты рассчитывали, используя аппроксимацию Саттертвайта (1946).

Индивидуальные p-значения и доверительные интервалы (95 и 99%) получали на основании распределения Стьюдента для каждого сравнения.

В случае большого количества контролей дикого типа использовали консервативный подход, в котором выбирали контроль дикого типа, который был наиболее схож с мутантом, т.е. выбирали те образцы, которые имели наибольшие p-значения.

Множественные корректировки важны для того, чтобы контролировать ложноположительные результаты при одновременном проведении большого количества исследований. В данном анализе применяли два вида множественных корректировок: контроль ошибки с поправкой на эффект множественных сравнений (FWE) и контроль доли ложноположительных результатов (FDR). В подходе FWE контролируется возможность того, что один или более результатов являются ошибочными; в подходе FDR контролируется ожидаемое содержание ложноположительных результатов среди выбранных результатов. Первый подход является более консервативным и менее эффективным, чем последний. Существует множество методов, доступных для обоих подходов; для данного исследования авторы изобретения выбрали метод Хохберга (1988) для анализа FWE и FDR-метод Бенджамини-Хохберга (1995) для анализа FDR. Скорректированные р-значения для обоих подходов рассчитывали как для каждого антитела, так и для анализа в целом.

Мутант считали таким, который оказывает влияние по следующим критериям: 1) если для этого мутанта получали плохое согласование или не получали согласования результатов, 2) если мутант был выбран по критерию hitmax, 3) если р-значение для ошибки с поправкой на эффект множественных сравнений составило менее 0,01, или 4) если значение Vmax составило более чем 200% от родительского. Результат определяли как ингибитор, если его влияние приводило к снижению Vmax или увеличению значения EC50, результат определяли как активатор, если он приводил к увеличению Vmax или снижению значения EC50. 8 мутаций исключили из списка совпадений из-за их влияния на >90% исследуемых антител, среди них K37A, R46A, D63R, V71R, G106R, K112A, N132R, Q137R и Y141R.

Результаты анализа приведены в табл. 13 и 14.

Таблица 13

Ab	Сорт	Ингибирующие мутанты	Активирующие мутанты
Ab2	1	L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R, V176R	L53R, R72A, S73R
Ab3	1	S3R, E10R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, F76R, T79R, D92R, D97R, V104R, T124R, K131A, Q134R, G138R, F147R, V176R, V184R	D29R, L53R, V61R, R72A, T162R
Ab32	1	S3R, I15R, Y32R, S33R, E43R, V47R, S50R, K55A, A62R, G65R, T79R, D92R, V95R, D97R, V104R, E128R, Q134R, G138R, S146R, F147R, V176R	D29R, R72A
Ab33	1	S3R, I15R, Y32R, S33R, T35R, E43R, V47R, S50R, K55A, A62R, G65R, T79R, D92R, V95R, D97R, V104R, E128R, Q134R, G138R, S146R, F147R, N152R, V176R	D29R, R72A
Ab30	1	S3R, L14R, Y26R, S33R, T35R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, V104R, G138R, A143R, F147R, N152R, V176R, V184R	R72A
Ab11	2	S50R, S175R	W7R, E10R, L14R, Q21R, E43R, T79R, N110R, T177R, V184R, K185A
Ab10	2	A49R, S50R, I70R, S175R, S181R	K4A, Q5R, W7R, E10R, L14R, I15R, Q21R, Y26R, E43R, T79R, M100R, K109A, N110R, T124R, K145A, T177R, V184R, K185A
Ab29	3	N11R, V47R, S50R, Y67R, N83R, V104R, L120R, G138R, S139R, S146R, F147R, A172R	

Таблица 14

Ab	Не оказывающие влияния мутанты
Ab2	K1A, F2R, S3R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, S50R, G51R, Q52R, K55A, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, V95R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, S146R, F147R, V149R, D151R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R
Ab3	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, N11R, E12R, A13R, L14R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, Y31R, Y32R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, S50R, G51R, Q52R, K55A, L57R, E60R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, V95R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, E128R, F130R, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, S146R, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, K185A, D186R, E187R
Ab32	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, L14R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, Y31R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, G51R, Q52R, L53R, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, F130R, K131A, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R
Ab33	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, L14R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, Y31R, Q34R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, G51R, Q52R, L53R, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, F130R, K131A, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, V149R, D151R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R
Ab30	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, I15R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, Q34R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, S50R, G51R, Q52R, L53R, K55A, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, V95R, D97R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, S139R, R140A, R142A, H144R, K145A, S146R, V149R, D151R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, K185A, D186R, E187R
Ab11	K1A, F2R, S3R, K4A, Q5R, S6R, L9R, N11R, E12R, A13R, I15R, V16R, R17A, R20A, K23A, S25R, Y26R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, S33R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, V47R, A49R, G51R, Q52R, L53R, K55A, L57R, E60R, V61R, A62R, S64R, G65R, I66R, Y67R, T68R, I70R, R72A, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, D92R, N94R, V95R, D97R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, V104R, S107R, E108R, K109A, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, G138R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, S146R, F147R, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, V176R, R180A, S181R, T183R, D186R, E187R

Ab10 K1A, F2R, S3R, S6R, L9R, N11R, E12R, A13R, V16R, R17A, R20A, K23A, S25R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, S33R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, V47R, G51R, Q52R, L53R, K55A, L57R, E60R, V61R, A62R, S64R, G65R, I66R, Y67R, T68R, I70R, R72A, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, D92R, N94R, V95R, D97R, Y98R, Y101R, S102R, T103R, V104R, S107R, E108R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, G138R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, S146R, F147R, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, A172R, N173R, Y174R, V176R, R180A, T183R, D186R, E187R

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

Пример 12. Анализ водородно-дейтериевого обмена (HDX).

