



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



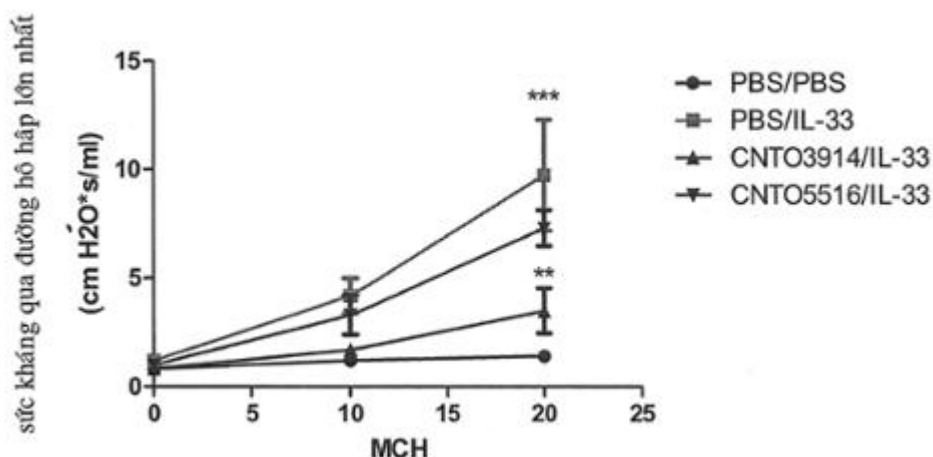
1-0027001

(51)⁷ A61K 39/395; A61K 39/00; C07K (13) B
16/44; C07K 16/24; C07K 16/28; A61K
38/01

- (21) 1-2014-03636 (22) 29/04/2013
(86) PCT/US2013/038637 29/04/2013 (87) WO 2013/165894 A3 07/11/2013
(30) 61/640,238 30/04/2012 US; 61/640,407 30/04/2012 US; 13/798,204 13/03/2013 US;
13/798,226 13/03/2013 US
(45) 25/01/2021 394 (43) 25/03/2015 324A
(73) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)
800/850 Ridgeview Drive, Horsham, PA 19044, USA
(72) DUFFY, Karen (US); HEALY, Catherine (US); LAMB, Roberta (US);
MALAVIYA, Ravi (US); PRATTA, Michael (US); FURSOV, Natalie (RU); LUO,
Jinquan (US); NASO, Michael (US); TORNETTA, Mark (US); WHEELER, John
(US); WU, Sheng-Jiun (US); HALL, LeRoy (US).
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) CHẤT ĐỐI KHÁNG KHÁNG THỂ ST2L, POLYNUCLEOTIT ĐƯỢC PHÂN LẬP
MÃ HÓA CHẤT ĐỐI KHÁNG KHÁNG THỂ VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
CHẤT ĐỐI KHÁNG KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chất đối kháng kháng thể ST2L, polynucleotit mã hóa chất đối
kháng kháng thể ST2L, phương pháp sản xuất và dược phẩm chứa chất đối kháng kháng
thể này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất đối kháng kháng thể ST2L, polynucleotit mã hóa các chất đối kháng hoặc các mảnh của chúng, và phương pháp sản xuất và sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

ST2L (IL-1RL1 hoặc IL-33R α) là thành phần họ thụ thể Toll/IL-1 biểu hiện trên bề mặt tế bào của nhiều loại tế bào miễn dịch bao gồm tế bào T, tế bào NK/NKT, bạch cầu ưa kiềm, tế bào ưa eozin, các tế bào mast và các tế bào bạch huyết loại 2 bẩm sinh không là B/không là T được mô tả có tính mới, không giới hạn đến, và các tế bào giúp đỡ tự nhiên. Biểu hiện ST2L cũng có thể cảm ứng trên các tế bào hình cây (DC), đại thực bào, và các bạch cầu trung tính. ST2L có thể điều hòa ngược độ nhạy của thụ thể tương tự Toll TLR2, TLR4, và TLR9, nhưng cũng kích thích với giải phóng xytokin loại 2 thông qua sự hoạt hóa bằng phối tử IL-33 của nó và kết hợp với protein phụ trợ IL-1RAcP. IL-33 đã được mô tả như 'alarmin', như dạng có chiều dài đầy đủ của nó di trú trong nhân của tế bào biểu mô và các tế bào nội mạc trong khi nội cân bằng, nhưng có thể được phân cắt và được giải phóng trong quá trình hoại tử.

Tín hiệu ST2L yêu cầu kết hợp protein phụ trợ IL-1RAcP để tạo ra phức ST2L/IL-33. Protein phụ trợ IL-1RAcP được phân chia với phức tín hiệu IL-1 α/β . Sự tác động các mô hình ST2L, IL-33, và IL-1RAcP cũng như sự tác động giữa IL-1R1 và IL-1RAcP đã được đề xuất (Lingel và các đồng tác giả, Cell 117:1398-1410, 2009; Wang và các đồng tác giả, Nat Immunol 11:905-11, 2010). Gần đây, ST2L/IL-33/IL-1RAcP đã thể hiện để tạo ra phức tín hiệu có c-Kit trên các tế bào mast, thụ thể cho nhân tố tế bào gốc (stem cell factor -SCF). IL-33 bị kích thích do sản sinh xytokin trong các tế bào mast ban đầu theo cách phụ thuộc vào SCF (Drube và các đồng tác giả, Blood 115:3899-906, 2010). Ví dụ, việc dùng kháng thể kháng ST2 ở chuột bị viêm khớp do collagen được mô tả trong Palmer et al., Arthritis & Rheumatism 60(3):738-749.

Sự hoạt hóa ST2L dẫn đến các đáp ứng xytokin loại 2 quá mức (tốt nhất là IL-5 và IL-13), hoạt hóa tế bào mast và tế bào ưa eozin, và siêu phản ứng qua đường hô hấp, và cũng được biết rằng để khuếch đại Th1 và Th17 đáp ứng thông qua sự cảm ứng của IFN γ từ tế bào NKT và IL-1 β và IL-6 từ các tế bào mast. Sự mất điều hòa của con đường ST2L/IL-33 đã liên quan đến các bệnh qua trung gian miễn dịch, bao gồm bệnh hen, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm đại tràng, bệnh viêm da dị ứng, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh polip mũi, và bệnh xơ cứng bì hệ thống (được xem xét bởi Palmer và Gabay, Nat Rev Rheumatol 7:321-9, 2011 và Lloyd, Curr Opin Immunol 22:800-6, 2010; Shimizu và các đồng tác giả, Hum Molec Gen 14:2919-27, 2005, Kamekura và các đồng tác giả, Clin Exp Allergy 42:218-28, 2012; Manetti và các đồng tác giả, Ann Rheum Dis 69:598-605, 2010).

Do đó, nhu cầu đối với các chất đối kháng ST2L mà thích hợp sử dụng để điều trị các bệnh và các rối loạn qua trung gian ST2L.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chất đối kháng kháng thể được phân lập, hoặc mảnh của nó mà gắn kết đặc hiệu với miền I (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9) của ST2L ở người, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó:

- (a) VH chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 191; và
- (b) VL chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 209.

Sáng chế đề xuất chất đối kháng kháng thể được phân lập ở người hoặc được thích nghi ở người hoặc mảnh của nó mà gắn kết đặc hiệu với miền I (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9) của ST2L ở người.

Sáng chế cũng đề xuất chất đối kháng kháng thể thích nghi ở người gắn kết đặc hiệu với ST2L ở người có một vài trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, hoặc một vài trình tự xác định bỏ thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Sáng chế cũng đề cập là chất đối kháng kháng thể thích nghi ở người hoặc người được phân lập gắn kết đặc hiệu với ST2L ở người tại vùng epitop được xác định và/hoặc có một vài đặc trưng như được mô tả ở đây.

Sáng chế cũng đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất vectơ chứa polynucleotit được phân lập theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ chứa vectơ theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế và thu hồi chất đối kháng kháng thể từ tế bào chủ.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa chất đối kháng kháng thể được phân lập theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng bệnh qua trung gian ST2L bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu để điều trị của chất đối kháng kháng thể được phân lập theo sáng chế đối với bệnh nhân cần nó trong khoảng thời gian vừa đủ để điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng bệnh qua trung gian ST2L.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp đáp ứng tế bào mast ức chế ở bệnh nhân bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu để điều trị của chất đối kháng kháng thể được phân lập theo sáng chế đối với bệnh nhân cần nó trong khoảng thời gian vừa đủ để ức chế sự đáp ứng tế bào mast.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ức chế sự tương tác của IL-33 và ST2L ở đối tượng, bao gồm việc dùng đối với đối tượng kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với miền I của ST2L với lượng vừa đủ để ức chế sự tương tác của IL-33 và ST2L.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sự ức chế độ nhạy cao qua đường hô hấp bằng mAb gắn kết với mAb gắn kết với miền I của ST2LCNTO3914 trong mẫu viêm phổi bị kích thích do IL-33 được dùng trong mũi khi so với isotyp đối chứng CNTO5516. Sự kháng qua đường hô hấp cao nhất được đo dựa trên metacholin (MCH) dùng với các liều tăng (mg/ml). **p<0,05 đối với CNTO3914/IL-33 so với CNTO5516/IL-33; và ***p<0,001 đối với CNTO3914/IL-33 so với PBS có nhóm điều trị IL-33.

Fig.2 thể hiện sự ức chế của sự tuyển chọn tế bào Bronchoalveolar Lavage (Bronchoalveolar Lavage -BAL) bằng mAb gắn kết với miền I của ST2L CNTO3914

trong mô hình viêm phổi bị kích thích do IL-33 được dùng trong mũi khi so với CNTO5516 isotyp đối chứng. *** $p < 0,001$.

Fig.3 thể hiện sự ức chế phụ thuộc liều giải phóng tế bào mast Proteaza ở chuột 1 (MMCP-1) bởi mAb gắn kết với miền I của ST2L CNTO3914 trong tế bào không có dịch BAL trong mô hình viêm phổi bị kích thích do IL-33 được dùng trong mũi. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, so với CNTO5516 (isotyp đối chứng) với điều trị IL-33.

Fig.4 thể hiện sự ức chế của GM-CSF bị kích thích do IL-33 (Fig 4A), IL-5 (Fig 4B), và TNF α (Fig 4C) giải phóng bởi mAb gắn kết với miền I của ST2L CNTO3914 bằng các tế bào mast thu được từ tủy sống ở chuột *in vitro*. Nồng độ CNTO3914 được sử dụng thể hiện bằng $\mu\text{g/ml}$ và nồng độ IL-33 bằng ng/ml trong dầu ngoặc.

Fig.5 thể hiện sự ức chế của prostaglandin D₂ bị kích thích do IL-33(PGD₂) giải phóng bởi các tế bào mast thu được từ máu cuống rốn ở người bởi mAb gắn kết với miền I của ST2L C2494 (STLM62) ở IL-33 và nồng độ C2494 được chỉ định. MOX-PDG₂: metoxylsamin-PGD₂.

Fig.6 thể hiện sự ức chế của GM-CSF (Fig 6A), IL-8 (Fig 6B), IL-5 (Fig 6C), IL-13 (Fig 6D) và IL-10 (Fig 6E) giải phóng theo nồng độ được chỉ định ($\mu\text{g/ml}$) của mAb gắn kết với miền I của ST2L C2244 và C2494 ở các tế bào mast thu được ở máu cuống rốn ở người (hCBMCs) với sự có mặt 1 ng/ml IL-33 trong môi trường StemPro-34 + SCF 100 ng/ml (tế bào gốc).

Fig.7 thể hiện tác dụng trên GM-CSF (Fig 7A), IL-8 (Fig 7B), IL-5 (Fig 7C), IL-13 (Fig 7D) và IL-10 (Fig 7E) giải phóng theo nồng độ được chỉ định ($\mu\text{g/ml}$) của mAb gắn kết với miền I của ST2LII C2519 hoặc C2521 trong tế bào mast thu được từ máu cuống rốn ở người với sự có mặt của 1 ng/ml IL-33 trong môi trường StemPro-34 + SCF 100 ng/ml .

Fig.8 thể hiện tác dụng trên A) GM-CSF; B) IL-8; C) IL-5; D) IL-13 và E) IL-10 giải phóng bởi mAb gắn kết với miền I của ST2L C2494 và mAb gắn kết với miền I của ST2LII ST2M48 (M48), ST2M49 (M49), ST2M50 (M50), và ST2M51 (M51) trong các tế bào mast thu được từ máu cuống rốn ở người (hCBMCs) với sự có mặt của 3 ng/ml IL-33 trong môi trường RPMI/10%FCS + SCF 100 ng/ml .

Fig.9 thể hiện phần trăm trung bình (%) ức chế các kháng thể kháng ST2L gắn kết với miền I (D1) hoặc miền III (D3) của ST2L trên GM-CSF, giải phóng IL-5, IL-8, IL-10 và IL-13 theo các tế bào mast thu được từ máu cuống rốn ở người dựa trên Sự cảm ứng IL-33 và SCF như được chỉ định sử dụng 50 µg/ml hoặc 2 µg/ml của mỗi kháng thể được thử nghiệm. Các giá trị âm cho thấy % hoạt hóa.

Fig.10 thể hiện vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và trình tự CDR chuỗi nặng của các kháng thể kháng ST2L thu được từ các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể và sau các chiến dịch chín ái lực sau đó.

Fig.11 thể hiện vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và trình tự CDR chuỗi nhẹ của các kháng thể kháng ST2L thu được từ các thư viện các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể và sau các chiến dịch chín ái lực sau đó.

Fig.12 thể hiện vùng VH và VL và trình tự chuỗi nặng CDR của các biến đổi kháng thể STLM208 VH ST2H257 HCDR3 kháng ST2L.

Fig.13 thể hiện Trình tự A) VH và B) VL của các kháng thể kháng ST2L thu được từ các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể và sau các chiến dịch chín ái lực sau đó.

Fig.14 thể hiện hình phác họa các vị trí gắn kết kháng nguyên C2494 VH và VL được di chuyển đến các khung ở người (được đánh dấu di chuyển như HFA, “điều hợp khung ở người”). Kabat CDR là đường gạch dưới và Chothia HV được chỉ ra ở các đường được gạch ngang nêu trên ở các vùng HFA được chỉ định được di chuyển. Đánh số gốc VH và VL theo Chothia. Góc được làm nổi bật bằng màu xám trong VH không được di chuyển ở một số biến đổi HFA. C2494 VH: SEQ ID NO: 48; C2494 VH: SEQ ID NO: 52.

Fig.15 thể hiện trình tự CDR của các kháng thể được làm thích ứng với khung ở người (human framework thích nghi -HFA) thu được từ C2494.

Fig.16 A) Mức huyết thanh của CNTO3914 kháng thể kháng ST2L B) sự ức chế của sự tuyển chọn tế bào Bronchoalveolar Lavage (bronchoalveolar Lavage-BAL) C) ức chế sự bài tiết IL-6 bằng toàn bộ toàn bộ các tế bào máu được kích thích bằng IL-33; D) ức chế sự bài tiết MCP1 bằng toàn bộ các tế bào máu được kích thích bằng IL-33 bởi CNTO3914 24 giờ sau khi dùng thuốc ở mô hình 6 giờ của mẫu viêm phổi bị kích thích do IL-33 được dùng trong mũi. *p<0,05,

****p<0,01, ***p<0,001; NQ = giới hạn phát hiện dưới; @ = một điểm dữ liệu dưới giới hạn phát hiện.**

Fig.17. Sự cạnh tranh giữa các kháng thể kháng ST2L khác nhau. A) 30 nM C2244 Fab được đánh dấu cạnh tranh với các kháng thể được chỉ định dùng để gắn kết với ST2L-ECD được phủ trên các vi giếng. C2244 cạnh tranh với C2494 nhưng không có C2539. B) 10 nM được gắn C2494 cạnh tranh với các kháng thể được chỉ định để sự gắn kết với ST2L-ECD được phủ trên các vi giếng. C2494 cạnh tranh với STLM208 và STLM213 nhưng không có C2539.

Fig.18 thể hiện biểu đồ trao đổi H/D được đơn giản hóa ST2-ECD ở người (SEQ ID NO: 119) được phức hợp với C2244 Fab. Vùng được bảo vệ bởi kháng thể được hiển thị ở dải màu xám khác nhau như được chỉ định. gốc bao hàm các đoạn 18-31 (được đóng hộp theo đường gạch ngang) (tương ứng với gốc 35-48 của ST2L có đầy đủ chiều dài của SEQ ID NO: 1) được bảo vệ bởi Fab. Gốc bao hàm vùng 71-100 (được đóng hộp theo đường nét đậm) (tương ứng với gốc 88-117 của SEQ ID NO: 1) được glycosylat hóa mạnh và không được phủ bằng peptit.

Fig.19 thể hiện các hằng số động lực và ái lực đối với kháng thể gắn kết với miền I của ST2L với các biến thể ST2L như được chỉ định trong hình.

Fig.20 thể hiện sự ức chế của sự bài tiết A) GM-CSF; B) IL-5; C) IL-8; D) IL-13 từ các tế bào mast phổi ban đầu ở người bằng kháng thể STLM208 kháng ST2L.

Mô tả chi tiết sáng chế

Được hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng ở đây là dùng cho mục đích chỉ riêng phương án cụ thể mô tả và không có ý định giới hạn. Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa tương tự như được hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập.

Thông qua các phương pháp và các vật liệu bất kỳ giống hoặc tương đương các phương án hoặc các vật liệu được mô tả ở đây có thể được sử dụng trong thực tiễn dùng để thử nghiệm theo sáng chế, các vật liệu và các phương pháp mẫu được

mô tả ở đây. Trong phần mô tả và yêu cầu bảo hộ theo sáng chế, thuật ngữ sau sẽ được sử dụng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chất đối kháng" có nghĩa là phân tử mà ức chế từng phần hoặc toàn bộ, bởi cơ quan bất kỳ, hoạt tính sinh học ST2L. Các chất đối kháng mẫu là các kháng thể, protein dung hợp, peptit, chất mô phỏng peptit, axit nucleic, oligonucleotit và các phân tử nhỏ. Các chất đối kháng có thể được nhận dạng sử dụng các thử nghiệm thử nghiệm đối với hoạt tính sinh học ST2L được mô tả sau đây. Các chất đối kháng ST2L có thể ức chế hoạt tính sinh học ST2L đo được là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

Thuật ngữ "ST2L" hoặc "huST2L" hoặc "ST2L ở người" còn được gọi là polypeptit ST2L ở người có trình tự axit amin thể hiện trong GenBank Acc. No. NP_057316. SEQ ID NO: 1 thể hiện trình tự axit amin của ST2L có đầy đủ chiều dài ở người. "miền ngoại bào ST2L", "ST2L-ECD" hoặc "huST2L-ECD" như được sử dụng ở đây có nghĩa là polypeptit có axit amin 19-328 của SEQ ID NO: 1. huST2L-ECD có ba gốc 19-122 nối với miền loại C2 giống Ig (miền I, SEQ ID NO: 9), gốc 123-202 (miền II, SEQ ID NO: 10), và gốc 209-324 (miền III, SEQ ID NO: 11) của SEQ ID NO: 1. "miền I" hoặc "Miền I của ST2L" hoặc "miền huST2L" hoặc "D1" còn được gọi là miền giống với globulin miễn dịch thứ nhất trên ST2L ở người có trình tự thể hiện trong SEQ ID NO: 9. "miền III" hoặc "miền I của ST2LII" còn được gọi là miền giống với globulin miễn dịch thứ ba trên ST2L ở người có trình tự thể hiện trong SEQ ID NO: 11.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "IL-33" bao gồm IL-33 có đầy đủ chiều dài (GenBank Acc. No. NP_254274 SEQ ID NO: 3), các biến thể và các dạng hoạt hóa của chúng. Các biến thể IL-33 bao gồm Protein có trình tự axit amin thể hiện trong GenBank Acc. No. NP_001186569 và GenBank Acc. No. NP_001186570). Các dạng hoạt hóa IL-33 bao gồm "IL-33 chín" có gốc 112-270 của SEQ ID NO: 3. Các dạng hoạt hóa bổ sung bao gồm Các mảnh IL-33 có gốc 11-270, 115-270, 95-270, 99-270, hoặc 109-270 của SEQ ID NO: 3 (LeFrancais và các đồng tác giả, Proc Natl Acad Sci (USA) 109:1673-8, 2012), hoặc dạng bất kỳ hoặc sự tổ hợp của các dạng được tách từ các tế bào nội sinh biểu hiện IL-33.

“Dạng hoạt tính IL-33” là mảnh hoặc biến thể của IL-33 của SEQ ID NO: 3 mà kích thích hoạt tính sinh học ST2L.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “các kháng thể” có nghĩa là theo nghĩa rộng và bao gồm các phân tử globulin miễn dịch bao gồm các kháng thể đa dòng, các kháng thể đơn dòng bao gồm ở chuột, ở người, thích nghi ở người, được nhân hóa và các kháng thể đơn dòng thể khảm, các mảnh kháng thể, các kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa hiệu được tạo ra từ ít nhất hai kháng thể hoặc mảnh kháng thể, hai phần, ba phần, đa phần kháng thể còn nguyên vẹn, và các kháng thể chuỗi đơn.

Globulin miễn dịch có thể được gắn với năm lớp chính, cụ thể là IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, phụ thuộc vào trình tự axit amin miền cố định chuỗi nặng. IgA và IgG còn được phân loại phụ là các isotyp IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ và IgG₄. Kháng thể chuỗi nhẹ của các loài động vật có xương sống bất kỳ có thể được gắn với một trong số hai loại được phân lập rõ ràng, có tên gọi là kappa (κ) và lambda (λ), được dựa trên trình tự axit amin của miền cố định của chúng.