В данном примере Ab2 связывали с ST2 и определяли эффект от связывания при помощи HDX.

Растворимый белок ST2 (домены 1-3, содержащие аминокислоты 19-322 из SEQ ID NO: 1) с FLAG-меткой и His-меткой в С-конце временно экспрессировали в клетках 293-6Е млекопитающих, и очищали при помощи IMAC (аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла) и дополнительно очищали при помощи препаративной SEC (эксклюзионной хроматографии). Затем белок концентрировали до 3,5 мг/мл, используя ультра-фильтрацию. Антитело, Ab2, к ST2 экспрессировали в сконструированных клетках CHO-CS9 и очищали при помощи аффинной хроматографии с протеином А и последовательной препаративной SEC. Аналитическую SEC использовали для определения того, что молярное соотношение антитело:антиген 0,75:1,00 является оптимальным, чтобы гарантировать полное связывание белка ST2 антителом. Свободный белок ST2 и комплекс антиген-антитело хранили в PBS-буфере, pH 7,2.

HDX эксперимент проводили при помощи автоматизированной HDX-системы (Zhang, Zhang et al. 2012). Вкратце, процесс обмена H/D начинается с разведения 5 мкл раствора свободного белка ST2 (3,5 мг/мл) или комплекса ST2-антитело (с концентрацией jST2 в 3,5 мг/мл, соотношением антиген:антитело 1:0,75) в 25 мкл буфера D₂O в 100 mM PBS, pH 7,2, который готовили, растворяя таблетку PBS в D₂O воде при 25°C. Реакцию обмена инкубировали на протяжении разного времени мечения (30 с, 2, 8, 30 мин и 2, 8 ч) для каждого HDX эксперимента, а реакцию мечения завершали посредством смешивания 20 мкл метящего раствора с 80 мкл завершающего/денатурирующего/восстановительного буфера (7,25 M мочевины и 625 mM трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP), 0,45 M глицина, pH 2,7) при 1°C.

40 мкл аликвоту полученного раствора переносили в 120 мкл раствор, содержащий 0,4 мг/мл свиного пепсина (Sigma, Ст. Луис, Миссури). Расщепляющий раствор незамедлительно инъецировали в пробоотборную петлю при 1°C и оставляли на 6 мин для полного расщепления. Далее гидролизат разделяли колонками C18 (3 колонки в ряду, BEH C18, 2,1×5 мм, Waters Corp., Милфорд, Массачусетс). HPLC-сепарацию проводили при 1°C с 5-мин градиентом ACN в 1-40%. Элюэнт LC анализировали при помощи масс-спектрометра Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Сан Хосе, Калифорния) в зависящем от данных LC-MS/MS эксперименте.

Введение дейтериевой метки, завершение реакции, протеолитическое расщепление и инъецирование проводили при помощи системы LEAP HD-X PAL, управляемой LEAP Shells (LEAP Technologies, Каррборо, Северная Каролина).

Эксперименты повторяли трижды, а в каждом эксперименте измерения для каждой временной точки проводили дважды. В образцы добавляли стандартную пептидную смесь, чтобы отслеживать и корректировать вариабельность, связанную с обратным обменом. Смесь содержит три пептида: брадикинин, ангиотензин I и лейцин-энкефалин. Специально сконструированный тетрапептид PPPI (синтезированный AnaSpec, Фремонт, Калифорния) использовали в качестве второго внутреннего стандарта для минимизации вариабельности, связанной с проведением большого количества экспериментов. Также в качестве контроля анализировали расщепление белка ST2 в отсутствие H/D обмена.

Файлы, содержащие результирующие данные, обрабатывали при помощи программы MassAnalyzer (Zhang, Zhang et al. 2012). Данное программное обеспечение позволяет определить пептиды из продуктов расщепления антигена, рассчитать скорость обмена для каждого пептида, скорректировать данные с учетом информации по обратному обмену, полученной при помощи внутренних стандартов, и описать данные с помощью модели, которая каждому остатку присваивает фактор защиты.

Сравнение обменных профилей для свободного ST2 и связанного антителом ST2 выявило два пред-

ставляющих интерес участка, которые потенциально могут являться эпитопами. Два участка в последовательности ST2 были определены как IVRCPRQGKPSY (аминокислоты 33-44 SEQ ID NO: 1, соответствующие аминокислотам 15-26 зрелого ST2) и IVRSPTF (аминокислоты 88-94 SEQ ID NO: 1, соответствующие аминокислотам 70-76 зрелого ST2) при помощи большого количества перекрывающихся пептидов. Такие участки были менее защищены, когда ST2 находился в свободном состоянии, при этом скорость обмена резко падала при связывании ST2 и антитела. Более того, на основании гомологичной структурной модели ST2, приведенной на фиг. 6, можно заключить, что оба эти участка последовательности занимают аналогичное пространственное положение на внешней поверхности белка. Эти результаты позволяют заключить, что указанные два пептида принимают участие в связывании между Ab2 и белком ST2.

Пример 13. Рентгеноструктурная кристаллография.

В данном примере кристаллическая структура комплекса из sc-dsFv фрагмента Ab2 и ST2 обеспечивает наличие определенных аминокислотных остатков в области взаимодействия.

Ab2 sc-dsFv экспрессировали в клетках BL21(DE3) Star. Вкратце, Ab2 sc-dsFv содержит переменный домен тяжелой цепи, связанный с переменным доменом легкой цепи посредством линкера $(G_4S)_3$. Для дополнительной стабилизации молекулы в структуру молекулы добавляли дисульфидную связь при помощи замены на цистеин в позиции 44 переменного участка тяжелой цепи и в позиции 101 переменного участка легкой цепи. Белок экспрессировали в виде тела включения. Тело включения растворяли и проводили рефолдинг. Белок дополнительно очищали на эксклюзионной колонке (SEC) и ионообменной колонке MonoQ, а затем шлифовали при помощи SEC.

ST2 экспрессировали в клетках 293S. Белок очищали при помощи Ni-аффинной колонки и дегликозилировали с EndoH. Белок дополнительно очищали при помощи SEC.

Комплекс из Ab2 sc-dsFv и ST2 получали, смешивая Ab2 sc-dsFv с избыточным количеством ST2. Комплекс очищали при помощи SEC и концентрировали до 12 мг/мл для кристаллизации. Белковый комплекс кристаллизировали в 32-36% PEG400 и 0,1 М HEPES, pH 7,5-8,5, при 16°C, применяя метод диффузии паров в сидячей капле.

Массив данных с разрешением 1,9 Å получали из Advanced Light Source, Lawrence Berkeley National Lab (Беркли, Калифорния). Данные обрабатывали при помощи MOSFLM (Leslie, 1992) и оценивали при помощи SCALA в программном пакете CCP4 (Collaborative Computational Project, No 4. (1994)). Структуру расшифровывали методом молекулярного замещения в программе PHASER (McCoy et al., 2007), используя в качестве поисковых моделей домен D1D2 из известной структуры IL-1RII (pdb code: 3O4O) и переменный домен из структуры Fab Ab2. Уточнение повторяющейся структуры и построение модели осуществляли при помощи REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) и COOT (Emsley and Cowtan, 2004).

Анализ области контакта проводили при помощи программ PISA, AREAMOL и NCONTACT из программного пакета CCP4. Фигуры строили при помощи Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger).

Кристаллическую структуру комплекса ST2/Ab2 sc-dsFv расшифровывали до разрешения в 1,9 Å. В ассиметрической ячейке находится две независимые пары комплексов ST2/Ab2 sc-dsFv (фиг. 7). Каждый комплекс состоял из молекулы ST2 и одного фрагмента sc-dsFv Ab2. Молекула ST2 состоит из двух IgG-подобных доменов (домены D1 и D2). Fv-домен Ab2 задействует все шесть петель CDR тяжелой цепи и легкой цепи для взаимодействия с молекулой ST2 (фиг. 8). В молекуле ST2 две петли (петля BC и петля FG) и N-конец ST2 прямо взаимодействуют с антителом. Общая внутренняя доступная для растворителя площадь поверхности между ST2 и Ab2 sc-dsFv составляет 1803 Å².

Область контакта между ST2 и Ab2 является высокозаряженной. ST2 содержит кластер из основных остатков (Lys и Arg) в домене D1. Этот положительно заряженный участок поверхности дополняет отрицательно заряженный участок на Ab2, образованный кластерами из кислотных остатков (Asp и Glu) в CDR-областях (фиг. 9).

Для определения остатков области контакта применяли два разных метода. В первом методе остатки области контакта определяли при помощи разницы в площади поверхности, доступной для растворителя. Для каждого остатка в ST2 (или Ab2 sc-dsFv) в комплексе рассчитывали площадь поверхности, доступную для растворителя, и сравнивали с площадью поверхности, доступной для растворителя, соответствующих остатков в ST2 (или Ab2 sc-dsFv) вне комплекса. Все аминокислоты с разницей более 10% перечислены в табл. 15 и 16 соответственно для ST2 и Ab2. Разница в площади поверхности для Arg72 и Tyr81 в ST2 составляет менее 10%. При этом исследование структуры комплекса выявило, что оба остатка образуют водно-опосредованные водородные связи с остатками тяжелой цепи Ab2, и поэтому они включены в перечень.

Таблица 15

Остатки, составляющие эпитоп, определенные при помощи разницы в площади поверхности, доступной для растворителя: ST2.