Thuật ngữ “các mảnh kháng thể” còn được gọi là một phần của phân tử globulin miễn dịch mà duy trì kháng nguyên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ gắn kết với vị trí, như chuỗi nặng các vùng xác định bổ thể (HCDR) 1, 2 và 3, các vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) 1, 2 và 3, vùng biến đổi chuỗi nặng (VH), hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL). Các mảnh kháng thể bao gồm các mảnh Fab, F(ab')₂, Fd và Fv đã biết cũng như kháng thể miền (dAb) chứa một miền VH. Miền VH và VL có thể được gắn kết với nhau thông qua chất gắn kết tổng hợp để tạo ra các loại khác nhau của các dạng kháng thể chuỗi đơn trong đó cặp miền VH/VL nội phân tử, hoặc giữa các phân tử trong các trường hợp này khi miền VH và VL biểu hiện bằng cách tạo dựng kháng thể chuỗi đơn phân nhánh, để tạo ra kháng nguyên đơn trị gắn kết với vị trí, như chuỗi đơn Fv (scFv) hoặc diabody; được mô tả cho ví dụ trong Công bố Patent quốc tế số Công bố Patent quốc tế số WO 98/44001, Công bố Patent quốc tế số WO 88/01649; Công bố Patent quốc tế số WO94/13804; Công bố Patent quốc tế số WO 92/01047

Vùng biến đổi kháng thể bao gồm vùng “khung” được làm gián đoạn bằng ba “vị trí gắn kết kháng nguyên”. Vị trí gắn kết kháng nguyên được xác định bằng cách sử dụng các thuật ngữ khác nhau: (i) các vùng xác định bổ thể (CDRs), trong

ba VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3), và trong ba VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), được dựa trên trình tự biến đổi (Wu và Kabat, J Exp Med 132:211-50, 1970; Kabat và các đồng tác giả, trình tự của Protein của miễn dịch Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) “vùng biến đổi cao”, “HVR”, hoặc “HV”, trong ba VH (H1, H2, H3) và trong ba VL (L1, L2, L3), còn được gọi là vùng của miền biến đổi kháng thể mà biến đổi cao ở cấu trúc như được xác định bởi Chothia và Lesk (Chothia và Lesk, Mol Biol 196:901-17, 1987). Các thuật ngữ khác bao gồm “IMGT-CDRs” (Lefranc và các đồng tác giả, Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003) và “Cách sử dụng gốc xác định đặc hiệu” (Specificity Determining Gốc Usage-SDRU) (Almagro, Mol Recognit 17:132-43, 2004). Cơ sở dữ liệu quốc tế ImMunoGeneTics (ImMunoGeneTics-IMGT) (http://www_imgt_org) đưa ra sự đánh số chuẩn và định nghĩa về vị trí gắn kết kháng nguyên. Tương ứng giữa CDR, phác họa HVs và IMGT mô tả trong Lefranc và các đồng tác giả, Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003.

Như được sử dụng ở đây, “gốc Chothia” kháng thể VL và gốc VH được đánh số theo Al-Lazikani (Al-Lazikani và các đồng tác giả, J Mol Biol 273:927-48, 1997).

“Khung” hoặc “trình tự khung” là các trình tự còn lại của vùng biến đổi khác so với các vùng được xác định đối với vị trí gắn kết kháng nguyên. Do vị trí gắn kết kháng nguyên có thể được xác định bằng các thuật ngữ khác nhau như được mô tả nêu trên, trình tự axit amin chính xác của khung phụ thuộc vào cách mà vị trí gắn kết kháng thể được xác định.

“Kháng thể ở người” hoặc “kháng thể ở người đầy đủ” còn được gọi là các kháng thể chứa vùng biến đổi và trình tự vùng cố định thu được từ trình tự globulin miễn dịch ở người. Các kháng thể ở người theo sáng chế có thể bao gồm sự thay thế sao cho chúng có thể không là các bản sao chính xác của globulin miễn dịch được biểu hiện hoặc trình tự gen dòng mầm. Tuy nhiên, các kháng thể mà ở vị trí gắn kết kháng nguyên thu được từ loài không phải ở người không bao gồm trong định nghĩa “kháng thể ở người”.

Các kháng thể “thích nghi ở người” hoặc các kháng thể “thích nghi khung ở người (human framework adapted-HFA)” còn được gọi là các kháng thể thích

nghi theo các phương pháp được mô tả trong Công bố Patent Mỹ Công bố Patent Mỹ số US2009/0118127 và cũng được gọi là các kháng thể mà ở vị trí gắn kết kháng thể trình tự thu được từ loài không phải ở người được ghép vào các khung ở người.

“Các kháng thể được nhân hóa” còn được gọi là các kháng thể trong đó vị trí gắn kết kháng nguyên thu được từ loài không phải ở người và các khung vùng biến đổi thu được từ trình tự globulin miễn dịch ở người. Các kháng thể được nhân hóa có thể bao gồm sự thay thế ở vùng khung sao cho khung có thể không là các bản sao chính xác của globulin miễn dịch được biểu hiện hoặc trình tự gen dòng mầm.

Như được sử dụng, thuật ngữ “giống nhau về cơ bản” ở đây có nghĩa là hai trình tự axit amin vùng biến đổi kháng thể được so sánh là giống nhau hoặc có “sự khác biệt không đáng kể”. Sự khác biệt không đáng kể là sự thay thế của axit amin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc 11 trong kháng thể hoặc trình tự vùng biến đổi kháng thể mà không tương tác xấu đến các đặc tính kháng thể. Trình tự axit amin giống nhau về cơ bản so với vùng biến đổi trình tự được bộc lộ ở đây trong phạm vi của đơn. Theo một số ví dụ, nhận dạng trình tự có thể khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn. Tính phần trăm có thể được xác định ví dụ sắp xếp cặp sử dụng các thiết lập mặc định đơn vị đo AlignX của Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Trình tự protein theo sáng chế có thể được sử dụng làm trình tự truy vấn để thực hiện tìm kiếm chống lại cơ sở dữ liệu sáng chế hoặc công bố, ví dụ, nhận dạng trình tự liên quan. Các chương trình mẫu được sử dụng để thực hiện tìm kiếm như các chương trình XBLAST hoặc BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), hoặc GenomeQuest™ (GenomeQuest, Westborough, MA) sử dụng phù hợp các thiết lập mặc định.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "epitop" có nghĩa là một phần kháng nguyên mà gắn kết đặc hiệu kháng thể. Epitop thường chứa nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học (như có cực, không có cực hoặc kỵ nước) của các gốc như axit amin hoặc chuỗi phía polysaccharit và có thể có đặc trưng về cấu trúc thước ba chiều cụ thể, cũng như đặc trưng bởi sự tích điện đặc hiệu. epitop có thể bao gồm axit amin liên tục và/hoặc không liên tục mà tạo ra cụm không gian cấu trúc. Đối với epitop không liên tục, axit amin từ các phần khác nhau của trình tự tuyến tính của kháng

nguyên đến gần trong không gian ba chiều thông qua việc gấp phân tử protein. Epitop minh họa là miền I của huST2L thể hiện ở SEQ ID NO: 9.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “paratop” có nghĩa là một phần của kháng thể mà gắn kết cụ thể kháng nguyên. Paratop có thể là tuyến tính trong tự nhiên hoặc có thể không liên tục, được tạo ra bằng cách nối quan hệ không gian giữa axit amin không liền kề của kháng thể chứ không phải là loại tuyến tính của axit amin. “Chuỗi paratop nhẹ” và “chuỗi paratop nặng” hoặc “gốc axit amin chuỗi paratop nhẹ” và “gốc axit amin chuỗi paratop nặng” còn được gọi tương ứng là chuỗi nhẹ kháng thể và gốc chuỗi nặng tiếp xúc với kháng nguyên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “làm gắn kết đặc hiệu” hoặc “gắn kết đặc hiệu” còn được gọi là kháng thể gắn kết để kháng nguyên được xác định trước có ái lực cao hơn so với kháng nguyên khác hoặc protein. Thông thường, kháng thể gắn kết với kháng nguyên được xác định trước có hằng số phân ly (K_D) là 1×10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, ví dụ 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, 1×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, 1×10^{-11} M hoặc nhỏ hơn, hoặc 1×10^{-12} M hoặc nhỏ hơn, thông thường có K_D mà ít nhất mười lần ít hơn K_D của nó cho gắn kết đến kháng nguyên không đặc hiệu (ví dụ, BSA, casein, hoặc polypeptit đặc hiệu khác bất kỳ). Hằng số phân ly có thể được đo bằng cách sử dụng quy trình tiêu chuẩn. Các kháng thể mà cụ thể gắn kết với kháng nguyên được xác định trước có thể, tuy nhiên, có độ phản ứng chéo đến kháng nguyên liên quan khác, ví dụ, kháng nguyên được xác định trước tương tự từ các loại khác nhau (chất đồng đẳng), như ở người hoặc ở khỉ, ví dụ *Macaca fascicularis* (*cynomolgus*).

Như được sử dụng ở đây, “đặc hiệu kép” còn được gọi là kháng thể mà gắn kết hai kháng nguyên khác hoặc hai epitop khác trong kháng nguyên.

Như được sử dụng ở đây, “đơn đặc hiệu” còn được gọi là kháng thể that gắn kết một kháng nguyên hoặc một epitop.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trong sự tổ hợp với” có nghĩa là thuốc được mô tả có thể được dùng cho động vật cùng trong một hỗn hợp, đồng thời làm thuốc đơn hoặc tuần tự làm thuốc đơn theo thứ tự bất kỳ.

Như được sử dụng ở đây, “tình trạng bệnh viêm” còn được gọi là đáp ứng toàn thân hoặc cục bộ cấp tính hoặc mạn tính để kích thích có hại, như tác nhân

gây bệnh, các tế bào bị tổn thương, tổn thương về thể chất hoặc các chất kích thích, mà làm trung gian ở một phần bằng cách hoạt hóa xytokin, chemokin, hoặc các tế bào viêm (ví dụ, các bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn phân, tế bào bạch huyết, đại thực bào) và đặc trưng trong hầu hết các trường hợp là đau nhức, đỏ tấy, sưng, và suy giảm chức năng mô.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tình trạng bệnh viêm qua trung gian ST2L” còn được gọi là tình trạng bệnh viêm thu được ít nhất một phần từ hợp sự hoạt hóa không thích của quá trình tín hiệu ST2L. Tình trạng bệnh viêm Tình trạng bệnh viêm qua trung gian ST2L mẫu là hen và dị ứng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “Tình trạng bệnh qua trung gian ST2L” bao hàm tất cả các bệnh và các điều kiện y tế trong đó ST2L đóng một vai trò, dù trực tiếp hay gián tiếp, trong các bệnh hoặc điều kiện y tế, bao gồm kết quả, sự phát triển, sự tiến triển, sự duy trì hoặc bệnh lý của bệnh hoặc tình trạng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hoạt tính sinh học ST2L” còn được gọi là hoạt tính bất kỳ xảy ra do phối tử IL-33 ST2L gắn kết với ST2L. Hoạt tính sinh học mẫu ST2L thu được ở sự hoạt hóa của NF- κ B để đáp ứng đến IL-33. Sự hoạt hóa NF- κ B có thể được xét nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm thử nghiệm gen thông báo dựa trên sự cảm ứng của ST2L với IL-33 (Fursov và các đồng tác giả, Tế bào lai 30: 153-62, 2011). Các hoạt tính sinh học ST2L mẫu khác thu được ở sự phát sinh các tế bào Th2, hoặc bài tiết của xytokin gây viêm và chemokin, ví dụ IL-5, GM-CSF, IL-8, IL-10, hoặc IL-13. Giải phóng xytokin và chemokin từ các tế bào, các mô hoặc trong lưu thông có thể được đo bằng cách sử dụng xét nghiệm miễn dịch đã biết, như xét nghiệm miễn dịch ELISA.

Thuật ngữ “vector” có nghĩa là polynucleotit có khả năng được nhân đôi trong hệ sinh học hoặc có thể được di chuyển giữa các hệ này. Vector polynucleotit thường chứa các thành phần, như gốc tái bản, tín hiệu liên kết không phân cực hoặc đánh dấu sự lựa chọn, mà chức năng tạo điều kiện cho sự nhân đôi hoặc duy trì các polynucleotit này trong hệ sinh học. Ví dụ về hệ sinh học này có thể bao gồm tế bào, virus, động vật, thực vật, và hệ sinh học được hoàn nguyên tận dụng các thành phần sinh học có khả năng nhân đôi vector. polynucleotit bao gồm vector có thể là ADN hoặc Phân tử ARN hoặc tế bào lai của chúng.

Thuật ngữ “vector biểu hiện” có nghĩa là vector mà có thể được dùng trong hệ sinh học hoặc trong hệ sinh học được hoàn nguyên để trực tiếp dịch mã polypeptit được mã hóa bằng trình tự polynucleotit có ở vector biểu hiện.

Thuật ngữ “polynucleotit” có nghĩa là phân tử bao gồm chuỗi nucleotit được liên kết cộng hóa trị bằng cấu trúc phosphat đường hoặc hóa học cộng hóa trị tương tự khác. Các ADN và ARN sợi đơn và đôi là các ví dụ cụ thể về polynucleotit.

Thuật ngữ “polypeptit” hoặc “protein” có nghĩa là phân tử mà bao gồm ít nhất hai gốc axit amin được liên kết bằng liên kết peptit để tạo ra polypeptit. Polypeptit nhỏ ít hơn 50 axit amin có thể được gọi là “peptit”.

Quy định một và ba mã axit amin mẫu được sử dụng ở đây như sau:

Axit amin	Mã ba ký tự	Mã một ký tự
Alanin	ala	A
Arginin	arg	R
Asparagin	asn	N
Aspartat	asp	D
Xystein	cys	C
Glutamat	glu	E
Glutamin	gln	Q
Glyxin	gly	G
Histidin	his	H
Isoleuxin	ile	I
Leuxin	leu	L
Lysin	lys	K
Methionin	met	M
PhenylAlanin	phe	F
Prolin	pro	P
Serin	ser	S
Threonin	thr	T
Tryptophan	trp	W
Tyrosin	tyr	Y
Valin	val	V

Sáng chế đề xuất là các kháng thể gắn kết đặc hiệu với ST2L và ức chế hoạt tính sinh học ST2L, và việc sử dụng các kháng thể này. Ngạc nhiên phát hiện ra rằng các tác giả sáng chế đã thực hiện các kháng thể gắn kết với miền I của ST2L ở người (SEQ ID NO: 9) chặn sự tương tác IL-33/ST2L và ức chế phổ của các hoạt tính sinh học ST2L bao gồm các đáp ứng tế bào mast bị kích thích do IL-33, trong khi các kháng thể gắn kết với miền III của ST2L ở người (SEQ ID NO:

11) không chặn sự tương tác IL-33/ST2L mặc dù chúng ức chế trong phổ của các hoạt tính sinh học ST2L. Tuy nhiên, miền III gắn kết với các kháng thể đã giảm hoặc không có tác dụng ức chế trên, hoặc trong một số các trường hợp đáp ứng tế bào mast kích thích do IL-33.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, các kháng thể mà chặn sự tương tác IL-33/ST2L và ức chế phổ của các hoạt tính sinh học ST2L bao gồm đáp ứng tế bào mast bị kích thích do IL-33 gắn kết với miền I của ST2L epitop ở người, (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210), và tùy chọn axit amin ST2L còn lại T93 và F94 (gốc đánh số theo SEQ ID NO: 1).

Thuật ngữ “đáp ứng tế bào mast” hoặc “hoạt tính tế bào mast” còn được gọi là giải phóng xytokin bị kích thích do IL-33- như GM-CSF, IL-8, IL-5, IL-13, và IL-10, và các chất trung gian gây dị ứng như prostaglandin D₂ từ các tế bào mast.

Vị trí gắn kết kháng nguyên mới gắn kết với miền I của ST2L ở người như được mô tả ở đây. Cấu trúc để thực hiện vị trí gắn kết kháng thể thường là kháng thể VH hoặc VL.

Các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể là chất đối kháng kháng thể được phân lập ở người hoặc được thích nghi ở người hoặc mảnh của nó mà gắn kết đặc hiệu với miền I (SEQ ID NO: 9) của ST2L ở người. Kháng thể minh họa gắn kết với miền I của ST2L ở người (SEQ ID NO: 9) là kháng thể STLM15 (C2244) bao gồm trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của lần lượt SEQ ID số: 23, 27 và 31, và Trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của lần lượt SEQ ID số: 35, 39 và 43, hoặc kháng thể C2494 (STLM62) bao gồm trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của lần lượt SEQ ID số: 24, 28 và 32, và trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của lần lượt SEQ ID số: 36, 40 và 44 (bảng 3). Các kháng thể minh họa bổ sung thể gắn kết với miền I của ST2L ở người là các kháng thể thể hiện trong bảng 16 và Fig 13, ví dụ các kháng thể STLM103, STLM107, STLM108, STLM123, STLM124, STLM208, STLM209, STLM210, STLM211, STLM212, và STLM213. Các chất đối kháng kháng thể ở người mẫu thể hiện trong Fig 12 và Fig 13. Các chất đối kháng thích nghi ở người minh họa thể hiện trong bảng 14.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, chất đối kháng kháng thể được phân lập ở người hoặc được thích nghi ở người hoặc mảnh của nó mà gắn kết đặc hiệu với miền I (SEQ ID NO: 9) của ST2L ở người chặn sự tương tác IL-33/ST2L.

Các kháng thể có thể được thử nghiệm đối với khả năng của chúng để chặn sự tương tác IL-33/ST2L bằng ELISA chuẩn. Ví dụ, tấm được phủ bằng miền ngoại bào của ST2L ở người (huST2L-ECD) và được ủ với kháng thể, sau đó tấm này gắn kết IL-33 được biotinylat hóa lên tấm được đo. Các kháng thể mà “chặn sự tương tác IL-33/ST2L” hoặc “ức chế sự tương tác IL-33/ST2L” là các kháng thể mà trong thử nghiệm thử nghiệm ELISA sử dụng tấm được phủ huST2L-ECD, làm giảm tín hiệu thu được từ IL-33 được biotinylat hóa gắn kết với tấm bằng ít nhất 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% ở 50 µg/ml nồng độ kháng thể khi so với gắn kết của IL-33 với sự có mặt của kháng thể.

Các kháng thể có thể được thử nghiệm đối với sự ức chế của chúng đáp ứng tế bào mast bằng cách đánh giá hoạt tính ức chế của chúng đối với ví dụ giải phóng GM-CSF, IL-5, IL-10 hoặc IL-13 theo các tế bào mast thu được từ máu cuống rốn ở người hoặc các tế bào mast phôi ban đầu ở người bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn và *infra* được lấy làm ví dụ về phương pháp. Các kháng thể như được mô tả ở đây mà “đáp ứng tế bào mast ức chế” hoặc “hoạt tính tế bào mast ức chế” là các kháng thể mà làm giảm 1-3 ng/ml GM-CSF bị kích thích do IL-33, IL-5, IL-13 hoặc IL-10 sự bài tiết bằng ít nhất 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% ở nồng độ là 10 µg/ml khi so với các tế bào mast không được xử lý bằng kháng thể. Các tế bào mast đặc hiệu có thể thu được từ máu cuống rốn ở người hoặc nhu mô ở phôi và đầu dòng CD34⁺ có đường hô hấp nhỏ theo các phương pháp đã biết và như *infra* được lấy làm ví dụ. Các điều kiện nuôi cấy tế bào mast có thể tương tác đến phép đo về % ức chế đối với kháng thể và do đó canh trường và các điều kiện thử nghiệm có thể giữ làm tiêu chuẩn sử dụng ví dụ môi trường StemPro-34 suốt từ 6 đến 10 tuần kéo dài theo quy trình khác nhau. Ở 4 ngày trước để các tế bào mast thử nghiệm giải phóng xytokin được kích thích hàng ngày bằng 10 ng/ml IL-4, 10 ng/ml IL-6 và SCF 100 ng/ml. Đối với thử nghiệm thử nghiệm giải phóng

xytokin, các tế bào mast có thể lơ lửng trong môi trường StemPro-34 tươi hoặc RPMI chứa 10% FCS mà không có thuốc kháng sinh, với SCF 100ng/ml. Khối lượng riêng tằm phù hợp cho các thử nghiệm là nằm trong khoảng từ 65,000 đến 75,000 các tế bào/0,16 ml/giếng. Các kháng thể minh họa theo sáng chế như được mô tả ở đây đáp ứng tế bào mast ức chế các kháng thể STLM15, STLM62 và STLM208. Kháng thể CNTO3914 gắn kết với miền I của ST2L ở chuột mà không phản ứng chéo với ST2L ở người và ức chế đáp ứng tế bào mast trong các tế bào ở chuột.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đáng giá rằng đáp ứng tế bào mast cũng bao gồm giải phóng IL-1 và IL-32, và chemokin như CCL1, CCL4, CCL5, CCL18 và CCL23 cũng như các chất trung gian gây dị ứng như xysteinyl leukotrien, histamin, cũng như loại tế bào mast Proteazas bao gồm tryptaza, chymaza, carboxypeptidaza, và cathepsin G. Các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể được thử nghiệm cho khả năng của chúng để ức chế các đáp ứng tế bào mast bổ sung này sử dụng các phương pháp chuẩn. Các kháng thể theo sáng chế gắn kết với miền I của ST2L và chặn sự tương tác IL-33/ST2L như được mô tả ở đây có thể được tính để ức chế các đáp ứng tế bào mast bổ sung này ít nhất là 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn khi được thử nghiệm ở nồng độ tối thiểu là 10 µg/ml dưới các điều kiện này.

Các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây gắn kết với ST2L ở người với hằng số phân ly (K_D) nằm trong khoảng từ 5×10^{-12} M đến 7×10^{-10} M, hằng số tốc độ hoạt động (K_{on}) đối với ST2L ở người nằm trong khoảng từ 2×10^6 $M^{-1}s^{-1}$ đến 1×10^8 $M^{-1}s^{-1}$, hoặc hằng số tốc độ ngừng hoạt động (K_{off}) đối với ST2L ở người nằm trong khoảng từ 1×10^{-6} s^{-1} đến 1×10^{-2} s^{-1} . Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây gắn kết với ST2L ở người có K_D ít hơn khoảng 7×10^{-10} M, ít hơn khoảng 1×10^{-10} M, ít hơn khoảng 5×10^{-11} M, ít hơn khoảng 1×10^{-11} M hoặc nhỏ hơn so với khoảng 5×10^{-12} M.

Các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể phản ứng chéo với *Macaca fascicularis* (cyno) ST2L (SEQ ID NO: 2) và gắn kết với ST2L ở khỉ Cyno có hằng số phân ly (K_D) nằm trong khoảng từ 3×10^{-12} M đến 2×10^{-9} M, hằng số tốc độ hoạt động (K_{on}) đối với ST2L ở khỉ Cyno nằm trong khoảng từ

$4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ đến $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, hoặc hằng số tốc độ ngừng hoạt động (K_{off}) đối với ST2L ở khỉ Cyno nằm trong khoảng từ $7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ đến $1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây gắn kết ST2L ở khỉ Cyno có K_D ít hơn khoảng $2 \times 10^{-9} \text{ M}$, ít hơn khoảng $1 \times 10^{-9} \text{ M}$, ít hơn khoảng $1 \times 10^{-10} \text{ M}$, ít hơn khoảng $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ hoặc nhỏ hơn so với khoảng $3 \times 10^{-12} \text{ M}$.

Ái lực của kháng thể đến ST2L có thể được xác định bằng thực nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp phù hợp bất kỳ. Các phương pháp này có thể dùng ProteOn XPR36, Biacore 3000 hoặc thiết bị đo kiểm KinExA, ELISA hoặc cạnh tranh gắn kết với các thử nghiệm thử nghiệm đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ái lực được đo kháng thể cụ thể/sự tương tác ST2L có thể biến đổi nếu được đo dưới các điều kiện khác nhau (ví dụ, osmolarity, pH). Do đó, đo ái lực và các thông số gắn kết khác (ví dụ, K_D , K_{on} , K_{off}) tốt hơn là tiến hành dưới các điều kiện được chuẩn hóa và chất đệm được chuẩn hóa, như chất đệm được mô tả ở đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ đánh giá rằng lỗi bên trong đối với đo ái lực ví dụ sử dụng Biacore 3000 hoặc ProteOn (được đo làm độ lệch chuẩn, SD) có thể thường nằm trong khoảng từ 5 đến 33% đối với đo trong phạm vi giới hạn cụ thể về sự phát hiện. Do đó thuật ngữ “khoảng” phản ánh độ lệch chuẩn thông thường ở thử nghiệm thử nghiệm. Ví dụ, SD cụ thể cho K_D là $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ lên đến $\pm 0,33 \times 10^{-9} \text{ M}$.

Các kháng thể gắn kết với ST2L ở người có ái lực mong muốn và tùy ý phản ứng chéo với ST2L ở khỉ Cyno có thể được chọn từ các thư viện các biến đổi hoặc các mảnh bằng ghép nối với người và/hoặc ST2L ở khỉ Cyno và tùy ý bổ sung sự trưởng thành ái lực kháng thể. Các kháng thể có thể được nhận dạng được dựa trên sự ức chế của chúng của hoạt tính sinh học ST2L bằng cách sử dụng phương pháp phù hợp bất kỳ. Các phương pháp này có thể dùng các thử nghiệm gen thông báo hoặc các thử nghiệm đo sản sinh xytokin sử dụng các phương pháp đã biết và như được mô tả trong đơn.

Như được mô tả ở đây kháng thể được phân lập chất đối kháng gắn kết đặc hiệu với ST2L ở người bao gồm:

vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) 1 (HCDR1) của SEQ ID NO: 160 ($X_1X_2X_3MX_4$); trong đó

X_1 là S, F, D, I, G hoặc V;

X₂ là Y hoặc D;

X₃ là A, D hoặc S; và

X₄ là S, F hoặc I;

HCDR 2 (HCDR2) của SEQ ID NO: 161

(X₅IX₆GX₇GGX₈TX₉YADSVKG); trong đó

X₅ là A, S, T, Y hoặc D;

X₆ là S, R, E, K, G hoặc A;

X₇ là S, E hoặc N;

X₈ là S, R, E, G, T, D hoặc A; và

X₉ là Y, D, N, A hoặc S; và

HCDR 3 (HCDR3) của SEQ ID NO: 162 (X₁₀X₁₁WSTEGSFFVLDY);

trong đó

X₁₀ là D, A, R, N, Q, P, E, I, H, S, T hoặc Y; và

X₁₁ là P, A, H, Y, E, Q, L, S, N, T, V, hoặc I.

Như được bộc lộ ở đây kháng thể được phân lập chất đối kháng gắn kết đặc hiệu với ST2L ở người bao gồm:

vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) 1 (LCDR1) của SEQ ID NO: 163 (RASQSVDDX₁₂LA); trong đó

X₁₂ là A hoặc D;

LCDR 2 (LCDR2) của SEQ ID NO: 90

(DASNRAT); và

LCDR 3 (LCDR3) của SEQ ID NO: 164 (QQX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈T); trong

đó

X₁₃ là F hoặc Y;

X₁₄ là Y, I hoặc N;

X₁₅ là N, G, D hoặc T;

X₁₆ là W hoặc A;

X₁₇ là P hoặc mất; và

X₁₈ là L hoặc I.

Như được bộc lộ ở đây, Các kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2, HCDR3, trình tự lần lượt là LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của SEQ ID số: 160, 161, 162, 163, 90 và 164, có thể được thực hiện theo các phương án gây

đột biến đã biết sử dụng ví dụ HCDR1, HCDR2, HCDR3, trình tự lần lượt là LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của SEQ ID số: 78, 81, 84, 87, 90 và 92, làm mẫu. Chuỗi nặng CDR và chuỗi nhẹ CDR của lần lượt SEQ ID số: 160, 161, 162, 163, 90 và 164, có thể được ghép với các khung ở người, như khungs được mô tả infra. Các kháng thể có thể được xét nghiệm đối với gắn kết với ST2L và đối với khả năng của chúng để chặn sự tương tác IL-33/ST2L và đối với đặc trưng khác như ái lực đến ST2L ở người và/hoặc ST2L ở khỉ Cyno, và sự ức chế đáp ứng tế bào mast bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây.

Theo một ví dụ, kháng thể được phân lập chất đối kháng gắn kết đặc hiệu với ST2L ở người như được mô tả ở đây bao gồm:

HCDR1 của SEQ ID số: 78 hoặc 95-108;
 HCDR2 của SEQ ID số: 81, 109-118 hoặc 120-129;
 HCDR3 của SEQ ID số: 84 hoặc 165-185;
 LCDR1 của SEQ ID số: 87 hoặc 130;
 LCDR2 hoặc SEQ ID NO: 90; và
 LCDR3 của SEQ ID số: 92 hoặc 131-134.

Theo phương án khác, kháng thể được phân lập chất đối kháng gắn kết đặc hiệu với ST2L ở người bao gồm HCDR1, HCDR2, HCDR3, trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như thể hiện trong Fig 10, Fig 11, và Fig 12 và như được mô tả ở đây.

Theo phương án khác, kháng thể được phân lập chất đối kháng gắn kết đặc hiệu với ST2L ở người như được mô tả ở đây bao gồm:

HCDR1 của SEQ ID số: 23 hoặc 24;
 HCDR2 của SEQ ID số: 27 hoặc 28;
 HCDR3 của SEQ ID số: 31 hoặc 32;
 LCDR1 của SEQ ID số: 35 hoặc 36;
 LCDR2 hoặc SEQ ID số: 39 hoặc 40; và
 LCDR3 của SEQ ID số: 43 hoặc 44.

Theo phương án khác, kháng thể được phân lập chất đối kháng gắn kết đặc hiệu với ST2L ở người như được mô tả ở đây bao gồm trình tự HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt là:

SEQ ID số: 23, 27, 31, 35, 39 và 43;

SEQ ID số: 24, 28, 32, 36, 40 và 44; (HFA CDR);

SEQ ID số: 24, 28, 146, 36, 40 và 147; hoặc

SEQ ID số: 24, 28, 146, 36, 40 và 44.

Phương án khác theo sáng chế là chất đối kháng kháng thể được phân lập ở người hoặc được thích nghi ở người hoặc mảnh của nó gắn kết đặc hiệu với ST2L ở người như được mô tả ở đây, (SEQ ID NO: 1) bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm khung VH thu được từ IGHV3-23 ở người (SEQ ID NO: 158), trình tự khung IGHV1-24*01 (SEQ ID NO: 148) hoặc IGHV1-f*01 (SEQ ID NO: 149), và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm khung VL thu được từ IGKV3-11 ở người (L6) (SEQ ID NO: 159), trình tự khung IGKV3-15*01 (L2) (SEQ ID NO: 150), IGKV1-9*01 (L8) (SEQ ID NO: 151), IGKV1-5*01 (L12) (SEQ ID NO: 152), IGKV1-12*01 (L5) (SEQ ID NO: 153), IGKV1-39*01 (O12) (SEQ ID NO: 154), IGKV1-27*01 (A20) (SEQ ID NO: 155) or IGKV1-33*01 (O18) (SEQ ID NO: 156).

Theo phương án khác, kháng thể được phân lập gắn kết đặc hiệu với miền I của ST2L ở người như được mô tả ở đây bao gồm VH bao gồm khung VH thu được từ trình tự khung VH 3-23 ở người (SEQ ID NO: 158); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm khung VL thu được từ trình tự khung Vκ L6 ở người (SEQ ID NO: 159). Trình tự khung ở người là đã biết, và thường bao gồm trình tự vùng biến đổi dòng mầm globulin miễn dịch ở người được nối với trình tự ghép (J). Trình tự axit amin khung VH 3-23 ở người thể hiện trong SEQ ID NO: 158 bao gồm trình tự dòng mầm VH 3-23 ở người được nối với IGHJ4 và trình tự axit amin khung Vκ L6 ở người thể hiện trong SEQ ID NO: 159 bao gồm trình tự dòng mầm Vκ L6 ở người được nối với IGKJ1 như được mô tả trong Shi và các đồng tác giả, J Mol Biol 397:385-96, 2010; Công bố Patent quốc tế số Công bố Patent quốc tế số WO2009/085462; và Công bố Patent Mỹ số Công bố Patent Mỹ số US2010/0021477. Các kháng thể có trình tự VH thu được từ VH 3-23 ở người và trình tự VL thu được từ Vκ L6 ở người là các kháng thể minh họa thể hiện trong Fig 12 và Fig 13.

Ở người hoặc các kháng thể thích nghi ở người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng “thu được từ” trình tự khung hoặc dòng mầm cụ thể còn gọi là các kháng thể thu được từ hệ mà sử dụng gen globulin miễn dịch dòng mầm

ở người, như từ chuột nhất đột biến gen hoặc từ các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể như được thảo luận *infra*. Do đó, kháng thể mà “thu được từ” trình tự khung hoặc dòng mầm cụ thể có thể chứa axit amin khác so với trình tự của nó thu được từ ví dụ, các đột biến soma xảy ra tự nhiên hoặc thay thế có chủ ý.

Theo phương án khác, chất đối kháng kháng thể được phân lập ở người hoặc được thích nghi ở người hoặc mảnh của nó mà gắn kết đặc hiệu với miền I (SEQ ID NO: 9) của ST2L ở người như được mô tả ở đây cạnh tranh cho gắn kết với ST2L ở người (SEQ ID NO: 1) với kháng thể được phân lập bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 51 (kháng thể C2244).

Theo phương án khác, kháng thể được phân lập theo sáng chế như được mô tả ở đây gắn kết với ST2L ở người tại gốc axit amin 35-48 của SEQ ID NO: 1 (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210). Kháng thể như được mô tả ở đây còn có thể gắn kết với ST2L ở người tại gốc axit amin T93 và F94 của SEQ ID NO: 1.

Sự cạnh tranh giữa gắn kết đặc hiệu với ST2L ở người với các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây bao gồm một vài HCDR1, HCDR2 và HCDR3, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 hoặc bao gồm một vài Trình tự VH và VL có thể được thử nghiệm *in vitro* sử dụng các phương pháp đã biết. Ví dụ, gắn kết kháng thể được gắn MSD Sulfo-Tag™ NHS-este với ST2L ở người với sự có mặt của kháng thể không được gắn có thể được đánh giá bằng ELISA, hoặc các phân tích Biacore hoặc xytometry dòng có thể được sử dụng để chứng minh sự cạnh tranh với các kháng thể theo sáng chế. Khả năng của kháng thể thử nghiệm để ức chế gắn kết C2244 với ST2L ở người chứng minh rằng kháng thể thử nghiệm có thể cạnh tranh với các kháng thể này để gắn kết với ST2L ở người. Các kháng thể minh họa này là C2494, STLM208 và STLM213 thể hiện trong bảng 3 và Fig 13.

Các kháng thể cạnh tranh với C2244 để gắn kết với miền I của ST2L như được mô tả ở đây chặn sự tương tác IL-33/ST2L và ức chế phổ của các hoạt tính sinh học ST2L, bao gồm đáp ứng tế bào mast bị kích thích do IL-33. Không làm trung hòa epitop (tức là, không ức chế) là cũng có trên miền I của ST2L, như nhóm cạnh tranh kháng thể thứ hai (được biểu diễn bằng kháng thể C2240 mà gắn

kết với miền I của ST2L, không cạnh tranh với C2244, và không ức chế tín hiệu ST2L).

Các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây gắn kết miền ST2L cụ thể hoặc epitop có thể được thực hiện bằng làm mất hiệu lực globulin miễn dịch ở chuột nhất được biểu hiện vị trí (Lonberg và các đồng tác giả, Nature 368:856-9, 1994; Fishwild và các đồng tác giả, Nature Biotechnology 14:845-51, 1996; Mendez và các đồng tác giả, Nature Genetics 15:146-56, 1997, Công bố Patent Mỹ số 5,770,429, 7,041,870, và 5,939,598) hoặc chuột Balb/c có peptit mã hóa Epitop, ví dụ peptit có trình tự axit amin của miền I của ST2L ở người: KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFAS GQLLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTV (SEQ ID NO: 9), hoặc peptit có trình tự axit amin của RCPRQGKPSYTVDW (SEQ ID NO: 210), và sử dụng phương pháp hybridoma của Kohler và các đồng tác giả, Nature 256:495-97, 1975. Các kháng thể thu được được thử nghiệm cho gắn kết của chúng với epitop bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn. Ví dụ, khi cấu trúc của cả hai thành phần riêng biệt đã biết, chỗ nối *in silico* protein-protein có thể được tiến hành đến vị trí tương hợp đồng nhất của sự tương tác. Sự trao đổi hydro-dơ tơ ri (H/D) có thể được tiến hành với kháng nguyên và phức kháng thể đến các vùng lập bản đồ trên kháng nguyên mà có thể gắn kết bằng kháng thể. Gây đột biến đoạn và điểm kháng nguyên có thể được sử dụng để định vị axit amin quan trọng dùng cho kháng thể gắn kết. Các mAb được nhận dạng còn có thể bị biến đổi bằng cách đưa gốc hỗ trợ khung biến đổi để bảo quản ái lực gắn kết bằng kỹ thuật như được bộc lộ trong Queen và các đồng tác giả, Proc Natl Acad Sci (USA) 86:10029-32, 1989 và Hodgson và các đồng tác giả, Bio/Technology 9:421, 1991.

Các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể ở người hoặc thích nghi ở người. Các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể là typ IgA, IgD, IgE, IgG hoặc IgM.

Các kháng thể mà vị trí gắn kết kháng thể trình tự axit amin giống nhau về cơ bản như thể hiện trong Fig 10, Fig 11, Fig 12, Fig 13, Fig 15, bảng 3, bảng 9 và bảng 12 được bộc lộ. Thông thường, điều này liên quan đến một hoặc nhiều axit amin thay thế bằng axit amin có sự tích điện tương tự hoặc kỵ nước hoặc đặc

trung hóa học lập thể, và tiến hành để cải thiện đặc tính kháng thể, ví dụ độ bền hoặc ái lực. Ví dụ, sự thay thế bảo toàn có thể liên quan đến sự thay thế gốc axit amin tự nhiên có gốc không tự nhiên sao cho có một ít hoặc không tác dụng lên một phần hoặc tích điện gốc axit amin ở vị trí đó. Ngoài ra, gốc tự nhiên bất kỳ trong polypeptit có thể cũng được thế bằng Alanin, như đã được mô tả nêu trên đối với Alanin quét gây đột biến (MacLennan và các đồng tác giả, *Acta Physiol Scand Suppl* 643:55-67, 1998; Sasaki và các đồng tác giả, *Adv Biophys* 35:1-24, 1998). Sự thay thế axit amin mong muốn (dù bảo toàn hay không bảo toàn) có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đồng thời thay thế được mong muốn. Ví dụ, sự thay thế axit amin có thể được sử dụng để xác định gốc quan trọng đối với chức năng của các kháng thể, như ái lực tương tác gốc, hoặc gốc mà truyền đặc tính không mong muốn như sự tổ hợp. Axit amin minh họa thay thế thể hiện ở Fig 12 và Fig 13.

Sự thay thế ở vùng khung, ngược với vị trí gắn kết kháng nguyên có thể cũng được thực hiện miễn sao chúng không tương tác xấu đến đặc tính của kháng thể. Sự thay thế khung có thể được thực hiện ví dụ ở gốc Vernier Zone (US. Pat. No. 6,649,055) để cải thiện kháng thể ái lực hoặc độ bền. Sự thay thế có thể cũng được thực hiện tại vị trí khung này trong kháng thể mà khác ở trình tự khi so với trình tự gen dòng mầm ở người tương đồng để có thể làm giảm miễn dịch. Các biến đổi này có thể được thực hiện theo ví dụ các kháng thể thu được từ các thư viện kháng thể *de novo*, như các thư viện pIX.

Sự thay thế axit amin bảo toàn cũng bao hàm gốc axit amin xảy ra không tự nhiên mà được kết hợp thông thường bằng cách tổng hợp peptit hóa học chứ không phải là bằng cách tổng hợp trong hệ sinh học. Sự thay thế axit amin có thể được thực hiện theo, ví dụ, bằng cách gây đột biến PCR (Patent Mỹ số 4,683,195). Các thư viện chứa các biến đổi có thể được phát sinh bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết, ví dụ, sử dụng ngẫu nhiên (NNK) hoặc codon không ngẫu nhiên, ví dụ codon DVK, mà mã hóa 11 axit amin (ACDEGKNRSYW), và các thư viện sàng lọc hoặc sự biến đổi có đặc tính mong muốn.

Mặc dù phương án được minh họa ở các Ví dụ bao gồm cặp vùng biến đổi, cặp có chuỗi kháng thể đầy đủ chiều dài, hoặc cặp của các vùng CDR1, CDR2 và CDR3, một vùng từ chuỗi nặng và một vùng từ chuỗi nhẹ, người có hiểu biết

trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ công nhận rằng phương án khác có thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng đơn hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ đơn, chuỗi kháng thể có đầy đủ chiều dài đơn, hoặc các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 từ một chuỗi kháng thể, hoặc là chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ. Vùng biến đổi đơn, chuỗi kháng thể có đầy đủ chiều dài hoặc vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của một chuỗi có thể được sử dụng để chèn cho miền tương ứng trong chuỗi khác, hai chuỗi có khả năng tạo ra kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với ST2L. Sự sàng lọc có thể được hoàn thành bằng biểu hiện thực khuẩn thể các phương pháp sàng lọc bằng cách sử dụng, ví dụ, phương pháp tổ hợp hierarchical dual được bộc lộ trong Công bố PCT số WO1992/01047. Theo phương pháp này, cụm riêng biệt chứa dòng vô tính của chuỗi H hoặc L là được sử dụng để nhiễm sang thu viện hoàn toàn của các dòng vô tính mã hóa chuỗi khác (L hoặc H), và miền gắn kết với kháng nguyên đặc hiệu hai chuỗi thu được là được chọn theo biểu hiện thực khuẩn thể kỹ thuật như được mô tả.

Sáng chế đề xuất đối với miền VH và VL được phân lập của các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây và các kháng thể bao gồm một vài miền VH và VL. Vùng biến đổi VH và VL cho một vài các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây thể hiện trong Fig 13 và bảng 12.

Một phương án theo sáng chế là chất đối kháng kháng thể được phân lập ở người hoặc được thích nghi ở người hoặc mảnh của nó mà gắn kết đặc hiệu với miền I (SEQ ID NO: 9) của ST2L ở người bao gồm VH ít nhất là 90% giống với VH của SEQ ID NO: 191.

Phương án khác theo sáng chế là chất đối kháng kháng thể được phân lập ở người hoặc được thích nghi ở người hoặc mảnh của nó mà gắn kết đặc hiệu với miền I (SEQ ID NO: 9) của ST2L ở người bao gồm VL ít nhất là 94% giống với VL của SEQ ID NO: 209.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, sáng chế đề xuất đối với kháng thể bao gồm VH của SEQ ID số: 143, 144, 145, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 hoặc 205.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, sáng chế đề xuất đối với kháng thể bao gồm VL của SEQ ID số: 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 206, 207, 208 hoặc 209.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, sáng chế đề xuất đối với kháng thể bao gồm

VH của SEQ ID số: 186, 187, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 hoặc 205 và tVL của SEQ ID NO: 206;

VH của SEQ ID số: 195 hoặc 196 và VL của SEQ ID NO: 207;

VH của SEQ ID số: 188, 189 hoặc 190 và VL của SEQ ID NO: 208; hoặc

VH của SEQ ID số: 187, 191, 192, 193 hoặc 194 và VL của SEQ ID NO: 209.