Номера остатков соответствуют позициям аминокислот в зрелом ST2, т.е. аминокислота 1 соответствует аминокислоте 19 из SEQ ID NO: 1

Остаток	Номер остатка	ДПП в комплексе	ДПП без комплекса	соотношение	процентное изменение (%)
LYS	1	68.5	196.9	0.348	65.2
PHE	2	48.4	106.2	0.456	54.4
PRO	19	7.9	10.8	0.731	26.9
ARG	20	0	79.6	0.000	100.0
GLN	21	81.7	98.1	0.833	16.7
GLY	22	17.8	59.3	0.300	70.0
LYS	23	51.5	130.6	0.394	60.6
TYR	26	32.4	56.6	0.572	42.8
ILE	70	16.6	30.9	0.537	46.3
VAL	71	1.7	5.3	0.321	67.9
ARG	72	52.2	56.9	0.917	8.3
SER	73	18	22.2	0.811	18.9
PRO	74	70.9	106.8	0.664	33.6
THR	75	3.8	84.6	0.045	95.5
PHE	76	0	134.3	0.000	100.0
ASN	77	2.8	47.6	0.059	94.1
ARG	78	1.1	83.6	0.013	98.7
THR	79	7	37	0.189	81.1
TYR	81	78.3	80.8	0.969	3.1
ASN77-NAG	502	148.2	249	0.595	40.5

Таблица 16

Остатки, составляющие паратоп, определенные при помощи разницы в площади поверхности, доступной для растворителя: Ab2

Остатки HC	номер остатка	ДПП в комплексе	ДПП без комплекса	соотношение	процентное изменение
TRP	33	1.9	32.2	0.059	94.1
ILE	50	0	8.3	0.000	100.0
ASP	57	52.8	59.6	0.886	11.4
ARG	59	60.4	89.5	0.675	32.5
HIS	99	2	6.6	0.303	69.7
GLY	100	3.6	5.5	0.655	34.5
THR	101	27.5	35.9	0.766	23.4
SER	102	48.8	97.6	0.500	50.0
SER	103	45.3	111.8	0.405	59.5
ASP	104	23.1	93	0.248	75.2
TYR	105	1.9	75.4	0.025	97.5
TYR	106	36.8	64.6	0.570	43.0
ASP	28	85.1	105.2	0.809	19.1
SER	30	11.9	50.9	0.234	76.6
ASN	31	12.5	47.1	0.265	73.5
TYR	32	1.1	109.9	0.010	99.0
TYR	49	8.4	58.1	0.145	85.5
ASP	50	8.1	51.5	0.157	84.3
ASN	53	20.2	59.5	0.339	66.1
GLU	55	27.5	38.4	0.716	28.4
THR	56	116.9	127.4	0.918	8.2
ASP	91	2	27.4	0.073	92.7
ASP	92	2.5	54.1	0.046	95.4
ASN	93	50.5	69.5	0.727	27.3
PHE	94	54.9	110.9	0.495	50.5
LEU	96	2.9	7.8	0.372	62.8

Во втором методе выбирали остатки области контакта, которые содержат по меньшей мере один атом в пределах предопределенного расстояния до своего парного белка. На основании разных предельных расстояний были определены две оболочки.

Внутренняя оболочка включает все остатки на расстоянии до 5,0 Å.

Граничная оболочка включает все остатки на расстоянии более 5,0 Å, но менее 8,0 Å.

Полный перечень аминокислотных остатков в каждой оболочке для ST2, тяжелой и легкой цепи Ab2 приведен в табл. 17, 18 и 19 соответственно. Для тех остатков, которые образуют водородную связь или соляные мостики со своими парными белками, тип специфического взаимодействия указан в скобках после названия остатка (BC для водородной связи и CM для соляного мостика).

Таблица 17

Остатки, составляющие эпитоп, определенные по предельному расстоянию: ST2. Номера остатков соответствуют позициям аминокислот в зрелом ST2, т.е. аминокислота 1 соответствует аминокислоте 19 из SEQ ID NO: 1

Внутренние (0-5 Å)	Граничные (5-8 Å)
1 (LYS) (BC/CM)	3 (SER)
2 (PHE)	4 (LYS)
19 (PRO)	18 (CYS)
20 (ARG) (BC/CM)	24 (PRO)
21 (GLN)	27 (THR)
22 (GLY)	28 (VAL)
23 (LYS) (BC/CM)	31 (TYR)
26 (TYR) (BC)	68 (THR)
70 (ILE)	69 (CYS)
71 (VAL)	80 (GLY)
72 (ARG)	81 (TYR)
73 (SER)	
74 (PRO)	
75 (THR) (BC)	
76 (PHE)	
77 (ASN) (BC)	
78 (ARG) (BC/CM)	
79 (THR) (BC)	
502 (NAG) - 77 (ASN)	

Таблица 18

Остатки, составляющие паратоп, определенные по предельному расстоянию: тяжелая цепь Ab2

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

Таблица 19

Остатки, составляющие паратоп, определенные по предельному расстоянию: легкая цепь Ab2

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

Остатки, составляющие эпитоп, определенные при помощи разницы в площади поверхности, доступной для растворителя, совпадали с остатками из внутренних групп взаимодействия, определенных по предельному расстоянию. В табл. 20 перечислены все пары в пределах области контакта, содержащие водородные связи или соляные мостики.