Phương án khác theo sáng chế chất đối kháng kháng thể được phân lập ở người hoặc được thích nghi ở người hoặc mảnh của nó mà gắn kết đặc hiệu với miền I (SEQ ID NO: 9) của ST2L ở người bao gồm:

HCDR1 của SEQ ID NO: 97;

HCDR2 của SEQ ID NO: 114;

HCDR3 của SEQ ID NO: 84;

LCDR1 của SEQ ID NO: 130;

LCDR2 của SEQ ID NO: 90;

LCDR3 của SEQ ID NO: 134; hoặc

VH của SEQ ID NO: 191 và VL của SEQ ID NO: 209.

Các mAb ở người thiếu trình tự không phải ở người bất kỳ có thể được tạo ra và được đánh giá từ các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể bằng kỹ thuật viện dẫn trong, ví dụ, Knappik và các đồng tác giả, *J Mol Biol* 296:57-86, 2000; và Krebs và các đồng tác giả, *J Immunol Meth* 254:67-84 2001. Theo phương án mẫu, các kháng thể theo sáng chế được phân lập từ các thư viện biểu hiện vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể như protein dung hợp với protein phủ pIX ăn vi khuẩn. Các thư viện kháng thể được chèn cho gắn kết với ST2L ở người-ECD và các dòng tính dương thu được còn được đặc trưng, được phân lập Fab từ lysat tách dòng, và biểu hiện như IgG có đầy đủ chiều dài. Các thư viện kháng thể và các phương pháp sàng lọc minh họa được mô tả trong Shi và các đồng tác giả, *J Mol Biol* 397:385-96, 2010; Công bố Patent quốc tế số Công bố Patent quốc tế số WO2009/085462, và Đơn Patent Mỹ số 12/546850; Các Patent Mỹ số 5,223,409, 5,969,108, và 5,885,793).

Các mAb thu được còn có thể bị biến đổi ở vùng khung của chúng để thay đổi một vài khung gốc đến các khung có ở dòng mầm ở người phù hợp.

Đặc tính của chất tác dụng có miễn dịch của các kháng thể theo sáng chế có thể được tăng cường hoặc để yên thông qua sự biến đổi Fc bằng kỹ thuật đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, Chức năng chất tác dụng Fc như sự gắn kết C1q, độc tố tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), độc tố tế bào qua trung tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity -ADCC), thực bào, sự điều hòa ức chế của chất thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, chất thụ thể tế bào B; BCR), v.v..có thể được tạo ra và/hoặc được kiểm soát bằng gốc biến đổi trong đáp ứng Fc cho các hoạt tính này. Đặc tính được động học có thể cũng được tăng cường bằng cách thay đổi gốc ở miền Fc mà kéo dài bán phần kháng thể (Strohl Curr Opin Biotechnol 20:685-91, 2009). Sự biến đổi Fc mẫu là IgG4 S228P/L234A/L235A, IgG2 M252Y/S254T/T256E (Dall'Acqua và các đồng tác giả, J Biol Chem 281:23514-24, 2006; hoặc IgG2 V234A/G237A/P238S, V234A/G237A/H268Q, H268A/V309L/A330S/P331 hoặc V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S trên IgG2 (Intl. Pat. Appl. No. WO2011/066501) (đánh số theo số EU).

Ngoài ra, các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể bị biến đổi sau dịch mã theo quy trình như sự glycosyl hóa, sự đồng phân hóa, sự khử glycosyl hóa hoặc sự biến đổi cộng hóa trị xảy ra không tự nhiên như bổ sung các gốc polyethylen glycol (sự pegyl hóa) và sự hoàn trả. Sự biến đổi này có thể xảy ra *in vivo* hoặc *in vitro*. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể được kết hợp với polyethylen glycol (được PEGylat hóa) để cải thiện hồ sơ được động học của chúng. Sự ghép có thể được tiến hành bằng kỹ thuật đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sự ghép trị liệu các kháng thể có PEG đã thể hiện để tăng cường được lực học trong khi không can thiệp với chức năng (Knigh và các đồng tác giả, Platelets 15:409-18, 2004; Leong và các đồng tác giả, Xytokin 16:106-19, 2001; Yang và các đồng tác giả, Protein Eng 16:761-70, 2003).

Các kháng thể hoặc các mảnh của chúng theo sáng chế như được mô tả ở đây bị biến đổi để cải thiện độ bền, tính chọn lọc, độ phản ứng chéo, ái lực, miễn

dịch hoặc đặc tính sinh lý hoặc sinh học mong muốn khác trong phạm vi sáng chế. Độ bền của kháng thể là ảnh hưởng bởi một số yếu tố, bao gồm (1) đóng gói lõi của miền riêng biệt mà tương tác độ bền bên trong của chúng, (2) tác động bề mặt chung protein/protein mà đã tác động dựa trên cặp HC và LC, (3) bài tiết gốc tích điện và có cực, (4) mạng lưới gắn kết H cho gốc được nạp và có cực; và (5) bề mặt tích điện và sự phân bố gốc có cực trong số tác động phân tử được bài tiết và các phân tử bên trong khác (Worn và *các đồng tác giả*, J Mol Biol 305:989-1010, 2001). Cấu trúc tiềm tàng làm mất ổn định gốc có thể được nhận dạng dựa trên cấu trúc tinh thể của kháng thể hoặc bằng mô hình hóa phân tử ở một vài trường hợp, và tác dụng của gốc trên độ bền kháng thể có thể được thử nghiệm bằng cách phát sinh và ước tính các biến thể chứa các đột biến ở gốc được nhận dạng. Một trong số các cách để tăng độ bền kháng thể là tăng quá trình chuyển đổi nhiệt (T_m) như được đo bằng phép đo nhiệt lượng quét vi phân (differential scanning calorimetry-DSC). Nói chung, protein T_m tương quan với độ bền và nghịch đảo của nó tương quan với độ nhạy của nó để không được nhân và biến tính trong dung dịch và quy trình biến chất thất phụ thuộc vào xu hướng của protein không được nhân (Remmele và *các đồng tác giả*, Biopharm 13:36-46, 2000). Một số nghiên cứu đã phát hiện sự tương quan giữa sự sắp xếp của độ bền vật lý của công thức đo như độ bền nhiệt bằng DSC và độ bền vật lý được đo theo các phương pháp khác (Gupta và *các đồng tác giả*, AAPS PharmSci 5E8, 2003; Zhang và *các đồng tác giả*, J Pharm Sci 93:3076-89, 2004; Maa và *các đồng tác giả*, Int J Pharm 140:155-68, 1996; Bedu-Addo và *các đồng tác giả*, Pharm Res 21:1353-61, 2004; Remmele và *các đồng tác giả*, Pharm Res 15:200-8, 1997). Công thức nghiên cứu cho thấy rằng Fab T_m có phép kéo theo cho độ bền vật lý dài hạn của mAb tương ứng. Sự khác biệt ở axit amin hoặc trong khung hoặc trong phạm vi CDR có thể có các tác dụng quan trọng dựa trên độ bền nhiệt của miền Fab (Yasui và *các đồng tác giả*, FEBS Lett 353:143-6, 1994).

Các kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với miền I của ST2L ở người như được mô tả ở đây có thể được thiết kế vào các kháng thể đặc hiệu kép mà cũng được bao hàm trong phạm vi sáng chế. Các vùng VL và/hoặc VH của các kháng thể theo sáng chế có thể được thiết kế sử dụng các phương pháp được công bố vào chuỗi đơn các kháng thể đặc hiệu kép làm cấu trúc như các dạng TandAb®

(Công bố Patent quốc tế số WO1999/57150; Công bố Patent Mỹ số US2011/0206672) hoặc vào scFV đặc hiệu kép làm cấu trúc như được bộc lộ trong Patent Mỹ số US5869620; Công bố Patent quốc tế số Công bố Patent quốc tế số WO1995/15388A, Công bố Patent quốc tế số WO1997/14719 hoặc Công bố Patent quốc tế số WO2011/036460.

Các vùng VL và/hoặc VH của các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể được thiết kế vào đặc hiệu kép có đầy đủ chiều dài các kháng thể, trong đó mỗi cơ cấu kháng thể gắn kết kháng nguyên khác hoặc epitop. Các kháng thể đặc hiệu kép này thường được thực hiện bằng cách làm điều biến tác động CH3 giữa hai kháng thể chuỗi nặng để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép sử dụng kỹ thuật như các kỹ thuật được mô tả trong Patent Mỹ số US7695936; Công bố Patent quốc tế số WO04/111233; Công bố Patent Mỹ số US2010/0015133; Công bố Patent Mỹ số US2007/0287170; Công bố Patent quốc tế số WO2008/119353; Công bố Patent Mỹ số US2009/0182127; Công bố Patent Mỹ số US2010/0286374; Công bố Patent Mỹ số US2011/0123532; Công bố Patent quốc tế số WO2011/131746; Công bố Patent quốc tế số WO2011/143545; hoặc Công bố Patent Mỹ số US2012/0149876. Cấu trúc đặc hiệu kép bổ sung vào các vùng VL và/hoặc VH của các kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp theo ví dụ Globulin miễn dịch miền biến đổi đối ngẫu (Công bố Patent quốc tế số WO2009/134776), hoặc cấu trúc mà bao gồm miền dime hóa biến đổi để kết nối hai cơ cấu kháng thể có tính đặc hiệu khác nhau, như Leuxin zipper hoặc miền dimer hóa tạo keo (Công bố Patent quốc tế số WO2012/022811, Patent Mỹ số US5932448; Patent Mỹ số US6833441).

Khía cạnh khác theo sáng chế là polynucleotit được phân lập mã hóa bất kỳ kháng thể vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc kháng thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc các mảnh của chúng theo sáng chế hoặc sự bổ sung của chúng. một vài polynucleotit mẫu được bộc lộ ở đây, tuy nhiên, polynucleotit khác mà tạo ra sự thoái hóa mã hóa gen hoặc ưu tiên codon trong hệ biểu hiện đưa ra, mã hóa các chất đối kháng kháng thể theo sáng chế cũng trong phạm vi sáng chế. Polynucleotit mẫu theo sáng chế các polynucleotit thể hiện trong SEQ ID số: 211, 212, 213 và 214.

Phương án khác theo sáng chế là vectơ bao gồm polynucleotit theo sáng chế. Các vectơ này có thể vectơ plasmid, vectơ virus, các vectơ dùng cho sự biểu hiện baculovirus, các vectơ dựa trên gen nhảy hoặc vectơ phù hợp khác bất kỳ dùng để đưa polynucleotit theo sáng chế vào sinh vật cho hoặc nền tảng gen bằng bất kỳ có nghĩa là.

Phương án khác theo sáng chế là tế bào chủ bao gồm polynucleotit theo sáng chế. Tế bào chủ này có thể là tế bào nhân chuẩn, các tế bào vi khuẩn, tế bào thực vật hoặc các tế bào cổ khuẩn. Các tế bào nhân chuẩn minh họa có thể là động vật có vú, côn trùng, loài chim hoặc động vật hoặc các tế bào có nguồn gốc khác. Các tế bào nhân chuẩn của động vật có vú bao gồm dòng tế bào làm cho sống như thể dòng tế bào lai hoặc u tủy như SP2/0 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, CRL-1581), NS0 (European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC No. 85110503), các dòng tế bào ở chuột FO (ATCC CRL-1646) và Ag653 (ATCC CRL-1580). Dòng tế bào u tủy ở người làm mẫu là U266 (ATCC CRL-TIB-196). các dòng tế bào hữu dụng khác bao gồm các dòng thu được từ các tế bào buồng trứng của chuột Trung quốc (CHO) như CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD), CHO-K1 (ATCC CRL-61) hoặc DG44.

Phương án khác theo sáng chế là phương pháp sản xuất kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với miền I của ST2L, bao gồm nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế và thu hồi kháng thể được tạo ra bởi tế bào chủ. Các phương pháp sản xuất các kháng thể và làm sạch chúng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Phương án khác theo sáng chế là kháng thể theo sáng chế để sử dụng trong của phương pháp ức chế sự tương tác ST2L với IL-33 trong đối tượng bao gồm việc dùng cho đối tượng kháng thể gắn kết đặc hiệu với miền I của ST2L với lượng vừa đủ để ức chế sự tương tác của ST2L và IL-33.

Các phương pháp điều trị

Các chất đối kháng ST2L được bộc lộ ở đây, ví dụ Các chất đối kháng thụ thể ST2L chặn sự tương tác IL-33/ST2L và gắn kết với miền I của ST2L, các kháng thể mà cạnh tranh cho gắn kết với ST2L ở người (SEQ ID NO: 1) với kháng thể được phân lập bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 51, hoặc các kháng thể gắn kết với

ST2L ở người tại gốc axit amin 35-48 của SEQ ID NO: 1 (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210) có thể được dùng để tạo ra hệ có miễn dịch. Các kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể có hiệu quả hơn làm đối kháng hoạt tính sinh học ST2L khi so với các kháng thể gắn kết miền khác và/hoặc các vùng trên ST2L như các kháng thể theo sáng chế có thể hiệu quả hơn làm giảm đáp ứng tế bào mast bị kích thích do IL-33. Các kháng thể bất kỳ theo sáng chế có thể được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế. Các kháng thể minh họa mà có thể được sử dụng ở các phương pháp theo sáng chế là các kháng thể STLM62, STLM15, STLM103, STLM107, STLM108, STLM123, STLM124, STLM206, STLM207, STLM208, STLM209, STLM210, STLM211, STLM212, STLM213. Mà không mong muốn gắn kết theo học thuyết bất kỳ, đề xuất rằng các chất đối kháng kháng thể mà gắn kết với miền I và chặn sự tương tác IL-33/ST2L có thể ức chế sự hình thành phức IL-1RAcP/IL-33/ST2L/cKit hoặc tín hiệu xuôi dòng trên các tế bào mast, trong khi miền III gắn kết với các kháng thể, trong khi có thể ức chế sự tuyển IL-1RAcP đến phức ST2L/IL-33, có thể không thể phá vỡ sự hình thành của phức IL-1RAcP/IL-33/ST2L/cKit lớn hơn cụ thể phát hiện trên các tế bào mast. Microarray tiến hành hỗ trợ đề xuất như nó được chứng minh rằng miền I kháng ST2L gắn kết với các kháng thể ngăn chặn phần lớn quá trình tín hiệu tế bào mast bị kích thích do IL-33, và miền I kháng ST2LII này gắn kết với các kháng thể có thể chỉ để ức chế tập hợp nhỏ của các quá trình tín hiệu này. Có thể thực hiện được rằng do IL-33 gắn kết với ST2L nên trên để kết hợp protein IL-1RAcP phụ trợ, có thể chặn IL-33 gắn kết với ST2L bởi miền I gắn kết với các kháng thể có thể kết hợp ngăn ngừa của protein phụ trợ khác bất kỳ, bao gồm cKit hoặc như chưa được nhận dạng đồng thụ thể. miền III gắn kết với các kháng thể, mà không gây nhiễu với IL-33 gắn kết với ST2L, có thể theo lý thuyết chặn sự kết hợp L-1RAcP nhưng không kết hợp đồng thụ thể khác, bao gồm như chưa được nhận dạng đồng thụ thể. Nhiều kiểu hình đã được đề xuất đối như thế nào về IL-1RAcP ảnh hưởng với IL-1/IL-1R hoặc phức ST2L/IL-33es (Lingel và các đồng tác giả, cấu trúc 17: 1398–1410, 2009; và được xem xét bởi Thomas và các đồng tác giả, Nat Struct & Molec Biol 19: 455-457, 2012). Các mô hình này cho thấy rằng IL-1RAcP có thể gắn kết với một vị trí của phức, nhưng vị trí này đã không có biểu hiện thuyết phục. Do đó có thể

thực hiện được rằng ‘vị trí khác’ hoặc ‘vị trí tự do’ của phức là có sẵn dùng cho sự kết hợp với lần lượt đồng thụ thể, sẽ không bị chặn bởi miền kháng thể III, và các tác dụng đích tất như tăng sự tuyển đồng thụ thể khác, có thể thu được ở tín hiệu tăng.

Theo các phương pháp theo sáng chế, bất kỳ kháng thể chất đối kháng gắn kết đặc hiệu với miền I của ST2L ở người, kháng thể chất đối kháng chặn sự tương tác IL-33/ST2L và gắn kết với miền I của ST2L ở người, các kháng thể mà cạnh tranh cho gắn kết với ST2L ở người (SEQ ID NO: 1) với kháng thể được phân lập bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 51, hoặc các kháng thể gắn kết với ST2L ở người tại gốc axit amin 35-48 của SEQ ID NO: 1 (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210) có thể được sử dụng. Đặc trưng bổ sung các kháng thể này bao gồm khả năng của kháng thể chặn sự tương tác IL-33/ST2L và để ức chế sự đáp ứng tế bào mast ở người.

Do đó, các kháng thể theo sáng chế phù hợp dùng để điều trị quang phổ của tình trạng bệnh qua trung gian ST2L, Tình trạng bệnh viêm Tình trạng bệnh viêm qua trung gian ST2L và tình trạng trong đó sự ức chế sự đáp ứng tế bào mast được mong muốn.

Các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh nhân là động vật thuộc về phân loại bất kỳ. Ví dụ về động vật này bao gồm các động vật như người, động vật gặm nhấm, chó, mèo và các động vật ở trang trại. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế hữu dụng để phòng bệnh và điều trị tình trạng bệnh qua trung gian ST2L, như viêm các bệnh bao gồm hen, siêu phản ứng qua đường hô hấp, bệnh sarcoit, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chronic obstructive mắc bệnh phổi disease -COPD), xơ hóa phổi tự phát (sự xơ hóa phổi tự phát -IPF), xơ nang, bệnh viêm đại tràng (inflammatory bowel disease -IBD), viêm khớp dạng thấp, viêm thực quản tăng bạch cầu eosin, xơ cứng bì, viêm da dị ứng, viêm mũi dị ứng, bệnh pemfigut, chứng mày đay mạn tính, thận tiểu đường, viêm bàng quang kẽ hoặc bệnh vật cấy ghép phản ứng lại vật chủ (Graft Versus Host Disease -GVHD). Các kháng thể theo sáng chế hữu dụng để phòng bệnh và điều trị các bệnh trung gian có miễn dịch ít nhất ở một phần bằng các tế bào mast, như hen, eczema,

ngứa, viêm mũi dị ứng, dị ứng viêm màng kết, cũng như các bệnh tự miễn dịch như viêm khớp dạng thấp, bệnh pemfig và đa xơ cứng.

Các kháng thể theo sáng chế và cũng hữu dụng để bào chế được phẩm dùng để điều trị, trong đó được phẩm này được bào chế dùng ở liều được xác định dưới đây.

Các tế bào mast đóng vai trò trung tâm ở chứng viêm dị ứng và hen thông qua giải phóng của chúng về các chất trung gian (được xem xét bởi Amin, *Respir Med* 106:9-14, 2012). ST2L biểu hiện cao trên các tế bào mast và sự hoạt hóa của nó dẫn đến sự biểu hiện của nhiều xytokin gây viêm và các chất trung gian khác. Sự ức chế của hoạt tính ST2L là đề xuất gây nhiều bằng tế bào mast qua trung gian tuyển chọn tế bào viêm và để hình thành chứng viêm mạn tính.

Các tế bào mast đáp ứng nhanh sự kích thích, bao gồm đề xuất dị ứng nguyên, không khí lạnh, tác nhân gây bệnh; sự tổn thương cho tế bào nội mô bằng các tế bào biểu mô có thể thu được trong sự giải phóng IL-33 (được xem xét bởi Zhao và Hu, *Cell & Molec Immunol* 7: 260-2, 2012). Các tế bào mast giải phóng leukotrien, histamin, prostaglandin, và xytokin để tăng tính thấm mạch và sự co thắt phế quản, và tuyển chọn các tế bào miễn dịch khác như các bạch cầu trung tính, tế bào ưa eozin và tế bào bạch huyết T đến vị trí (Henderson và các đồng tác giả, *JEM* 184:1483-94, 1996; White và các đồng tác giả, *JACI* 86:599-605, 1990). Ngoài ra, chúng tăng cường có miễn dịch đáp ứng bằng cách kích thích do tăng cường điều chỉnh phân tử bám dính trên các tế bào nội mạc để tăng sự chuyển động tế bào miễn dịch (Meng và các đồng tác giả, *J Cell Physiol* 165:40-53, 1995). Các tế bào mast đóng vai trò quan trọng mô hình hóa lại qua đường hô hấp; ở bệnh hen, tăng số lượng tế bào mast là phát hiện trong lớp tế bào cơ trơn qua đường hô hấp (ASM), và bài tiết chất trung gian để xúc tiến sự phát sinh ASM (được xem xét bởi Okayama và các đồng tác giả, *Curr Opin Immunol* 19:687-93, 2007).

Tình trạng bệnh viêm phổi là ví dụ về Tình trạng bệnh viêm. Tình trạng bệnh viêm phổi minh họa bao gồm tình trạng mắc bệnh phổi bị kích thích do sự lây nhiễm lây nhiễm bao gồm các tình trạng này kết hợp với lây nhiễm virus, vi khuẩn, nấm, ký sinh trùng hoặc prion lây nhiễm; tình trạng mắc bệnh phổi bị kích thích do dị ứng nguyên; tình trạng mắc bệnh phổi bị kích thích do chất gây ô

nhiễm như bệnh bụi amiang, bệnh bụi phổi, hoặc bệnh ngộ độc beryllium; tình trạng mắc bệnh phổi bị kích thích do sự hít dịch vào dạ dày, rối loạn miễn dịch, Tình trạng bệnh viêm có gen bẩm sinh như xơ nang, và trạng mắc bệnh phổi bị kích thích do tình chấn thương vật lý, như chấn thương do thông khí. Các Tình trạng bệnh viêm này cũng bao gồm hen, tràn khí, bệnh viêm phế quản, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh sarcoitsarcoit, bệnh mô bào, u lành tính ở mạch bạch huyết, tổn thương phổi cấp tính, hội chứng suy kiệt phổi cấp tính, mạn tính lung bệnh, loạn sản phế quản phổi, viêm phổi ở cộng đồng, viêm phổi bệnh viện, viêm phổi kết hợp với máy thở, nhiễm trùng, viêm phổi do virus, nhiễm cúm, nhiễm parainfluenza, virus rota sự lây nhiễm, nhiễm virus gây biến dạng phổi ở người, nhiễm virus hợp bào hô hấp và *Aspergillus* hoặc sự lây nhiễm nấm khác. Các bệnh viêm kết hợp lây nhiễm có thể bao gồm virus hoặc viêm phổi do vi khuẩn, bao gồm viêm phổi trầm trọng, xơ nang, bệnh viêm phế quản, làm trầm trọng qua đường thông khí và hội chứng suy kiệt phổi cấp tính (ARDS). Tình trạng kết hợp lây nhiễm này có thể liên quan đến sự nhiễm như sự nhiễm virus ban đầu và sự nhiễm vi khuẩn thứ hai. Tín hiệu ST2L được dysregulat hóa có thể đóng vai trò ở bệnh lý của các bệnh về phổi như hen và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD) (xem trong Alcorn và các đồng tác giả, Annu Rev Physiol 72:495-516, 2010). Các mô hình động vật được sử dụng thông thường đối với hen và chứng viêm qua đường hô hấp bao gồm mô hình kích thích ovalbumin, mô hình làm nhạy metacholin và sự làm nhạy bằng *Aspergillus fumigatus* (Hessel và các đồng tác giả, Eur J Pharmacol 293:401-12, 1995). Sự ức chế xytokin và sản phẩm chemokin từ các tế bào biểu mô cuống phổi ở người được nuôi cấy, các nguyên bào sợi của cuống phổi hoặc tế bào cơ trơn qua đường hô hấp có thể cũng được sử dụng làm mô hình *in vitro*. Dùng các chất đối kháng theo sáng chế đối với bất kỳ các mô hình này có thể được sử dụng để đánh giá sử dụng các chất đối kháng này để thuyên giảm các triệu chứng và biến đổi lộ trình của chứng hen, chứng viêm qua đường hô hấp, COPD và các chứng tương tự.

Hen là bệnh viêm của phổi mà đặc trưng ở chỗ đường hô hấp nhạy cảm hơn (“AHR”), sự co thắt phế quản, sự khó thở, tế bào ưa eozinic hoặc chứng viêm ưa bạch cầu trung tính, sự tăng tiết dịch nhầy, xơ hóa dưới biểu mô, và mức IgE cao. Các bệnh nhân đã từng mắc hen “trầm trọng”, các triệu chứng trở nên xấu,

phổ biến nhất là do sự lây nhiễm vi khuẩn qua đường hô hấp (ví dụ, virus rhino, virus influenza, *Haemophilus influenza*, v.v.). Sự tấn công của chứng hen có thể được khởi phát bởi yếu tố môi trường (ví dụ, giun đũa, côn trùng, động vật (ví dụ, mèo, chó, thỏ, chuột nhắt, chuột, chuột đồng, chuột lang và chim), nấm, chất gây ô nhiễm qua đường không khí (ví dụ, khói thuốc lá), hơi kích thích, luồng khói, hơi nước, sol khí, hóa chất, phân hoa, tập thể dục, hoặc không khí lạnh. Ngoài chứng hen, một vài bệnh mạn tính viêm làm ảnh hưởng đến phổi đặc trưng ở sự thâm thấu bạch cầu trung tính qua đường hô hấp, ví dụ bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chronic obstructive pulmonary disease -COPD), viêm phổi do vi khuẩn và xơ nang (Linden và các đồng tác giả, *Eur Respir J* 15:973-7, 2000; Rahman và các đồng tác giả, *Clin Immunol* 115:268-76, 2005), và các bệnh như COPD, viêm mũi dị ứng, và xơ nang đặc trưng ở chỗ là đường hô hấp nhạy cảm hơn (Fahy và O'Byrne, *Am J Respir Crit Care Med* 163:822-3, 2001). Các mô hình động vật được sử dụng thông thường đối với hen và chứng viêm qua đường hô hấp bao gồm mô hình của metacholin kích thích sau đó ovalbumin làm nhạy và kích thích (Hessel và các đồng tác giả, *Eur J Pharmacol* 293:401-12, 1995). Sự ức chế của xytokin và sản phẩm chemokin from các tế bào biểu mô cuống phổi ở người được nuôi cấy, các nguyên bào sợi của cuống phổi hoặc tế bào cơ trơn qua đường hô hấp có thể cũng được sử dụng làm *in vitro* các mô hình. Dùng các chất đối kháng kháng thể theo sáng chế đối với bất kỳ các mô hình này có thể được sử dụng để đánh giá sử dụng các chất đối kháng này để thuyên giảm các triệu chứng và biến đổi lộ trình của chứng hen, chứng viêm qua đường hô hấp, COPD và các chứng tương tự.

Tín hiệu IL-33 thông qua thụ thể ST2L trên các tế bào Th2, bạch cầu ưa kiềm, các tế bào mast, và Innate Lymphoid Type 2 được mô tả có tính mới thu được thu được các tế bào ở sự bài tiết IL-5 và IL-13 (xytokin typ 2) (ILCs được xem xét bởi Spits và các đồng tác giả, *Nature Reviews Immunology* 13:145-149, 2013). Các tác dụng hữu ích để điều trị bệnh đích IL-5 hoặc IL-13 ở hen xác định sự liên quan của các con đường này. Tế bào ưa eozin hoạt tính IL-5, và điều trị nhóm phụ của chứng hen trầm trọng có tế bào ưa eozin ở đờm với kháng thể đơn dòng mà làm trung hòa IL-5 thu được ở tính trầm trọng thấp hơn (Nair và các đồng tác giả *N Engl J Med.* 2009; 360(10):985-93). IL-13 thể hiện góp phần tổng

hợp IgE, sự bài tiết dịch nhầy và sự xơ hóa. Điều trị chứng hen trầm trọng có kháng thể đơn dòng kháng IL-13 thu được để làm thuyên giảm ở chức năng của phổi, có nhóm phụ được chứng minh là làm thuyên giảm nhiều hơn (Corren và các đồng tác giả, N. Engl. J. Med., 365:1088–1098, 2011). Các chất trung gian khác của con đường miễn dịch vi phân cũng bao gồm ở sự phát sinh bệnh hen, và làm chặn các chất trung gian này, bổ sung vào ST2L, có thể thường bổ sung điều trị có ích. Điều trị nhiều bệnh đích loại 2 xytokin, hoặc con đường ngược dòng typ 2 sản sinh xytokin, có thể là có ích ở bệnh đau nhức.

Miền VH và VL của Các kháng thể ST2L theo sáng chế có thể được kết hợp thành các kháng thể đặc hiệu kép và các phân tử được mô tả ở đây, trong đó kháng thể đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu với miền I của ST2L và kháng nguyên thứ hai như TSLP (thymic stromal lymphopoietin), IL-25, IL-17RB hoặc TSLPR.

IL-25 và TSLP, giống IL-33, xytokin typ 2 giải phóng khởi phát thông qua các phức tín hiệu khác: IL-25 (IL-17E) là thành phần của họ IL-17 và các tín hiệu thông qua IL-17RA/IL-17RB, và TSLP là thành phần của họ IL-7 và các tín hiệu thông qua heterodime TSLPR/IL-7R α (được xem xét bởi Koyasu và các đồng tác giả, Immunol 132:475-481, 2011). Các động vật thiếu IL-33, ST2L, IL-25, IL-17RB, TSLP, hoặc TSLPR chứng minh rằng chứng viêm qua đường hô hấp ít nghiêm trọng ở ít nhất một trong số nhiều loại khác nhau của các mô hình chuột của chứng hen; tuy nhiên thiếu sự bảo vệ từ chứng viêm qua đường hô hấp có thể có ở hầu hết các mô hình động vật này, tăng khả năng mà bộc lộ tế bào nội mô đến dị ứng nguyên khác nhau hoặc tác nhân gây bệnh có thể giải phóng khởi phát đồng phát IL-33, IL-25, và TSLP. Hammad và các đồng tác giả cho thấy rằng việc dùng con một trong bụi nhà lấy từ chuột nhắt thu được ở sự giải phóng IL-25, TSLP và IL-33 (cũng như xuôi dòng IL-5 và IL-13 của IL-33) vào đường hô hấp (Hammad và các đồng tác giả, Nat Med 15:210-216, 2009). Đề xuất rằng việc làm chặn ST2L và TSLP và/hoặc IL-25 có thể có các tác dụng hữu ích, cụ thể bệnh về đường hô hấp trầm trọng.

Theo phương án khác theo sáng chế các chất đối kháng kháng thể gắn kết đặc hiệu với miền I của ST2L ở người có thể được sử dụng để phát sinh các phân tử đặc hiệu kép mà gắn kết với ST2L và TSLP, ST2L và IL-25, ST2L và TSLPR, ST2L và IL-17RA, hoặc ST2L và IL-17RB.

Theo phương án khác theo sáng chế, các chất đối kháng kháng thể gắn kết đặc hiệu với miền I của ST2L ở người là kháng thể đặc hiệu kép, trong đó kháng thể còn gắn kết TSLP, IL-25, TSLPR, IL-17RA hoặc IL-17RB.

TSLP, IL-25, TSLPR, IL-17RA và IL-17RB gắn kết với các kháng thể có thể được phát sinh bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây, như làm mất hiệu lực globulin miễn dịch ở chuột nhắt được biểu hiện vị trí (Lonberg và các đồng tác giả, *Nature* 368:856-9, 1994; Fishwild và các đồng tác giả, *Nature Biotechnology* 14:845-51, 1996; Mendez và các đồng tác giả, *Nature Genetics* 15:146-56, 1997, US. Pat. Nos. 5,770,429, 7,041,870, và 5,939,598) hoặc chuột Balb/c với protein hoặc miền ngoại bào tương ứng của protein, hoặc sử dụng các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể như được mô tả ở đây. Theo một cách khác, biểu hiện các kháng thể đối với TSLP, IL-25, TSLPR, IL-17RA và IL-17RB có thể được sử dụng để phát sinh các phân tử đặc hiệu kép. IL-25 các kháng thể minh họa mà có thể được sử dụng các kháng thể minh họa này được mô tả trong ví dụ Công bố Patent quốc tế số WO2011/123507.

Chứng viêm khớp, bao gồm chứng viêm xương khớp, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp do chấn thương, và các chứng tương tự, Tình trạng bệnh viêm thông thường, điều này sẽ có lợi từ việc sử dụng điều trị protein kháng viêm, như các chất đối kháng theo sáng chế. Sự hoạt hóa tín hiệu ST2L có thể duy trì chứng viêm và còn mô sự tổn thương ở chỗ bị thương. Một vài các mô hình động vật đối với viêm khớp dạng thấp đã biết. Ví dụ, ở mẫu viêm khớp bị kích thích do collagen (CIA), chứng viêm khớp viêm mạn tính phát triển ở chuột mà giống với viêm khớp dạng thấp ở người. Bệnh phát triển giảm dần ST2L-thiếu (ST2KO) ở chuột ở các mô hình này, và bệnh lý ở các mô hình này phụ thuộc vào biểu hiện ST2L bằng các tế bào mast (Xu và các đồng tác giả, *PNAS* 105:10913-8, 2008). Ở các mô hình này, làm giảm sự thâm thấu đơn hạt nhân và các tế bào bạch cầu hạt và của sự tăng sản hoạt dịch ở chỗ của chuột ST2KO. Giọt LNs của chuột ST2KO được nuôi cấy với collagen (CII) thể hiện giảm đáng kể sản phẩm IL-17, IFN γ , và TNF α . Chuột thiếu ST2L phát chuột được di chuyển có các tế bào mast thu được từ kiểu tùy xương (WT) hoang dã (BMMC), trước khi CIA bị kích thích, phát triển trầm trọng hơn CIA so với chuột được ghép với ST2KO BMMCs. Do đó tín hiệu ST2L bằng các tế bào mast giới hạn để phát triển chứng viêm khớp ở

mô hình chuột mà giống với viêm khớp dạng thấp ở người. Dùng các kháng thể ST2L theo sáng chế, mà đáp ứng tế bào mast ức chế, đến mô hình chuột CIA có thể được sử dụng để đánh giá sử dụng các chất đối kháng này để thuyên giảm các triệu chứng và biến đổi lộ trình của bệnh.

Tình trạng bệnh viêm dày minh họa là bệnh viêm đại tràng (IBD), viêm loét đại tràng (UC) và bệnh của Crohn (CD), viêm kết tràng bị kích thích do những chấn thương từ môi trường (ví dụ, chứng viêm dạ dày (ví dụ, viêm kết tràng) gây ra bởi hoặc được tổ hợp với (ví dụ, làm tác dụng phụ) chế độ trị liệu, như dùng của phép chữa hóa học, phép trị liệu bằng bức xạ, và các phép tương tự), viêm kết tràng do lây nhiễm, viêm kết tràng do thiếu máu cục bộ, collagen hoặc viêm kết tràng tế bào lympho, viêm ruột hoại tử, viêm kết tràng ở tình trạng như bệnh u hạt mạn tính hoặc bệnh celiac, dị ứng thực phẩm, viêm dạ dày, viêm dạ dày do lây nhiễm hoặc bệnh ruột đại tràng (ví dụ, viêm dạ dày hoạt tính mạn tính bị kích thích do *Helicobacter pylori*) và các dạng khác của chứng viêm dạ dày gây ra bởi tác nhân lây nhiễm. Một vài các mô hình động vật mắc Tình trạng bệnh viêm dạ dày. Một số mô hình được sử dụng rộng rãi nhất là mô hình viêm kết tràng bị kích thích do 2,4,6-trinitrobenesulfonic axit/etanol (TNBS) hoặc mô hình oxazonon, mà bị kích thích do chứng viêm mạn tính và sự loét kết tràng (Neurath và các đồng tác giả, Intern Rev Immunol 19:51-62, 2000). Mô hình khác sử dụng dextran sunfat natri (DSS), mà bị kích thích do an cấp tính viêm kết tràng biểu hiện như tiêu chảy ra máu, sút cân, làm ngắn đại tràng và loét niêm mạc với sự thâm thấu bạch cầu trung tính. Mô hình khác liên quan đến chuyển giao nuôi cấy tế bào CD4 T cao CD45RB tự nhiên vào RAG hoặc chuột SCID. Ở các mô hình này, tế bào T tự nhiên dono tấn công ruột nhận gây chứng viêm ruột mạn tính và các triệu chứng giống đến bệnh viêm ruột ở người (Read và Powrie, Curr Protoc Immunol Chapter 15 unit 15,13, 2001). Việc dùng các chất đối kháng theo sáng chế ở bất kỳ các mô hình này có thể được sử dụng để đánh giá tính hiệu quả tiềm tàng của các chất đối kháng này để thuyên giảm các triệu chứng và biến đổi lộ trình về các bệnh được tổ hợp với chứng viêm ở ruột, như bệnh viêm đại tràng.

Chứng xơ hóa thận có thể phát triển từ gây thương tích cấp tính như chứng thiếu máu cục bộ do ghép/sự tái tưới máu (Freese và các đồng tác giả, Nephrol Dial

Sự cấy ghép 16:2401-6, 2001) hoặc mạn tính tình trạng như bệnh đái tháo đường (Ritz và các đồng tác giả, *Nephrol Dial* Sự cấy ghép 11 Suppl 9:38-44, 1996). Sự phát sinh bệnh thường đặc trưng ở sự đáp ứng viêm đầu tiên tiếp theo được duy trì liên tục bệnh lý xơ hóa của dụng cụ lọc cầu thận và khoang dạng ống (Liu, *Kidney Int* 69:213-7, 2006). Sự xơ hóa cảm ứng thận đã thể hiện đóng vai trò giới hạn ở sự phát sinh bệnh chấn thương thận để sự phá hủy thận ở giai đoạn cuối và tế bào tiểu quản gần gốc đã được bộc lộ làm chất trung gian trung tâm (Phillips và Steadman, *Histol Histopathol* 17:247-52, 2002; Phillips, *Chang Gung Med J* 30:2-6, 2007). Bệnh lý xơ hóa ở bộ phận cảm ứng thận là trung gian ở một phần bằng sự hoạt hóa các nguyên bào sợi lưu trú, mà bài tiết xytokin gây viêm kích thích tế bào nội mô tiểu quản proximal để bài tiết viêm cục bộ và các chất trung gian fibrogen. Ngoài ra, xytokin hóa chất được bài tiết bằng các nguyên bào sợi và biểu mô các tế bào và tạo ra sự thâm thấu dẫn gradien có hướng của bạch cầu đơn phân/đại thực bào và các tế bào T vào khoang dạng ống. Phá hủy sự viêm tạo ra fibrogenic bổ sung và viêm xytokin mà còn nguyên bào sợi hoạt tính và biểu mô xytokin giải phóng trong khi cũng kích thích tế bào nội mô trải qua sự chuyển đổi phenotypic trong đó các thành phần chất nền ngoại bào dư deposit tế bào (Simonson, *Kidney Int* 71:846-54, 2007).

Tình trạng xơ hóa minh họa khác có thể bao gồm sự xơ hóa ở gan (bao gồm không giới hạn đến xơ gan bị kích thích do rượu, xơ gan bị kích thích do virus, viêm gan bị kích thích do tự miễn dịch); sự xơ hóa phổi (bao gồm không giới hạn đến xơ cứng bì, sự xơ hóa phổi tự phát); sự xơ hóa thận (bao gồm không giới hạn đến xơ cứng bì, bệnh thận đái tháo đường, viêm tiểu cầu thận, lupus ban đỏ); sự xơ hóa da (bao gồm không giới hạn đến xơ cứng bì, sự phình trướng và tạo sẹo lồi, vết bỏng); xơ hóa tủy xương; xơ hóa thần kinh; chứng xơ hóa; xơ hóa ruột; và xơ hóa tủy xương thu được từ quá trình phẫu thuật. Sự xơ hóa có thể hoặc sự xơ hóa cụ thể gan hoặc sự xơ hóa toàn thân. Hoặc sự xơ hóa cụ thể gan có thể được tổ hợp với sự xơ hóa phổi, sự xơ hóa ở gan, sự xơ hóa thận, sự xơ hóa tim, sự xơ hóa mạch, sự xơ hóa da, sự xơ hóa mắt hoặc sự xơ hóa tủy xương. Sự xơ hóa phổi có thể được tổ hợp với sự xơ hóa phổi tự phát, bệnh sự xơ hóa phổi bị kích thích do thuốc, hen, bệnh sarcoitt hoặc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính. Sự xơ hóa ở gan có thể được tổ hợp với xơ gan, bệnh sán lá gan hoặc viêm đường mật. Xơ gan có thể được chọn từ xơ gan do rượu, xơ gan do viêm gan C trước, xơ gan

mật ban đầu. Viêm đường mật có thể làm xơ cứng viêm đường mật. Sự xơ hóa thận có thể được tổ hợp với thận tiểu đường hoặc xơ hóa cầu thận luput. Sự xơ hóa tim có thể được tổ hợp với nhồi máu cơ tim. Sự xơ hóa mạch có thể được tổ hợp với chứng hẹp động mạch thần kinh học trước hoặc xơ vữa động mạch. Sự xơ hóa da có thể được tổ hợp với sự tạo sẹo do bỏng, tạo sẹo do sự phình trương, sẹo lồi, hoặc bệnh da sự xơ hóa do nephrogenic. Sự xơ hóa mắt có thể được tổ hợp với sự xơ hóa sau hốc mắt, phẫu thuật đục thủy tinh thể trước hoặc tăng sinh dịch kính võng mạc. Sự xơ hóa tủy xương có thể được tổ hợp với xơ hóa tủy xương tự phát hoặc xơ hóa tủy xương bị kích thích do thuốc. Sự xơ hóa toàn thân có thể xơ cứng toàn thân hoặc bệnh vật cấy ghép phản ứng lại vật chủ.

Tình trạng bệnh viêm khác và bệnh thần kinh, mà có thể ngăn ngừa hoặc điều trị bằng các phương pháp theo sáng chế các tình trạng này gây ra bởi các bệnh tự miễn dịch. Các tình trạng và bệnh thần kinh này bao gồm đa xơ cứng, lupus ban đỏ hệ thống, và các rối loạn thoái hóa thần kinh và hệ thần kinh trung ương (CNS) bao gồm bệnh của Alzheimer, bệnh của Parkinson, bệnh của Huntington, bệnh rối loạn lưỡng cực và bệnh xơ cứng cột bên teo cơ (ALS), các bệnh về gan bao gồm xơ gan mật ban đầu, viêm đường mật làm xơ cứng ban đầu, bệnh về gan do béo phì không phải do rượu/bệnh steatohepatitis, sự xơ hóa, virus viêm gan C (HCV) và virus viêm gan B (HBV), bệnh đái tháo đường và sự kháng insulin, cardiovascular các rối loạn bao gồm xơ vữa động mạch, cerebral hemorrhage, stroke và nhồi máu cơ tim, chứng viêm khớp, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vẩy nến và viêm khớp dạng thấp nguyên sinh (juvenile rheumatoid arthritis-JRA), chứng loãng xương, chứng viêm xương khớp, viêm tụy, sự xơ hóa, viêm não, bệnh vẩy nến, Viêm động mạch tế bào khổng lồ, bệnh viêm cột sống dính khớp, viêm gan tự miễn dịch, virus suy giảm miễn dịch ở người (HIV), Tình trạng bệnh viêm da, sự cấy ghép, ung thư, dị ứng, các bệnh về nội tiết, sẽ chữa các rối loạn tự miễn dịch khác, đường hô hấp nhạy cảm hơn và tế bào, virus, hoặc nhiễm trùng trung gian prion hoặc các rối loạn.