Таблица 20

Взаимодействующие пары в области контакта

Водородные связи					Водородные связи				
##	Структура 1	Расст.	Структура 2		##	Структура 1	Расст.	Структура 2	
1	L:ASN 31 [ND2]	3.4	A:ARG 20 [O]		1	H:TYR 105 [N]	3.3	A:ASN 77 [O]	
2	L:GLU 55 [OE1]	2.7	A:LYS 1 [NZ]		2	H:SER 102 [O]	2.6	A:ASN 77 [ND2]	
3	L:ASP 50 [OD2]	2.8	A:ARG 20 [NE]		3	H:SER 103 [O]	2.7	A:THR 79 [OG1]	
4	L:ASP 50 [OD1]	3.0	A:ARG 20 [NH2]		4	H:ASP 104 [OD1]	2.7	A:LYS 1 [N]	
5	L:ASP 28 [O]	2.9	A:LYS 23 [NZ]		5	H:ASP 104 [OD2]	2.8	A:THR 79 [N]	
6	L:ASP 92 [OD1]	2.9	A:LYS 23 [NZ]		6	H:ASP 104 [OD2]	2.9	A:ARG 20 [NH1]	
7	L:ASP 92 [OD1]	3.3	A:TYR 26 [OH]		7	H:TYR 105 [O]	2.8	A:ARG 20 [NH2]	
8	L:ASP 91 [O]	2.7	A:THR 75 [OG1]		Соляные мостики				
9	L:ASP 91 [O]	3.0	A:ARG 78 [NH2]		##	Структура 1	Расст.	Структура 2	
10	L:ASP 91 [OD2]	3.0	A:ARG 78 [NH2]		1	H:ASP 104 [OD1]	2.7	A:LYS 1 [N]	
Соляные мостики					2	H:ASP 104 [OD2]	3.2	A:LYS 1 [N]	
##	Структура 1	Расст.	Структура 2		3	H:ASP 104 [OD2]	2.9	A:ARG 20 [NH1]	
1	L:GLU 55 [OE1]	2.7	A:LYS 1 [NZ]						
2	L:GLU 55 [OE2]	3.6	A:LYS 1 [NZ]						
3	L:ASP 50 [OD1]	3.9	A:ARG 20 [NE]						
4	L:ASP 50 [OD2]	2.8	A:ARG 20 [NE]						
5	L:ASP 50 [OD1]	3.0	A:ARG 20 [NH2]						
6	L:ASP 50 [OD2]	3.4	A:ARG 20 [NH2]						
7	L:ASP 92 [OD2]	3.4	A:LYS 23 [NZ]						
8	L:ASP 92 [OD1]	2.9	A:LYS 23 [NZ]						
9	L:ASP 91 [OD2]	3.0	A:ARG 78 [NH2]						

Участки, соответствующие эпитопам ST2, определенные при помощи HDX-MS анализа, описанного в примере 12, подтверждаются кристаллографическими данными. Два эпитопа (15-26 и 70-76) согласно HDX были идентифицированы как эпитопы согласно имеющим более высокое разрешение кристаллографическим данным. В частности, было обнаружено, что Arg20, Gly22, Lys23 и Tyr26, а также Thr75 расположены близко к антителу на расстоянии менее 3,4 Å. Дополнительные остатки, для которых определенное расстояние до антитела составило между 3,4 и 5 Å (Pro19, Gln21, Ile70, Val71, Arg72, Ser73 Pro74 и Phe76), также входили в состав эпитопов согласно HDX.

В общем случае результаты подтверждают, что участки, соответствующие эпитопам ST2, определенные при помощи HDX-MS и кристаллографии, совпадают. Основными участками взаимодействия являются ВС-петля и FG-петля домена 1 (см. кристаллографические данные).

Ссылки

- Ali, M., G. Zhang, et al. (2009). "Investigations into the role of ST2 in acute asthma in children." Tissue Antigens 73(3): 206-212.
- Beltran, C. J., L. E. Nunez, et al. (2010). "Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis 16(7): 1097-1107.
- Brunner, M., C. Krenn, et al. (2004). "Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma." Intensive Care Med 30(7): 1468-1473.
- Buysschaert, I. D., V. Grulois, et al. (2010). "Genetic evidence for a role of IL33 in nasal polyposis." Allergy 65(5): 616-622.
- Castano R, B. Y., Mfuno Endam L, Desrosiers M (2009). "Evidence of association of Interleukin 1 receptor-like 1 gene polymorphisms with surgery unresponsive Chronic Rhinosinusitis." American Journal of Rhinology in press(NA): NA.
- Gudbjartsson, D. F., U. S. Bjornsdottir, et al. (2009). "Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction." Nat Genet 41(3): 342-347.
- Hacker, S., C. Lambers, et al. (2009). "Increased soluble serum markers caspase-cleaved cytokeratin-18, histones, and ST2 indicate apoptotic turnover and chronic immune response in COPD." J Clin Lab Anal 23(6): 372-379.
- Kuroiwa, K., T. Arai, et al. (2001). "Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases." Biochem Biophys Res Commun 284(5): 1104-1108.
- Manetti, M., L. Ibba-Manneschi, et al. (2009). "The IL-1-like cytokine IL-33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis." Ann Rheum Dis.
- Marvie, P., M. Lisbonne, et al. (2009). "Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans." J Cell Mol Med.
- Matsuyama, Y., H. Okazaki, et al. (2010). "Increased levels of interleukin 33 in sera and synovial fluid from patients with active rheumatoid arthritis." J Rheumatol 37(1): 18-25.
- Miyagaki, T., M. Sugaya, et al. (2011). "High Levels of Soluble ST2 and Low Levels of IL-33 in Sera of Patients with HIV Infection." J Invest Dermatol 131(3): 794-796.
- Moffatt, M. F., I. G. Gut, et al. (2010). "A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma." N Engl J Med 363(13): 1211-1221.
- Mok, M. Y., F. P. Huang, et al. (2010). "Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus." Rheumatology (Oxford) 49(3): 520-527.
- Neill, D. R., S. H. Wong, et al. (2010). "Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity." Nature 464(7293): 1367-1370.
- Oshikawa, K., K. Kuroiwa, et al. (2001). "Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation." Am J Respir Crit Care Med 164(2): 277-281.
- Oshikawa, K., K. Kuroiwa, et al. (2001). "Acute eosinophilic pneumonia with increased soluble ST2 in serum and bronchoalveolar lavage fluid." Respir Med 95(6): 532-533.
- Palmer, G., D. Talabot-Ayer, et al. (2009). "Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis." Arthritis Rheum 60(3): 738-749.
- Pastorelli, L., R. R. Garg, et al. (2010). "Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis." Proc Natl Acad Sci U S A 107(17): 8017-8022.
- Plager, D. A., J. C. Kahl, et al. (2010). "Gene transcription changes in asthmatic chronic rhinosinusitis with