Một phương án theo sáng chế là phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng bệnh qua trung gian ST2L bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu để điều trị của chất đối kháng kháng thể được phân lập ở người hoặc được thích nghi ở người mà gắn kết đặc hiệu với miền I (SEQ ID NO: 9) của ST2L ở người, chặn sự

tương tác IL-33/ST2L, cạnh tranh cho gắn kết với ST2L ở người (SEQ ID NO: 1) có kháng thể được phân lập bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 51 và/hoặc gắn kết với ST2L ở người tại gốc axit amin 35-48 của SEQ ID NO: 1 (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210) đối với bệnh nhân cần nó trong khoảng thời gian vừa đủ để điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng bệnh qua trung gian ST2L.

Phương án khác theo sáng chế là phương pháp đáp ứng tế bào mast ức chế ở bệnh nhân bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu để điều trị của chất đối kháng kháng thể được phân lập ở người hoặc được thích nghi ở người mà gắn kết đặc hiệu với miền I (SEQ ID NO: 9) của ST2L ở người, chặn sự tương tác IL-33/ST2L, cạnh tranh cho gắn kết với ST2L ở người (SEQ ID NO: 1) có kháng thể được phân lập bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 51 và/hoặc gắn kết với ST2L ở người tại gốc axit amin 35-48 của SEQ ID NO: 1 (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210) đối với bệnh nhân cần nó trong khoảng thời gian vừa đủ để ức chế sự đáp ứng tế bào mast.

Phương án khác theo sáng chế là phương pháp ức chế sự tương tác của IL-33 và ST2L trong đối tượng, bao gồm việc dùng đối với đối tượng chất đối kháng kháng thể được phân lập ở người hoặc được thích nghi ở người mà gắn kết đặc hiệu với miền I (SEQ ID NO: 9) của ST2L ở người, chặn sự tương tác IL-33/ST2L, cạnh tranh cho gắn kết với ST2L ở người (SEQ ID NO: 1) có kháng thể được phân lập bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 51 và/hoặc gắn kết với ST2L ở người tại gốc axit amin 35-48 của SEQ ID NO: 1 (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210) với lượng vừa đủ để ức chế sự tương tác của IL-33 và ST2L.

Theo phương án khác, tình trạng bệnh qua trung gian ST2L là hen, siêu phản ứng qua đường hô hấp, bệnh sarcoit, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), xơ hóa phổi tự phát(IPF), xơ nang, bệnh viêm đại tràng, (IBD), viêm thực quản tăng bạch cầu eosin, xơ cứng bì, viêm da dị ứng, viêm mũi dị ứng, bong nước pemfigut, chứng mày đay mạn tính, thận tiểu đường, viêm khớp dạng thấp, viêm

bằng quang kế hoặc bệnh vật cấy ghép phản ứng lại vật chủ (Graft Versus Host Disease-GVHD).

Theo phương án khác, tình trạng bệnh qua trung gian ST2L là được tổ hợp với sự tuyển chọn tế bào viêm ở phổi, sự tăng sản tế bào ly, hoặc tăng sự bài tiết dịch nhầy.

Theo phương án khác, tình trạng bệnh qua trung gian ST2L là được tổ hợp với đáp ứng tế bào mast.

Theo phương án khác, đáp ứng tế bào mast ức chế bao gồm ức chế mức GM-CSF, IL-5, IL-8, IL-10 hoặc IL-13 được giải phóng theo các tế bào mast thu được từ máu cuống rốn ở người bằng ít nhất 50% có 50 µg/ml kháng thể.

Theo phương án khác, kháng thể chất đối kháng được dùng đối với bệnh nhân cần nó là kháng thể đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu với miền I (SEQ ID NO: 9) của ST2L ở người, chặn sự tương tác IL-33/ST2L, cạnh tranh cho gắn kết với ST2L ở người (SEQ ID NO: 1) có kháng thể được phân lập bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 51 và/hoặc gắn kết với ST2L ở người tại gốc axit amin 35-48 của SEQ ID NO: 1 (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210), VÀ còn gắn kết TSLP, IL-25, TSLPR, IL-17RA hoặc IL-17RB.

Cách dùng/Dược phẩm

“lượng hữu hiệu để điều trị” các kháng thể kháng ST2L hữu hiệu để điều trị tình trạng mà điều biến hoạt tính sinh học ST2L mong muốn có thể được xác định bằng kỹ thuật nghiên cứu chuẩn. Ví dụ, liều kháng thể kháng ST2L sẽ hữu hiệu để điều trị tình trạng bệnh viêm như hen hoặc viêm khớp dạng thấp có thể được xác định bằng việc dùng kháng thể kháng ST2L liên quan các mô hình động vật, như các mô hình được mô tả ở đây.

Ngoài ra, các thử nghiệm *in vitro* có thể tùy ý được dùng để giúp xác định phạm vi liều lượng tối ưu. Lựa chọn liều hữu hiệu cụ thể có thể được xác định (ví dụ, thông qua các thử nghiệm lâm sàng) bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dựa trên sự xem xét về một vài yếu tố. Yếu tố này bao gồm bệnh được điều trị hoặc được ngăn ngừa, các triệu chứng liên quan, khối lượng cơ thể của bệnh nhân, tình trạng miễn dịch của bệnh nhân và các yếu tố khác đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Liều chính xác được

dùng theo công thức sẽ cũng phụ thuộc vào liệu trình dùng, và tính nghiêm trọng của bệnh, và nên quyết định theo chuẩn đoán của bác sĩ đa khoa và mỗi trường hợp của bệnh nhân. Các liệu hữu hiệu có thể được ngoại suy từ đường đáp ứng liệu thu được từ *in vitro* hoặc hệ thử nghiệm mô hình động vật.

Mô hình dùng để sử dụng điều trị kháng thể theo sáng chế có thể là liệu trình phù hợp bất kỳ mà cung cấp các thuốc đến đại lý. Dược phẩm của các kháng thể này cụ thể hữu dụng để dùng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, dùng qua đường dưới da, dùng qua đường cơ, dùng qua đường ruột, dùng qua đường tĩnh mạch, dùng áp da, hoặc dùng qua đường mũi.

Kháng thể theo sáng chế có thể điều chế làm dược phẩm chứa lượng hữu hiệu của thuốc như thành phần hoạt tính trong chất mang dược dụng. Thuật ngữ "chất mang" còn được gọi là chất làm nhọt, chất phụ gia, tá dược, hoặc dung môi với hoạt chất được dùng. Các dung môi dược này có thể là chất lỏng, như nước và dầu, bao gồm các dầu mỡ, động vật, thực vật hoặc có nguồn gốc tổng hợp, như dầu lạc, dầu đậu tương, dầu khoáng, dầu mè và các loại tương tự. Ví dụ, 0,4% salin và 0,3% Glyxin có thể được sử dụng. Các dung dịch này là steril và thường không có chất dạng hạt. Chúng có thể được khử trùng bằng quy định, kỹ thuật khử trùng đã biết (ví dụ, lọc). các dược phẩm có thể chứa chất phụ gia dược dụng theo yêu cầu gần giống với các điều kiện sinh lý như điều chỉnh độ pH và thuốc làm chất đệm, chất làm ổn định, chất làm dày, chất bôi trơn và các thuốc tạo màu, v.v.. Nồng độ của kháng thể theo sáng chế theo công thức dược này có thể khác nhau, tức là, từ ít hơn khoảng 0,5%, thường ở hoặc ít nhất khoảng 1% đến lớn hơn như 15 hoặc 20% theo trọng lượng và sẽ được chọn đầu tiên được dựa trên yêu cầu về liều, thể tích chất lỏng, độ nhớt, v.v., theo mô hình cụ thể dùng được chọn.

Do đó, dược phẩm theo sáng chế dùng cho sự tiêm qua đường cơ có thể tạo ra chứa 1 ml nước được chất đệm với steril, và nằm trong khoảng từ 1 ng đến 100 mg, ví dụ nằm trong khoảng từ 50 ng đến 30 mg hoặc tốt hơn nữa, nằm trong khoảng từ 5 mg đến 25 mg, của kháng thể kháng ST2L theo sáng chế. Tương tự, dược phẩm theo sáng chế dùng cho sự tiêm truyền qua đường tĩnh mạch có thể được tạo ra lên đến khoảng 250 ml của dung dịch của Ringer về steril, và nằm trong khoảng từ 1 mg đến 30 mg và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 mg đến 25 mg chất đối kháng theo sáng chế. Các phương pháp thực tế sản xuất dược phẩm

dùng ngoài đường tiêu hóa đã biết và được mô tả chi tiết hơn trong, ví dụ, "Remington's Pharmaceutical Science", 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được làm đông lạnh để bảo quản và được hoàn nguyên trong chất mang phù hợp nêu trên để sử dụng. Kỹ thuật này đã thể hiện có hiệu quả với globulin miễn dịch quy định và sự điều chế protein và kỹ thuật sự làm khô lạnh và sự hoàn nguyên đã biết có thể được dùng.

Theo sáng chế mô tả bằng cách viện dẫn đến các ví dụ không giới hạn cụ thể sau đây.

VẬT LIỆU và PHƯƠNG PHÁP (chung)

Thử nghiệm ức chế gắn kết phổi tử - thụ thể (*Macaca fascicularis*, *Cyno*) ở người và khỉ *Cynomolgus* (Thử nghiệm RLB)

Phủ tấm 96 giếng bằng 50µl ST2L -ECD ở người 4 µg/ml (axit amin 19-328 của SEQ ID NO: 1) hoặc 2µg/ml ST2L-ECD ở khỉ cyno (axit amin 19-321 của SEQ ID NO: 2) có đánh dấu His₆ ở đầu C trong chất đệm bicarbonat ở 4°C trong 16 giờ. Tất cả bước sau được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng. Chặn tấm bằng 200 µl chất đệm chặn, và rửa 3 lần bằng 300µl chất đệm rửa chứa PBS+0,05% Tween. Bổ sung 30µl các dung dịch pha loãng khác nhau của mab kháng ST2L vào các giếng và ủ trong 1 giờ. Đối với thử nghiệm gắn kết thụ thể-phối tử ở người, thêm 20µl IL-33 được biotinylat hóa ở người (các gốc 112-270 của SEQ ID NO: 3) với 100ng/ml nồng độ cuối và ủ trong 30 phút. Với thử nghiệm gắn kết thụ thể-phối tử ở khỉ Cyno, thêm 20µl IL-33 được biotinylat hóa ở cyno (các gốc 112-269 của SEQ ID NO: 4) với 200ng/ml nồng độ cuối và ủ trong 30 phút. Rửa tấm 3 lần bằng 300µl chất đệm rửa. Thêm 50µl Streptavidin-HRP 0,2 µg/ml (Jackson Immunoresearch) và ủ trong 30 phút. Rửa tấm 3 lần bằng 300µl chất đệm rửa chứa PBS+0,05% Tween. Bổ sung 50µl cơ chất TMB (EMD Biosciences) vào mỗi giếng. Dùng phản ứng bằng cách thêm 100µl axit sulfuric 0,2N. Đo OD450 bằng cách sử dụng Máy đọc tấm Envision (Perkin Elmer).

Tạo ra các cấu trúc ST2L thể khảm

Thiết kế và tạo ra cấu trúc khác nhau có các biến đổi human và miền I, II, III của ST2L ở chuột và người bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử

tiêu chuẩn. Các cấu trúc được liệt kê trong bảng 1. Axit amin đánh số tương ứng với các protein ST2L ở người (hST2L)(SEQ ID NO: 1; NP_057316) và ST2L ở chuột(mST2L)(SEQ ID NO: 5; NP_001020773) Protein.

Bảng 1.

C Tên cấu trúc	Gốc axit amin đối với mỗi miền ở cấu trúc thể khảm		
	Miền I	Miền II	Miền III
HHM-ST2L	hST2L aa. 19-122	hST2L aa. 123-202	mST2L aa. 209-324
MHM-ST2L	mST2L aa. 28-128	hST2L aa. 123-202	mST2L aa. 209-324
HMH-ST2L	hST2L aa. 19-122	mST2L aa. 129-208	hST2L aa. 203-321
HH-ST2L	hST2L aa.19-122	hST2L aa. 123-205	N/A

hST2L: ST2L SEQ ID NO: 1 ở người

mST2L: ST2L SEQ ID NO: 1 ở chuột

Thử nghiệm xác định miền gắn kết.

Kháng thể gắn kết với miền I, II và III của ST2L, như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA chụp tiêu chuẩn nhờ mẫu thăm dò huỳnh quang hóa điện tử (Meso-Scale Discovery (MSD) technology). 10 µg/mL của mỗi kháng thể được phủ trên mỗi giếng của tấm MSD HighBind plate (5µL/giếng) trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Chặn tấm bằng 150µL chất đệm chặn MSD 5% trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và rửa 3 lần bằng chất đệm rửa HEPES, sau đó là thêm 25µL huST2L-ECD được đánh dấu đầu sulfo hoặc ST2L-ECD ở chuột (axit amin 28-326 của SEQ ID NO: 5) hoặc HHM-ST2L (SEQ ID NO:6) hoặc các thể khảm HMH-ST2L (SEQ ID NO: 8) và hoặc HH-ST2L (các gốc 19-205 của SEQ ID NO: 1) vào tấm tăng nồng độ từ 5 nM đến 40 nM. Bao phủ tấm bằng lá nhôm và ủ trong 1 giờ nhiệt độ trong phòng với lắc nhẹ nhàng. Tiếp đó, rửa tấm w 3 lần bằng chất đệm rửa HEPES. Bổ sung chất đệm đọc MSD (150 µl) vào mỗi giếng, và tiếp đó đọc tấm bằng cách sử dụng MSD Sector Imager 6000.

Các kháng thể đó được gắn kết bởi ST2L-ECD ở người, HHM-ST2L và HMH-ST2L, nhưng không bởi ST2L-ECD ở chuột nhận biết miền I của ST2L - ECD ở người. Các kháng thể được gắn kết bằng ST2L -ECD ở người và HMH-ST2L, nhưng không bằng HHM-ST2L và ST2L-ECD ở chuột, nhận biết miền III của ST2L -ECD ở người. Các kháng thể được gắn kết bởi ST2L-ECD ở người và ở chuột nhưng không phải HH-ST2L nhận biết miền III của ST2L-ECD ở người và ở chuột.

Đo ái lực của các mAb kháng ST2L

Các mAb kháng ST2L, huST2L-ECD và cynoST2L-ECD được biểu hiện bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn. Ab đặc hiệu với mảnh kháng IgG Fcγ ở người của dê (cat# 109-005-098) thu được từ các phòng thử nghiệm của Jackson ImmunoResearch laboratories (West Grove, PA). Các chip cảm ứng GLC (Bio-Rad cat# 176-5011), chip cảm ứng CM-5 (GE Healthcare cat# BR100014) và các chất phản ứng để chuẩn bị bề mặt chụp thu được từ Biacore (GE healthcare, Piscataway, NJ) hoặc từ Bio-Rad Life Sciences (Bio-Rad, Hercules, CA).

Sự tác động của các kháng thể kháng ST2L có ST2L-ECD ở người được gắn His₆ và ST2L-ECD ở khỉ cyno được gắn His₆ đã được nghiên cứu bởi ProteOn bằng cách sử dụng ProteOn XPR36 ở 25°C. Bề mặt cảm ứng sinh học được chuẩn bị bằng cách ghép mảnh kháng thể đặc hiệu với kháng IgG Fcγ (Ab) ở người của dê với bề mặt của chip cảm ứng GLC bằng cách sử dụng các hướng dẫn của nhà sản xuất về hóa học ghép amin. Chất đệm ghép là natri axetat 10 mM, độ pH = 4,5. Cố định kháng IgG Fcγ ở người của dê (khoảng 4500 đơn vị phản ứng) theo chiều ngang. Các kháng thể kháng ST2L được cung cấp sạch, hoặc ở dạng dịch nổi thô. Trong một trong hai trường hợp này, các kháng thể này được pha loãng trong PRB (PBS có độ pH là 7,4, được bổ sung bằng, 3mM EDTA, và 0,005% Tween 20) thành nồng độ khoảng 0,5μg/mL. Các kháng thể được chụp (60-130 RU) theo chiều dọc lên trên chip GLC biến đổi kháng thể kháng Fcγ ở người. Sau đó chụp mAb kháng ST2L bằng cách tiêm huST2L ECD trong dung dịch (0,024 đến 15 nM với pha loãng gấp 5 lần) hoặc cynoST2L ECD trong dung dịch (0,020 - 5 nM với pha loãng gấp 4 lần) theo chiều ngang. Kiểm soát hỗn hợp trong 4 phút trong tất cả các thử nghiệm (200μL được tiêm ở 50 μL/phút). Kiểm soát sự phân ly trong 30 phút. Thu được sự tái tạo bề mặt cảm biến bằng ba lần xung động 15 giây của Glyxin 10 mM có độ pH là 1,5. Dữ liệu được điều chỉnh bằng cách sử dụng phần mềm ProteOn và sử dụng mô hình 1:1 bằng dịch chuyển khối lượng.

Tiến hành các thử nghiệm Biacore bằng cách sử dụng cảm biến sinh học Biacore 2000 hoặc Biacore 3000 (Biacore AB). Tất cả các thử nghiệm được chạy trong BRB (PBS có độ pH là 7,4, được bổ sung bằng 3mM EDTA và 0,005% Tween 20) có hoặc không có 0,1% BSA ở 25°C.

Chuẩn bị bề mặt cảm biến Biacore bằng cách ghép Ab đặc hiệu với mảnh kháng IgG Fc γ ở người của dê với bề mặt dextran được carboxymetylat hóa của chip CM-5 bằng các hướng dẫn của nhà sản xuất trong hóa học ghép amin. Chất đệm ghép là 10mM natri axetat, độ pH=4,5. Cố định trung bình 6000 đơn vị phản ứng (RU) Ab trong một trong bốn tế bào chảy. mAb kháng ST2L được chụp (khoảng 33 RU) lên trên bề mặt chip cảm biến biến đổi bởi kháng thể kháng Fc γ ở người. Chụp mAb kháng ST2L sau đó là tiêm huST2L ECD trong dung dịch (0,2 đến 15 nM trong các pha loãng gấp 3 lần) hoặc cynoST2L ECD trong dung dịch (0,2 đến 15 nM hoặc 0,020 - 5 nM, trong các pha loãng gấp 3 lần). Kiểm soát các hỗn hợp trong 4 phút hoặc 8 phút (200 μ L được tiêm ở 50 μ L/phút hoặc 20 μ L/ phút trong C2521 và C2519). Kiểm soát sự phân ly trong 10 phút, hoặc lên đến 2,5 giờ. Thu được sự tái tạo bề mặt cảm biến bằng việc tiêm 50mM NaOH và/hoặc tiêm 100mM H₃PO₄.

Xử lý dữ liệu bằng cách sử dụng phần mềm Scrubber, phiên bản 1,1g (phiên bản BioLogic). Loại trừ viện dẫn kép dữ liệu được tiến hành bằng cách trừ các đường cong được tạo ra bằng cách tiêm chất đệm từ các đường cong được trừ viện dẫn để phân tích các lần tiêm để hiệu chỉnh sự đóng góp của chất đệm contribution với tín hiệu và tiếng ồn của dụng cụ (Myszka, Journal of Mol Recogn 12:279-84, 1999).

Sau khi xử lý dữ liệu, phân tích dữ liệu được tạo ra để xác định động lực và ái lực bằng cách sử dụng phần mềm Scrubber hoặc phần mềm đánh giá BIA, phiên bản 4,0,1 (Biacore, AB). Phân tích dữ liệu động lực bằng cách sử dụng mô hình gắn kết 1:1 đơn giản bao gồm thời gian để dịch chuyển khối lượng.

Đo ái lực của kháng mAb của ST2L ở chuột (C1999/CNTO3914) với ST2L ECD của chuột.

Biểu hiện và tinh chế miền ngoại bào ST2L (muST2L-ECD) của chuột và kháng ST2L mAb (C1999/CNTO3914) bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn. Ab đặc hiệu với mảnh kháng IgG Fc γ ở chuột thu được từ Jackson ImmunoResearch laboratories (West Grove, PA). Các chip cảm ứng và các chất phản ứng để chuẩn bị bề mặt chụp thu được từ Biacore (GE healthcare, Piscataway, NJ). Chất đệm chạy thử nghiệm Biacore (BRB) chứa PBS có độ pH=7,4 với 0,005% Tween 20 và 0,1 mg/mL BSA và dữ liệu được thu ở 25°C.

Nghiên sự tương tác của kháng thể khángST2L với muST2L-ECD trên Biacore2000 ở 25°C. Bề mặt cảm biến sinh học được chuẩn bị bằng cách ghép kháng thể đặc hiệu với kháng Fc ở chuột với bề mặt của chip cảm biến CM4 bằng cách sử dụng các hướng dẫn của nhà sản xuất trong hóa học ghép amin. C1999/CNTO3914 và muST2L-ECD được pha loãng trong BRB. C1999 được chụp bằng cách sử dụng kháng thể kháng Fc γ ở chuột (khoảng 85 RU). Sau khi chụp là tiêm muST2L ECD (các gốc 28-326 của SEQ ID NO: 5) trong dung dịch (bắt đầu từ 15 nM, 5 nồng độ, trong dải pha loãng gấp 3 lần). Kiểm soát các hỗn hợp trong 8 phút. Kiểm soát sự phân ly lên đến 6000 giây. Tiến hành sự tái tạo bằng cách sử dụng 1/100 pha loãng axit phosphoric. Dữ liệu được điều chỉnh bằng cách sử dụng mô hình gắn kết 1:1.