nasal polyps and comparison to those in atopic dermatitis." PLoS ONE 5(7): e11450.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-

building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.

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

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

Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 240-255.

The PyMOL Molecular Graphics System. Schrödinger, L.

Baerga-Ortiz, A., C. A. Hughes, J. G. Mandell and E. A. Komives (2002). "Epitope mapping of a monoclonal antibody against human thrombin by H/D-exchange mass spectrometry reveals selection of a diverse sequence in a highly conserved protein." *Protein Sci.* 11(6): 1300-1308.

Coales, S. J., S. J. Tuske, J. C. Tomasso and Y. Hamuro (2009). "Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry." *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23(5): 639-647.

Codreanu, S. G., J. E. Ladner, G. Xiao, N. V. Stourman, D. L. Hachey, G. L. Gilliland and R. N. Armstrong (2002). "Local Protein Dynamics and Catalysis: Detection of Segmental Motion Associated with Rate-Limiting Product Release by a Glutathione Transferase." *Biochemistry* 41(51): 15161-15172.

Engen, J. R. and D. L. Smith (2001). "Investigating protein structure and dynamics by hydrogen exchange MS." *Anal. Chem.* 73(9): 256A-265A.

Hamuro, Y., S. J. Coales, J. A. Morrow, K. S. Molnar, S. J. Tuske, M. R. Southern and P. R. Griffin (2006). "Hydrogen/deuterium-exchange (H/D-Ex) of PPAR γ LBD in the presence of various modulators." *Protein Sci.* 15(8): 1883-1892.

Zhang, Z. and D. L. Smith (1993). "Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: A new tool for protein structure elucidation." *Protein Sci.* 2(4): 522-531.

Zhang, Z., A. Zhang and G. Xiao (2012). "Improved Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Platform with Fully Automated Data Processing." *Analytical Chemistry* 84(11): 4942-4949.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело к ST2, содержащее вариabельный домен легкой цепи, который содержит LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 107, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 118 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 129; и вариabельный домен тяжелой цепи, который содержит HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 41, HCDR2 с аминокислотной последовательностью в SEQ ID NO: 52 и HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 63.

2. Антитело к ST2 по п.1, отличающееся тем, что антитело содержит вариabельный домен легкой цепи с аминокислотной последовательностью в SEQ ID NO: 96 и вариabельный домен тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30.

3. Антитело к ST2 по любому из пп.1 или 2, отличающееся тем, что специфически связывает человеческий ST2 с аффинностью, меньшей или равной 1×10^{-10} M.

4. Антитело к ST2 по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что подавляет связывание человеческого ST2 с человеческим IL-33.

5. Антитело к ST2 по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что снижает IL-33-опосредованную передачу сигнала ST2 человека в экспрессирующих ST2 клетках человека.

6. Антитело к ST2 по п.5, отличающееся тем, что подавляет связывание ST2 яванского макака с IL-33 яванского макака.

7. Антитело к ST2 по п.6, отличающееся тем, что снижает IL-33-опосредованную передачу сигнала ST2 яванского макака в экспрессирующих ST2 клетках яванского макака.

8. Антитело к ST2 по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что является антителом человека.

9. Антитело к ST2 по п.8, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь, при этом легкая цепь содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID: 85, а тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

10. Антитело к ST2 по любому из пп.1-9, отличающееся тем, что указанное антитело к ST2 связывает ST2, содержащий аминокислоты 19-322 SEQ ID NO: 1 в пределах аминокислот 33-44 и/или 88-94 SEQ ID NO: 1, как определено при помощи анализа водородно-дейтериевого обмена.

11. Антитело к ST2 по п.10, отличающееся тем, что связывается в пределах аминокислот 33-44 и 88-94 SEQ ID NO: 1, как определено при помощи анализа водородно-дейтериевого обмена.

12. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая вариативный домен легкой цепи антитела по любому из пп.1-11.

13. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая вариативный домен тяжелой цепи антитела по любому из пп.1-11.

14. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая вариативный домен легкой цепи и вариативный домен тяжелой цепи антитела по любому из пп.1-11.

15. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь антитела по любому из пп.1-11.

16. Выделенная нуклеиновая кислота по п.15, отличающаяся тем, что содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности SEQ ID NO: 74.

17. Выделенная нуклеиновая кислота по п.15, отличающаяся тем, что содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 74.

18. Выделенная нуклеиновая кислота по п.15, отличающаяся тем, что содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 74.

19. Выделенная нуклеиновая кислота по п.15, отличающаяся тем, что содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 74.

20. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь антитела по любому из пп.1-11.

21. Выделенная нуклеиновая кислота по п.20, отличающаяся тем, что содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности SEQ ID NO: 8.

22. Выделенная нуклеиновая кислота по п.20, отличающаяся тем, что содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 8.

23. Выделенная нуклеиновая кислота по п.20, отличающаяся тем, что содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 8.

24. Выделенная нуклеиновая кислота по п.20, отличающаяся тем, что содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8.

25. Вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп.12-24.

26. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп.12-24, функционально связанную с промотором для экспрессии легкой цепи, тяжелой цепи или легкой цепи и тяжелой цепи антитела по любому из пп.1-11.

27. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.25.

28. Рекомбинантная клетка-хозяин по п.27, отличающаяся тем, что секретирует антитело, которое связывает ST2.

29. Рекомбинантная клетка-хозяин по любому из пп.26-28, которая происходит из организма млекопитающего.

30. Рекомбинантная клетка-хозяин по п.29, принадлежащая клеточной линии яичников китайского хомячка (CHO).

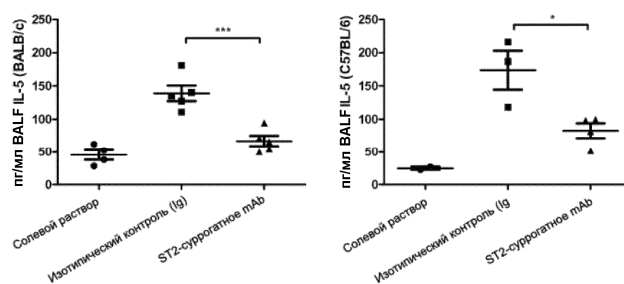
31. Способ лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антитела к ST2 по любому из пп.1-11.

32. Способ по п.31, отличающийся тем, что аутоиммунным или воспалительным заболеванием является астма, атопический дерматит, хроническое обструктивное заболевание легких, фиброз легких, сепсис, системная красная волчанка, воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит, склероз, гранулематоз Вегенера, болезнь Бехчета, сердечно-сосудистое заболевание, риносинусит, назальный полипоз или эозинофильный бронхит.

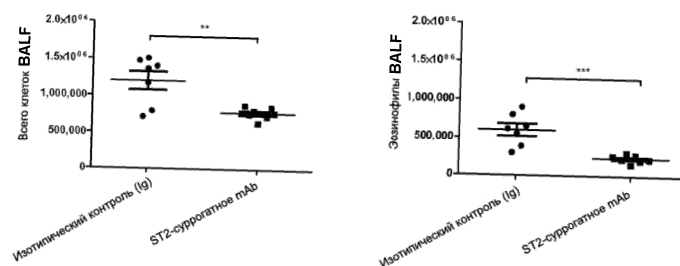
33. Способ по п.31, где аутоиммунное или воспалительное заболевание представляет собой астму или хроническое обструктивное заболевание легких.

34. Способ получения антитела к ST2 по любому из пп.1-11, включающий:

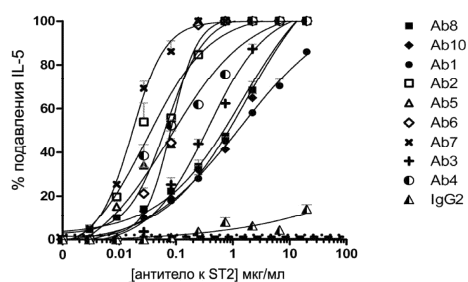
- a) культивирование рекомбинантной клетки-хозяина по любому из п.п.26-30; и
- b) выделение антитела к ST2 из указанной культуры.