Thử nghiệm dòng tế bào bạch cầu ưa kiềm ở người (thử nghiệm giải phóng xytokin của tế bào bạch cầu ưa kiềm)

Các tế bào KU812 (dòng tế bào bạch cầu ưa kiềm ở người; ATCC, CRL-2099) được đặt trong tấm nuôi cấy mô đáy chữ U 96 giếng khử trùng với 25,000 hoặc 50,000 các tế bào/ giếng trong tổng 40 μ l môi trường sinh trưởng RPMI 1640 (Invitrogen) được bổ sung 10% FBS và Penicillin/ streptomycin. Các mAb kháng ST2L ở người và các đối chứng được bổ sung với các nồng độ khác nhau (50 μ l/giếng) và được ủ ở 37°C. Sau 1 giờ ủ, thêm IL-33 “chín” (axit amin 111-270 của SEQ ID NO: 3) ở nồng độ cuối là 10ng/ml trong 10 μ l môi trường sinh trưởng RPMI. Sau đó, ủ các tế bào ở 37°C trong 18-24 giờ để cho phép cảm ứng IL-5 và IL-6 qua trung gian IL-33. Sau khi ủ, thu hoạch các tế bào và thu góp dịch nổi tế bào để thăm dò sau đó IL-5 và IL-6 bị kích thích do IL-33 bằng cách sử dụng phân tích ELISA (R&D systems) hoặc phân tích đa phức dựa trên hạt (Millipore).

Thử nghiệm giải phóng xytokin của tế bào mast ở người và thử nghiệm giải phóng PGD₂

Các tế bào mast thu được từ các tế bào máu cuống rốn ở người CD34⁺ (Lonza). Các lọ đông >1,0 x10⁶ của các tế bào máu cuống rốn CD34⁺ được làm tan chảy nhanh và di chuyển vào ống nón cụt 50ml. Bổ sung từ từ các giọt môi trường Stem-Pro 34 được làm ấm hoặc ở nhiệt độ trong phòng + chất bổ sung (tổng 25ml; Invitrogen) vào các tế bào. Ly tâm các tế bào với 1,000 vòng/ phút trong 15 phút và tái tạo huyền phù trong môi trường (10ml StemPro-34, với các

chất bổ sung sau: 30ng/ml IL-3, 100 ng/ml IL-6, và SCF 100ng/ml. Các tế bào được đặt trong 2 giếng của tấm 6 giếng, và nuôi cấy trong 1 tuần. Vào ngày thứ 4, các tế bào được nhân rộng 1:3 trong môi trường Stem Pro-34 được bổ sung. Vào ngày thứ 7, tế bào không bám dính Ts được loại bỏ và được đặt ở $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ trong môi trường StemPro-34 chứa 10 ng/ml IL-6 và SCF 100 ng/ml. Các tế bào were được nhân rộng hàng tuần để duy trì mật độ tế bào là $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ cho đến khi các tế bào mast chín ở 6-10 tuần (được đánh giá bằng biểu hiện của FcεR1, cKit, và tryptaza).

Nuôi cấy các tế bào mast chín ở $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ trong StemPro-34 và được kích thích hàng ngày trong 4 ngày trong IL-4 (10ng/ml; Peprotech), IL-6 (10ng/ml; R&D Systems) và SCF (100ng/ml; Invitrogen). Trước khi thử nghiệm, các tế bào được thu hoạch, ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 10 phút và tái tạo huyền phù trong môi trường StemPro-34 tươi hoặc RPMI chứa 10% FCS không có thuốc kháng sinh, có 100ng/ml SCF tái tổ hợp ở người. Các tế bào được đặt với mật độ từ 65000 đến 75,000 tế bào/ 0,16 ml/giếng trong đáy phẳng, tấm 96 giếng được xử lý với canh trường. Bổ sung kháng ST2L mab vào tấm với nồng độ cuối là 50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032μg/ml trong 30 phút trước khi thêm IL-33. IL-33 “chín” ở người tái tổ hợp (các gốc 111-270 của SEQ ID NO: 3) cũng được điều chế ở 10X (10 hoặc 30 ng/ml) trong môi trường + SCF 100ng/ml. 20μl IL-33 10X được bổ sung vào các giếng, với nồng độ cuối là 1 (Fig 6 và 7A-7E) hoặc 3 ng/ml (Fig 8A-8E), và tấm được ủ qua đêm ở 37°C, 5% CO₂. Thu hoạch dịch nổi canh trường từ 18 đến 24 giờ sau khi kích thích. Tấm được ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi và đặt vào tấm 96 giếng đáy chữ U và bảo quản ở -20°C trước khi thử nghiệm. Sử dụng các kit xytokin ở người từ Millipore để phân tích các mức xytokin bằng cách sử dụng công nghệ Luminex™. Đo các mức PGD₂ bằng cách sử dụng kit Prostaglandin D₂-MOX EIA từ Cayman Chemical Company, theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để tăng cường hoạt tính cảm ứng của ELISA, PGD₂ trong dịch nổi canh trường trong tế bào mast được chuyển đổi thành MOX-PGD₂ không phân hủy (metoxylsamin-PGD₂) bằng cách xử lý bằng metoxylsamin hydroclorua (MOX-HCl).

Thử nghiệm ức chế gắn kết thụ thể-phối tử ở chuột (thử nghiệm RLB)

Phủ tấm sạch 96 giếng (VWR) với 50µl 2 µg/ml kháng IgG ở người của dê, kháng thể đặc hiệu với mảnh Fcγ (Jackson ImmunoResearch) trong khoảng 16 giờ ở 4°C. Hoàn thành các bước còn lại nhiệt độ trong phòng. Ủ các giếng với chất đệm chặn, rửa và thêm 50µl ST2L-ECD ở chuột 2 µg/ml được dung hợp với Fc ở người trong 1 giờ. Rửa tấm và thêm 1 µg/ml mIL-33 được biotinylat hóa có hoặc không có kháng thể kháng mST2L. Rửa tấm và sự phát hiện được thực hiện bằng streptavidin-HRP (Jackson Immune Research) và tín hiệu được phát triển bằng cơ chất TMB (RDI Division of Fitzgerald Industries) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các thử nghiệm gen báo cáo ở người (thử nghiệm RGA ở chuột hoặc ở người)

Các tế bào HEK293 được đặt với 50000 tế bào/giếng trong tấm 96 giếng được xử lý-nuôi cấy mô đáy sạch màu trắng (NUNC) trong DMEM, 10%FBS và được trong máy ủ được làm ẩm ở 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ. Các tế bào được chuyển nhiễm đồng thời bằng các vector mã hóa một trong hai vector ST2L-ECD cADN ở chuột hoặc ở người, NF-κB-Luciferaza (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) sử dụng Lipofectamin™ 2000 trong môi trường Opti-MEM (Invitrogen) bằng cách sử dụng các quy trình chuẩn. Sau 24 giờ ủ ở 37°C, 5% CO₂, xử lý các tế bào được chuyển nhiễm với chuột (R&D Systems, các gốc 109-266 của SEQ ID NO: 5) hoặc IL-33 ở người (các gốc 112-270 hoặc SEQ ID NO: 3) có hoặc không có các kháng thể kháng ST2L trong 16 giờ ở 37°C, 5% CO₂. Hoạt tính luciferaza được đo bằng cách sử dụng Steady-Glo® reagent (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thử nghiệm tăng sinh tế bào T ở chuột

Nuôi cấy các tế bào Th2 ở chuột (D10.G4,1, ATCC) trong môi trường sinh trưởng hoàn thiện: môi trường RPMI 1640 có 2mM L-glutamin được điều chỉnh chứa 1,5 g/L natri bicarbonat, 4,5 g/L glucoza, 10mM HEPES, và 1,0 mM natri pyruvat, và được bổ sung bằng: 0,05 mM 2-mercaptoetanol, 10 pg/ml IL-1α (R&D Systems), 10% huyết thanh thai nhi của bò, 10% yếu tố T-STIM có Con A (canh trường IL-2 ở chuột bổ sung có sẵn từ Becton Dickinson). Rửa các tế bào hai lần với môi trường thử nghiệm (RPMI, 10%FBS, không IL-1, không T-STIM), được tái tạo huyền phù ở 1,25x10⁵ các tế bào/ml và được đặt trong 80µl

môi trường trong tấm 96 giếng được xử lý với nuôi cấy mô đáy trong màu trắng (NUNC, Rocheste, NY). Các lượng khác nhau của IL-33 ở chuột (các gốc 109-266 của SEQ ID NO: 5) được bổ sung vào các tế bào với thể tích thử nghiệm cuối là 100 μ l. Khi thử nghiệm trung hòa kháng thể, bổ sung các kháng thể đối chứng (được chặn trong môi trường lai được sử dụng) hoặc dịch nổi tế bào lai vào các tế bào và ủ trong 1 giờ sau khi thêm 20pg/ml mIL-33. Nuôi cấy tấm trong 24 giờ trong máy ủ được làm ẩm ở 37C, 5% CO₂. Đếm các tế bào sống bằng các chất phản ứng CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI); quy trình được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thử nghiệm tế bào mast thu được từ tủy xương của chuột

Các tế bào mast ở chuột thu được từ tủy xương của Chuột Balb/c (6 weeks). Các tế bào được đặt ở 300,000 các tế bào/giếng trong môi trường RPMI (không có nội độc tố), 10% FBS, 10% WEHI môi trường điều kiện với dòng tế bào, 10ng/ml IL-3 (Peprotech), 0,1mM axit amin thiết yếu, 1% Penixillin/Streptomycin (Invitrogen). Kháng ST2L mab (100, 10, 1, 0,1, hoặc 0,01 μ g/ml) được ủ với các tế bào trong 1 giờ trước khi thêm IL-33 “chín” ở chuột tái tổ hợp (các gốc 109-266 của SEQ ID NO: 215 (10 ng/ml; R&D Systems). Sau khoảng 24 giờ, dịch nổi được thu hoạch và làm đông cho đến khi phân tích sử dụng kit Millipore Mouse 22-plex đối với Luminex™, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thử nghiệm tế bào nội mạc ở khỉ Cyno

Các tế bào nội mạc động mạch chủ của khỉ Cynomolgus được nuôi cấy trong môi trường sinh trưởng tế bào nội mạc 2 EGM®-2 (Lonza) được đặt trong tấm nuôi cấy mô 96 giếng ở 10,000 hoặc 20,000 tế bào/ giếng. 50 μ l kháng thể kháng ST2L được bổ sung vào các tế bào bắt đầu từ 100 μ g/ml với các lần pha loãng gấp 4 hoặc 5 lần sau đó và ủ ở 37°C trong 1 giờ trước khi thêm IL-33 “chín” ở khỉ Cyno tái tổ hợp (SEQ ID NO: 4). Tiếp đó, 50 microlit IL-33 ở khỉ cynomolgus 20 ng/ml được bổ sung vào các tế bào và được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Để đánh giá sự đáp ứng của xytokin bị kích thích do IL-33, dịch nổi được thu hoạch và đánh giá các mức xytokin bằng kit IL-8 cho linh trưởng không phải là người với Luminex™ (Millipore) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thử nghiệm rửa màng bụng của chuột

Rửa màng bụng của 6 Chuột Balb/c tổng 3 ml PBS để thu gom các tế bào màng bụng. Phần lớn các tế bào này được phát hiện là tế bào bạch huyết và đại thực bào, như được xác định bằng sự biểu hiện B220 và F4/80 (Các phân tích FACS). Khoảng 1% là các tế bào mast cKit⁺ (CD117⁺). Các tế bào được ly tâm và tái tạo huyền phù các viên thành 1×10^6 tế bào/ml trong môi trường Alpha MEM + 10% FBS + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen). Các tế bào được đặt ở 200 µl mỗi giếng trong tấm 96 giếng và được giữ trong khoảng 2 giờ ở 37°C. Bổ sung kháng ST2L mab vào các tế bào trong khoảng 30 phút trước khi thêm 10 ng/ml IL-33 “chín” ở chuột (R&D Systems; các gốc 109-266 của SEQ ID NO: 215). Dịch nổi được thu gom trong khoảng 24 giờ sau khi bổ sung IL-33, bảo quản ở -20°C cho đến khi phân tích, và được phân tích sử dụng kit Millipore Mouse 22-plex đối với LuminexTM theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sự tạo ra các kháng thể của kháng ST2L ở chuột của chuột

Cố định chuột trong màng bụng bằng ST2-Fc ở chuột (R&D Systems (Ser27-Ser342 của SEQ ID NO: 5) và đánh giá hàm lượng IgG cụ thể. Mỗi lần thu được hàm lượng đủ, các tế bào lách được phân lập và được dung hợp với các tế bào FO. Các tế bào lai thu được được đặt trong tấm 96 giếng hoặc methylxenluloza và nuôi cấy trong 10 ngày. Các dòng đặc hiệu với kháng nguyên được nhận dạng bằng ELISA chụp chuẩn để gắn kết với mST2-Fc và sàng lọc chéo chống lại riêng protein Fc. Các tế bào lai đặc hiệu với ST2 ở chuột còn được thử để ức chế sự gắn kết của IL-33 với ST2 trong ELISA và ức chế sự tăng sinh tế bào Th2 ở chuột D10.G4,1 bị kích thích do IL-33. Các tế bào lai thể hiện sự trung hòa ở cả sự gắn kết thụ thể -phối tử và sự tăng sinh tế bào thì các thử nghiệm được chọn theo dòng bằng cách giới hạn sự pha loãng. Các vùng V của tế bào lai được giải trình tự và được tách dòng thành nên IgG1 ở chuột. Tính đặc hiệu của miền ST2L-ECD được đánh giá bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch chuẩn với sự phát hiện hóa huỳnh quang điện tử bằng cách sử dụng cấu trúc biến đổi miền ở chuột-người khác nhau.

Kháng thể được tiết bởi tế bào lai C1999 được tách dòng thành nên IgG1 ở chuột và có tên là CNTO3914. Trình tự của các vùng biến đổi CNTO3914 và CDR được

thể hiện trong bảng 2. CNTO3914 không phản ứng chéo với ST2L ở người và gắn kết với miền I của ST2L-ECD ở chuột.

Bảng 2.

Tên mAb	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
	Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:
C1999/ CNTO3914	HYGMA	13	SIITDGTSTYYRDSVKG	14	QSDDYFDY	15

Tên mAb	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
	Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:
C1999/ CNTO3914	KSSQSLEYS DGDSYLE	16	GVS NRFS	17	FQATHDPFT	18

Tên mAb	Trình tự VH	SEQ ID NO:
C1999/ CNTO3914	EVQLVESGGGLQPG RSLKLSCTASGFIFSHYGM AWWVRQAPTKGLEWV SSIITDGTSTYYRDSVKGRFTISRDN AKNTQYLQMDSL RSEDTATYYCAR QSDDYFDYWGQGVMVTVSS	19
	Trình tự VL	SEQ ID NO:
	DVVLTPVSLSVTLGDQASISCKSSQSLEYS DGDSYLEWYLQKPGQSP QLLIYGVS NRFS GVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPDLGVVYCFQATHDP FTFGSGTKLEIK	20

Ví dụ 2. Sự tạo ra các kháng thể ở người kháng ST2L của chuột

Hai sự miễn dịch hóa khác nhau được tiến hành tạo ra của các kháng mAb ST2 ở người của chuột.

BALB/c được miễn dịch hóa trong màng bụng với ST2-Fc có thể hòa tan (R&D Systems, SEQ ID NO: 157) và được đánh giá hàm lượng IgG cụ thể. Khi thu được hàm lượng đủ, phân lập các tế bào lách và được dung hợp với các tế bào FO. Các tế bào lai thu được được đặt trong tấm 96 giếng và nuôi cấy trong 10 ngày. Các dòng đặc hiệu với kháng nguyên được nhận dạng bằng ELISA chụp chuẩn để gắn kết với huST2L-ECD được gắn His₆ ở đầu C và độ phản ứng chéo với ST2L ở khỉ Cyno-ECD được gắn His₆. Các tế bào lai đặc hiệu với ST2L ở người phản ứng chéo ST2L ở khỉ Cyno còn được thử nghiệm để ức chế IL-33 gắn kết với huST2L trong thử nghiệm ELISA và để ức chế sự hoạt hoá của NF-κB trong thử nghiệm gen báo cáo. Các dòng ức chế trong thử nghiệm gen báo cáo

hoặc trong cả hai thử nghiệm ELISA và gen báo cáo được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp.

Các kháng thể từ các tế bào lai C2494, C2519A và C2521A được chọn cho các phân tích tiếp theo. C2519A và C2521A gắn kết với ST2L ở người tại miền III, và C2494 gắn kết với ST2L ở người tại miền I. Kháng thể C2494 được tách dòng trong nền IgG2 ở người, và kháng thể có đầy đủ chiều dài được đặt tên là STLM62.

Các mAb kháng ST2L ở người được tạo ra ở Genovac GmbH bằng công nghệ miễn dịch ADN độc quyền bằng cách sử dụng ST2L có cấu trúc chiều dài đầy đủ và đẩy nhanh các tế bào được chuyển nhiễm để biểu hiện ST2L-ECD ở người. Các tế bào lai được sàng lọc để gắn kết với ST2L -ECD ở người bằng dòng tế bào chảy. Các dòng có sự gắn kết trong thử nghiệm đã được xác nhận gắn kết hST2L-ECD và còn đặc trưng gắn kết với ST2L ở khỉ Cyno-ECD bằng ELISA chụp chuẩn. Các dòng lựa chọn đặc trưng ở chỗ thử nghiệm ELISA và gen báo cáo ức chế gắn kết thụ thể -phôi tử. Các dòng ức chế trong thử nghiệm gen báo cáo hoặc ở cả thử nghiệm ELISA và gen báo cáo được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Kháng thể từ tế bào lai Genovac C2244 được chọn cho các phân tích tiếp theo và được tách dòng thành nền IgG2 ở người. Kháng thể có chiều dài đầy đủ được đặt tên là STLM15. STLM15 gắn kết với ST2L ở người tại miền I

Trình tự của miền VH, VL và CDR của các kháng thể kháng chuột ở người thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3.

Miền mAb	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
	Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:
C2519A	DYNMN	21	NINPYYGSTTYNQKFKG	25	EGDTYLAWFAY	29
C2521A	TYWMN	22	QIFPASGSTYYNEMFKD	26	SENIYYINFQYYFAY	30
C2244/ STLM15	SDYAWN	23	FISYSGDTSFNPSLKS	27	YDGYSEFDY	31
C2494/ STLM62	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAPKFQD	28	GDFYAMDY	32

Miền mAb	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
	Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:
C2519A	RSSQSIVYSNGNTYLE	33	KVSNRFS	37	FQGSHPPT	41
C2521A	RASQNIQTRMH	34	YASESIS	38	QQSNTWPFT	42
C2244/ STLM15	RASKSVSTSGSSYMF	35	LASNLES	39	QHSREIPYT	43
C2494/ STLM62	ITNTDIDDIH	36	EGNTRLP	40	LQSDNMLT	44

Miền mAb	Trình tự VH	SEQ ID NO:
C2519A	EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTDYNNMNWVKQSHGKSLEWIGNINPYYGSTTYNQKFKGKATLTVDKSSNTAYMHLNLSLTSEDSAVYYCAREGDTYLAWFAYWGQGLTVSA	45
C2521A	QIQLQQSGPELVKPGTSVKISCKASGYFTLYWMNWKQRPQGQLEWIGQIFPASGSTYYNEMFKDKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDVAVYFCARSENIYYINFQYYFAYWGQGLTLTVSS	46
C2244/ STLM15	EVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGFSITSDYAWNWIQFPGSKLEWMGFISYSGDTSFNPSLKSRIQVTRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASYDGYSEFDYWGQGLTLTVSS	47
C2494/ STLM62	EVQLQQSVAELVPGASVKLSCTASAFNIKDDYMHVWKQRPQGQLEWIGRIDPAIGNTEYAPKFQDKATMTADTSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCALGDFYAMDYWGQGSVTVSS	48

Miền mAb	Trình tự VL	SEQ ID NO:
C2519A	DVLMTQTPLSLPVSLGDAQSISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPPTFGGKLEIK	49
C2521A	ILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQNIQTRMHWYQQRTNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSEVEDIADYYCQSNTPFTFGSGTKLEIK	50
C2244/ STLM15	DIVLTQSPASLAISLGQRATISCRASKSVSTSGSSYMFVYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPRFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAAAYCQHSREIPYTFGGKLEIK	51
C2494/ STLM62	ETTVTQSPASLSVATGEKVTIRCITNTDIDDIHWYQQKPGEPKLLISEGNTLRPGVPSRFSSSGYGTDFVFTIENTLSEDAVYYCQSDNMLTFGAGTKLEIK	52

Ví dụ 3. Sự tạo ra các kháng thể ST2L ở người đầy đủ

Các Fab gắn kết với ST2L ở người được chọn từ các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể novo pIX như được mô tả ở Shi các đồng tác giả, J Mol Biol 397:385-96, 2010; Công bố Patent quốc tế số WO2009/085462; Công bố Patent Mỹ số US2010/0021477). Tóm lại, các thư viện được tạo ra bằng cách đa nguyên hóa các khung ở người trong đó gen dòng mầm VH IGHV1-69*01, IGHV3-23*01, và IGHV5-51*01 được tái tổ hợp với minigen IGHJ-4 ở người thông qua mạch vòng H3, và gen VLkappa dòng mầm ở người O12 (IGKV1-39*01), L6 (IGKV3-11*01), A27 (IGKV3-20*01), và B3 (IGKV4-1*01) được tái tổ hợp với minigen IGKJ-1 để lắp ráp miền VH và VL hoàn thiện. Các vị trí trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nhẹ quanh mạch vòng H1, H2, L1, L2 và L3 tương ứng với các vị trí được nhận dạng là tiếp xúc thường xuyên với protein và các kháng nguyên peptit được chọn để đa dạng hóa. Sự đa dạng trình tự ở các vị trí được chọn bị giới hạn với các gốc xảy ra ở vị trí trong các họ gen dòng mầm IGHV hoặc IGLV của các gen IGHV hoặc IGLV tương ứng. Sự đa dạng tại mạch vòng H3 được tạo ra bằng cách tận dụng các mạch vòng có kích thước từ ngắn đến trung bình có chiều dài từ 7 đến 14 axit amin. Sự phân phối axit amin tại H3 được thiết kế để mô phỏng sự biến đổi được quan sát của axit amin ở các kháng thể ở người. Thiết kế thư viện được thể hiện chi tiết trong Shi và các đồng tác giả, J Mol Biol 397:385-96, 2010. Các khung được dùng để tạo các thư viện được đặt tên gen hoặc nguồn gốc dòng mầm VH và VL ở người của chúng. Ba thư viện chuỗi nặng được kết hợp với bốn thư viện chuỗi nhẹ dòng mầm hoặc chuỗi nhẹ dòng mầm các để tạo ra 24 tổ hợp VH:VL đơn nhất để sàng lọc. Tất cả 24 tổ hợp thư viện VH:VL được dùng trong các thử nghiệm thực khuẩn thể ghép nhãn chống lại huST2L-ECD-Fc.