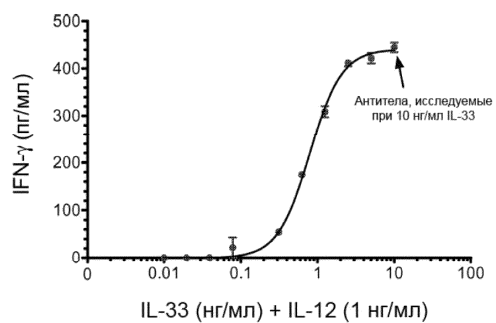
Фиг. 1



Фиг. 2

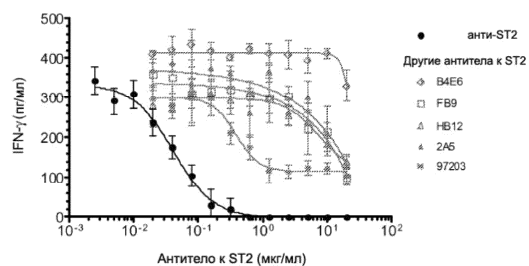


Фиг. 3

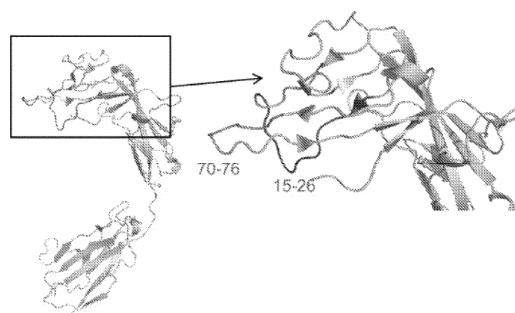


	IL-33 (нг/мл)
EC50	0,7950

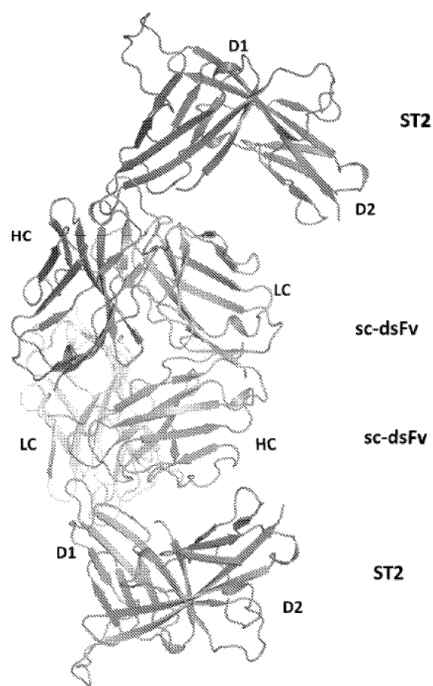
Фиг. 4



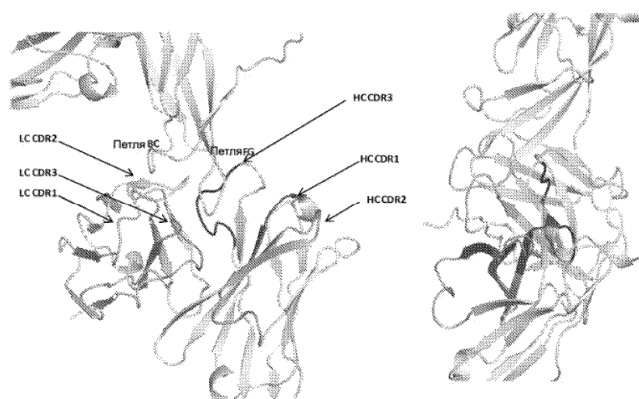
Фиг. 5



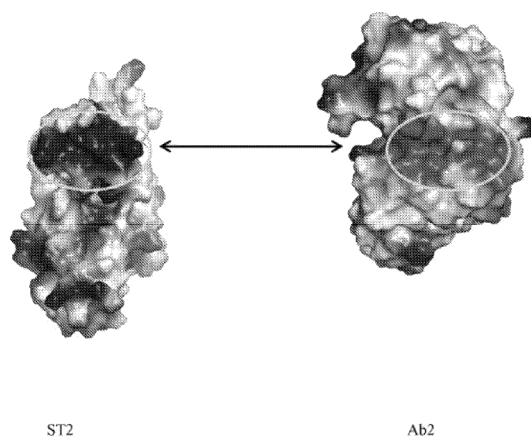
Фиг. 6



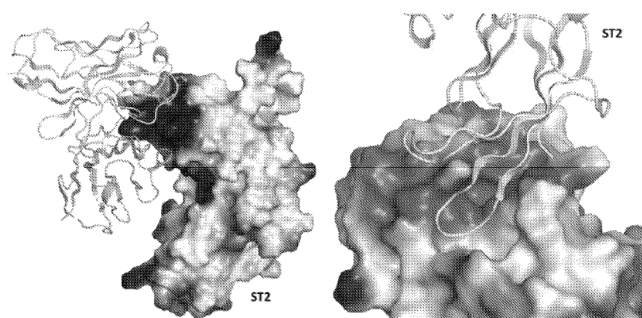
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9А



Фиг. 9В

Варибельный участок HC Ab2 (SEQ ID NO:30)

EVQLVQSGAR VKKPGESLKI SCKGSGYSFT **NYWIC**WVRQM PGKGLEWM**CI** IYPGNSDTRF SPSFQ**Q**QVTI SADKSITTAY
LQMSSLKASD TAMYVCAR**IG TSSDYGLDY** WGQGTITVTS S

Варибельный участок LC Ab2 (SEQ ID NO:96)

DIQMTQSPSS LSASVGDRTV IT**QASQDIS NYLN**MYQKKP GKAPKLLI**YD** ASNLE**TS**VPVS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP
EDIATYY**QQ DNFPLT**EGG GTKVBIKR

Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2