Các thư viện được mở rộng bằng cách sử dụng dung hợp Fc của huST2L-ECD (các gốc 19-328 của SEQ ID NO: 1). Ghép nhãn được tiến hành trong 2 định dạng khác nhau, kháng nguyên (Ag) trong dung dịch và Ag được biểu hiện. Với Ag trong dung dịch, chặn các hạt từ được phủ streptavidin trong PBS với 3% sữa khô không chất béo. Dung hợp Fc ở người kháng nguyên huST2L-ECD được biotinylat hóa (Bt) (Bt-huST2L-ECD-Fc) với nồng độ cao 10x của protein Fc của người làm chất cạnh tranh được trộn với các thư viện thực khuẩn thể Fab-pIX. Thực khuẩn thể Fab-pIX gắn kết với Bt-huST2L-ECD-Fc được chụp trên các hạt

từ được phủ streptavidin (SA) được chặn. Tiến hành các lựa chọn thực khuẩn thể trong ba vòng mà nồng độ huST2L-ECD-Fc biến đổi từ 100nM, 10nM, 10nM lần lượt từ các vòng 1 đến 3. Với biểu hiện Ag, Bt-huST2L-ECD-Fc được phủ trên các hạt từ được phủ SA. Các thư viện thực khuẩn thể Fab-pIX cùng với 10x protein Fc ở người dư được bổ sung đồng thời vào các hạt từ SA biểu hiện Bt-huST2L-ECD-Fc. Nồng độ Bt-Ag nồng độ được sử dụng là 100nM, 10nM, 10nM lần lượt với các vòng từ 1 đến 3. Tiến hành sàng lọc với cả hai dạng ghép nối bằng ELISA để gắn kết Fab với protein huST2L-ECD-Fc protein. Tổng 79 Fabs gắn kết với hST2L-Fc được phân lập từ các lựa chọn này. Fab HuT2SU-39 như được xác định bằng cách sắp xếp ELISA để có hoạt tính gắn kết tổng thể tốt nhất.

Thử nghiệm ức chế sự gắn kết IL-33 dựa trên ELISA được tiến hành trên 79 Fab. Tổng 32 Fab đã thể hiện sự ức chế của IL-33 gắn kết với huST2L-ECD-Fc. 46 Fab được chọn với ái lực chín từ chiến dịch pIX *de novo*.

Ví dụ 4. Chín ái lực của các kháng thể ST2L ở người đầy đủ

Lựa chọn các kháng thể được chín ái lực bằng cách sử dụng quy trình chín “theo dòng” được mô tả trong Shi và các đồng tác giả, J Mol Biol 397:385-96, 2010 và WO09085462A1. Trong công nghệ này, các vùng VH của các dòng Fab thu được trong lựa chọn thứ nhất được kết hợp với các thư viện của các khung VL tương ứng. Tất cả các gen VH từ 46 Fab được nhận dạng trong Ví dụ 3 đã được tách dòng thành các thư viện VL chín thích hợp làm các nhóm theo họ gen VL ban đầu của chúng. Các thư viện khung VL được sử dụng và các sơ đồ đa dạng hóa của chúng được thể hiện trong bảng 4. Các khung VL ở người là như sau: IGKV1-39*01 (O12), IGKV3-11 (L6), IGKV3-20 (A27), IGKV4-1*01 (B3) và được mô tả cho ví dụ trong Công bố Patent Mỹ số US2012/0108795. Với ái lực chín ghép nối, các thư viện thực khuẩn thể được bổ sung vào Bt-huST2-ECD-Fc trước tiến. Sau khi ủ, bổ sung phức hợp thực khuẩn thể thư viện /Bt-hST2L-ECD-Fc chín vào các hạt từ được phủ SA. Nồng độ Bt-huST2-Fc biến đổi tương ứng từ R1 đến R3 ở 10nM, 1nM, và 0,1 nM. Tiến hành rửa lần cuối của vòng 3 qua ở nhiệt độ trong phòng với sự có mặt của 10nM huST2L-ECD-Fc không được đánh dấu để cải thiện ái lực hơn.

Bảng 4.

vòng	Vị trí (Kabat)	Thiết kế đa dạng hóa thư viện VL đối với các giá đỡ khác nhau			
		A27	B3	L6	O12
L1	30	SRNTD	RNDGHSY	SRNAD	SRNAD
	30a	SNR	RNDGHWY	-	
	30e		RNDGHSY	-	
	31	SNRADH	RNDGHWY	NSKD	SNKDG
	32	YFHQSEK	YNWR	YWDFHSAN	YHNDWFSAV
L2	50	ADGS	YWNK	ADKGYFTN	FYTNKADG
L3	91	YSHA	SYWH	RYSGF	SAYHPD
	92	YNDSHIFKG	SYGN	RHNSL	FIYHNDKGRE
	93	SNTDGHR	STER	NDKR	STHNDRG
	94	TYLVFAS	WYSH	WA	TYLVFSRGPI
	96	WYFLIR	YRWH	WYFLIR	LWRFYIN

Tổng 161 trình tự các Fab đơn nhất thu được ghép nhẵn chín. Các Fab thể hiện sự gắn kết cao nhất với huST2L-ECD được chuyển đổi thành IgG với đặc trưng khác.

Các MAb ST2M48, ST2M49, ST2M50 và ST2M51 được chọn với đặc trưng khác và VH, VL và Trình tự CDR của chúng được thể hiện trong bảng 5. Các mAb ST2M48, ST2M49, ST2M50 và ST2M51 gắn kết với ST2L ở người tại miền III, và phản ứng chéo với ST2L ở chuột.

Bảng 5.

mAb ID	HC ID	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:
ST2M48	STLH125	TSYWIG	53	GIYPGDSYTRYSPSFQGG	55	LSGRFDY	57
ST2M49	STLH149	TSYWIG	53	GIYPGDSYTRYSPSFQGG	55	IGGMFDY	58
ST2M50	STLH125	TSYWIG	53	GIYPGDSYTRYSPSFQGG	55	LSGRFDY	57
ST2M51	STLH130	SSYAIS	54	GIPIFGTANYAQKFQGG	56	DTPQLDY	59

mAb ID	LC ID	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:
ST2M48	STLL232	RASQSVRDALA	60	FASN RAT	64	QQFNTWPIT	67
ST2M49	STLL216	RASQSVANALA	61	KASN RAT	65	QQYGGWPIT	68
ST2M50	STLL228	RASQSVSNALA	62	FASN RAT	64	QQFFNWPIT	69
ST2M51	TC1L3	RASQSISSYLN	63	YASSLQS	66	QQSYSTPLT	70

Tên mAb	Trình tự VH	SEQ ID NO:
ST2M48	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWM GIYPGDSYTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLS GRFDYWGQGTLLTVSS	71
ST2M49	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWM GIYPGDSYTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARIG GMFDYWGQGTLLTVSS	72
ST2M50	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR YNFFFDYWGQGTLLTVSS	71
ST2M51	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR DTPQLDYWGQGTLLTVSS	73

Tên mAb	Trình tự VL	SEQ ID NO:
ST2M48	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRDALAWYQQKPGQAPRLIYFA SNRATGIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQFNTWPITFGQGT KVEIK	74
ST2M49	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVANALAWYQQKPGQAPRLIYKA SNRATGIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQYGGWPITFGQGT KVEIK	75
ST2M50	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDWLAWYQQKPGQAPRLIYK ASN RATGIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQYNRAPWTFGQ GTKVEIK	76
ST2M51	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYA SSLQSGVPSRFSGSGGTDFLTITSSLPEDFATYYCQSYSTPLTFTFGQGTK VEIK	77

Ví dụ 5. Đặc trưng của các kháng thể kháng ST2L.

Các kháng thể thu được từ các chiến dịch khác nhau như được mô tả nêu trên còn được đặc trưng cho khả năng của chúng để chặn sự tương tác IL-33/ST2L, cho sự ức chế của chúng của tín hiệu bị kích thích do IL-33 như được đo bằng thử nghiệm gen báo cáo NF- κ B, khả năng của các kháng thể để đáp ứng ức chế tế bào mast, cho ái lực của chúng chống lại ST2L ở người và khỉ cyno, và độ phản ứng chéo với ST2L ở chuột. Tiến hành đánh dấu epitop bằng cách sử dụng cấu trúc thể khám biến đổi miền ST2L ở người/chuột như được mô tả trong các vật liệu và phương pháp. Các kết quả của các thử nghiệm được thể hiện trong

các bảng 6, 7 và 8. Trong các bảng 7 và 8, “+” cho thấy rằng kháng thể chặn sự tương tác IL-33/ST2L, và “-” cho thấy nó không chặn sự tương tác IL-33/ST2L. Các thử nghiệm có CNTO3914 được tiến hành bằng cách sử dụng các tế bào của chuột và các chất phản ứng do thiếu độ phản ứng chéo với người. Các tế bào của người và các chất phản ứng của người được sử dụng trong các thử nghiệm với tất cả các kháng thể khác.

Các kháng thể đặc trưng được nhóm thành các kháng thể chặn sự tương tác IL-33/ST2L (mAb STLM15, STLM62 và CNTO3914) và các kháng thể đó không chặn sự tương tác IL-33/ST2L (mAbs C2519, C2521, ST2M48, ST2M49, ST2M50 và ST2M51). Các kháng thể chặn sự tương tác IL-33/ST2L gắn kết với miền I của ST2L, trong khi các kháng thể không chặn gắn kết với miền I của ST2LII. Các kháng thể được thử nghiệm ức chế tín hiệu xuôi dòng ST2L như được đánh giá bởi thử nghiệm gen báo cáo NF- κ B và xytokin bị kích thích do IL-33 giải phóng theo dòng tế bào đã nhộm máu ở người KU812, hoặc trong trường hợp của CNTO3914, được đánh giá bằng sự tăng sinh tế bào Th2 ở chuột. Các kháng thể gắn kết với miền I của ST2L đã ức chế ở mức cao tế bào mast đáp ứng ở người như được đánh giá bằng sự bài tiết xytokin và chemokin khi so với các kháng thể kháng ST2L gắn kết với miền I của ST2LII. CNTO3914, gắn kết với miền I của ST2L ở chuột và không phản ứng chéo với người cũng có thể ức chế tế bào mast đáp ứng ở chuột bị kích thích do IL-33.

Bảng 6.

mAb	Hybridoma tương ứng	Ái lực đối với ST2L ở người			Ái lực đối với ST2L ở người ở cyno		
		k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (pM)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (pM)
STLM15	C2244	1.02E+06	4.25E-05	42	4.81E+06	5.30E-05	11
STLM62	C2494	4.26E+06	1.19E-04	28	4.51E+07	5.39E-04	12
na	C2519	4.83E+05	8.70E-05	180	7.14E+04	3.20E-03	44800
na	C2521	6.18E+05	4.90E-05	79	4.47E+05	1.66E-03	3710
ST2M48	na	1.32E+06	7.33E-05	56	1.03E+07	2.65E-03	257
ST2M49	na	1.59E+06	1.61E-04	101	4.66E+07	1.24E-02	266
ST2M50	na	1.15E+06	5.10E-05	45	2.01E+07	2.49E-03	124
ST2M51	na	1.29E+06	4.87E-05	38	4.42E+07	3.36E-03	76

Bảng 7.

mAb	Hybridoma tương ứng	RLB*	RG ^a #	Giải phóng xytokin basophil	Giải phóng xytokin tế bào Mast	ST2L epitop
STLM15	C2244	+	+	+	+	hD1
STLM62	C2494	+	+	+	+	hD1
	C2519	-	+	+	-	hD3
	C2521	-	+	+	-	hD3
ST2M48	NA	-	+	nt	-	h/mD3
ST2M49	NA	-	+	nt	-	h/mD3
ST2M50	NA	-	+	nt	-	h/mD3
ST2M51	NA	-	+	nt	-	h/mD3

* sự ức chế gắn kết phối tử với thụ thể

thử nghiệm gen thông tin

hD1= miễn ST2L D1 ở người

mD1= miễn ST2L D1 ở chuột

hD3= miễn ST2L D1 ở người

h/mD3= miễn ST2L D1 và D3 ở người và ở chuột

nt= không thử nghiệm

Bảng 8.

mAb	Hybridoma tương ứng	RLB*	RG ^a #	Sự phát triển tế bào T	Rửa tế bào trong màng bụng	Giải phóng xytokin tế bào Mast **	ST2L epito
CNTO3914	C1999	+	+	+	+	+	mD1

*Thụ thể ức chế gắn kết phối tử

#Thử nghiệm gen thông tin

** thu được từ tủy xương

Ví dụ 7. Kháng thể CNTO3914 gắn kết miễn I của ST2L ức chế siêu đáp ứng qua đường hô hấp bị kích thích do IL-33 trong mũi (AHR), viêm đường hô hấp và các đáp ứng tế bào mast ở chuột.

Bốn liều dùng trong mũi hàng ngày liên tiếp của IL-33 “chín” 2 µg/chuột (R&D Systems) (các gốc 109-266 của SEQ ID NO:215) được dùng cho Chuột cái Balb/c. Kháng thể kháng chuột ST2L CNTO3914 được tạo liều phòng bệnh đồng thời ở 20 mg/kg (hoặc 2 mg/kg hoặc 0,2 mg/kg) 24 giờ trước khi dùng trong mũi IL-33 thứ nhất. Các chuột đối chứng đã nhận isotyp đối chứng CNTO5516 hoặc PBS, 24 giờ trước dùng trong mũi IL-33 thứ nhất. Siêu đáp ứng qua đường hô hấp (AHR) để tăng các liều metacolin được đo bằng cách sử dụng các vận động lực với hệ Flexivent (Scireq, Montreal, Quebec, Canada). Để đo siêu đáp ứng qua

đường hô hấp (AHR), chuột được gây mê với 100 mg/kg pentobarbital và 13 mg/kg phenytoin và mở khí quản trước khi kết nối với FlexiVent. Các con chuột được thở bằng nước muối để đọc đường chuẩn và tiếp đó là hai liều (10 và 20 mg/mL) metacolin. Với nước muối và mỗi liều metacolin, các giá trị điện trở (R) thu được trong khoảng 2 phút bằng cách sử dụng nhiều “chụp nhanh”. Các điện trở đỉnh được tính bằng cách chỉ sử dụng các giá trị đó có COD (hệ số xác định) nêu trên là 0,9.

Nhóm phân nhánh của chuột được điều trị và được phân tích với các đáp ứng tế bào trong phổi. Hai mươi giờ sau khi dung isotyp mIL-33 cuối cùng hoặc PBS, các con chuột bị chết do quá liều của Sleepaway® I.P. Rửa các phổi của chuột bằng 0,7 ml PBS lạnh với 0,1% BSA. các dịch túi phổi (BAL) thu được được ly tâm ở 1200 vòng/phút trong 10 phút và bảo quản dịch nổi không tế bào ở -80°C cho đến khi phân tích xytokin/chemokin. Các mẫu BAL được sử dụng với tổng lần đếm sử dụng máy đo tế bào máu. Với các BAL khác nhau đếm ~200 tế bào từ các vết lắng tế bào, sau đó nhuộm giemsa thủ công dưới kính hiển vi sáng.

Dịch nổi loại bỏ tế bào được thu gom và được bảo quản ở -80°C cho đến khi sử dụng cho các phân tích protein Luminex. Các mô phổi được loại bỏ, và tiếp đó truyền dịch thông qua tâm thất phải bằng cách sử dụng sử dụng 5ml PBS khử trùng lạnh cho đến khi truyền dịch đủ. Tiếp đó, đặt các thùy phổi trong ống Fast Prep® chứa 1ml của PBS + chất ức chế Proteaza và được làm đông và bảo quản ở -80°C với lưu giữ xytokin/chemokin. Thử nghiệm xytokin/chemokin được tiến hành theo quy trình của nhà sản xuất với Murin Millipore 22-plex. Tế bào mast Proteaza ở chuột-1 (mMCP-1) trong dịch lỏng BAL được phân tích bằng ELISA (Moredun Scientific).

Siêu đáp ứng qua đường hô hấp

CNTO3914 đã ức chế đáng kể siêu đáp ứng qua đường hô hấp trong mô hình viêm phổi bị kích thích do IL-33 được dùng trong mũi (Fig 1). CNTO3914 được tạo liều đồng thời 24 giờ trước bốn lần dùng trong mũi liên tiếp hàng ngày của 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ mIL-33. Sự đề kháng qua đường hô hấp đỉnh như được xác định bởi Flexivent đã làm giảm đáng kể với liều CNTO3914 ở 20mg/kg. Mỗi thanh thể hiện trung bình $\pm$ SEM của ba (CNTO5516, kháng thể isotyp đối chứng) đến sáu con chuột/nhóm. Các kết quả đã được lặp lại trong hai nghiên cứu phân nhánh. Ý

ngĩa được được xác định bằng cách sử dụng Two-Way ANOVA với thử nghiệm sau Bonferroni, CNTO3914/IL-33 $**p<0,05$ so với CNTO5516/IL-33; và $***p<0,001$, so với PBS với Nhóm điều trị IL-33.

Viêm đường hô hấp

CNTO3914 đã ức chế đáng kể sự tuyển chọn tế bào rửa tế bào túi phổi (BAL) trong mô hình được sử dụng (Fig 2). CNTO3914 đã được tạo liều đồng thời 24 giờ trước bốn lần dùng trong mũi liên tiếp hàng ngày của 2 mg/mouse mIL-33. Các tế bào bạch cầu BAL đã tăng đáng kể với việc dùng IL-33 và ức chế đáng kể bằng CNTO3914 với 20mg/kg. Mỗi thanh thể hiện trung bình $\pm$ SEM của ba (CNTO5516, kháng thể isotyp đối chứng) đến sau con chuột/nhóm. Các kết quả đã được lặp lại trong hai nghiên cứu phân nhánh. Ý nghĩa được xác định bằng cách sử dụng Two-Way ANOVA với thử nghiệm sau, $***p<0,001$.

Đáp ứng tế bào mast *in vivo*

Các tế bào mast bảo quản Proteaza bao gồm tryptaza và chymaza trong các hạt của chúng, được giải phóng nhanh dựa trên sự hoạt hóa tế bào mast. Tế bào mast Proteaza ở chuột 1 (mMCP-1) là $\alpha\beta$ chymaza được giải phóng theo các tế bào mast được hoạt hóa và đã biết là quan trọng để kiểm soát các lây nhiễm giun ký sinh (Knight và các đồng tác giả, J Exp Med 192:1849-56, 2000; Huntley và các đồng tác giả, Parasite Immunol 12:85-95, 1990). Việc đo mMCP-1 có thể được sử dụng làm chỉ thị phân tử của sự hoạt hóa tế bào mast, và đã thể hiện là bị kích thích do trong mô hình phụ thuộc vào tế bào mast T của viêm đường hô hấp: ve bét bụi nhà (Yu và Chen, J Immunol 171:3808-15, 2003). mMCP-1 như được xác định bằng ELISA (Moredun Scientific) đã được tăng đáng kể trong dịch lỏng BAL từ chuột được dùng IL-33, và đã bị ức chế phụ thuộc vào liều bằng CNTO3914 (Fig 3). Ý nghĩa được xác định bằng cách sử dụng One-Way ANOVA với thử nghiệm sau Tukey, $**p<0,01$, $***p<0,001$, so với Điều trị IL-33.

Ví dụ 8. Các kháng thể gắn kết kháng miễn I của ST2L ức chế đáp ứng tế bào mast *in vitro*

Đáp ứng tế bào mast được đánh giá bằng cách giải phóng chemokin và xytokin bởi các tế bào mast của chuột và người cũng như prostaglandin D₂ ở các tế bào mast của người.

Kháng thể gắn kết kháng miên I của ST2L CNTO3914 đã ức chế sự giải phóng xytokin bị kích thích IL-33 bao gồm GM-CSF (Fig 4A), IL-5 (Fig 4B), và TNF α (Fig 4C) bởi các tế bào mast thu được tủy sống ở chuột.

mab C2494 gắn kết kháng miên I của ST2L ở người (STLM62) đã ức chế sự giải phóng PGD₂ bị kích thích do IL-33 theo các tế bào mast thu được máu cuống rốn ở người bị kích thích do 3 ng/ml IL-33 ở nồng độ kháng thể 2, 10 và 50 μ g/ml (Fig 5).

Các kháng thể gắn kết kháng miên I của ST2L C2494 và C2244 đã ức chế sự giải phóng bị kích thích do IL-33, IL-5, IL-8, IL-13 và IL-10 GM-CSF theo các tế bào mast thu được máu cuống rốn ở người ở nồng độ kháng thể 50 μ g/ml, 10 μ g/ml và 2 μ g/ml (Figs 6 và 8A-8E). Mức độ ức chế phụ thuộc vào xytokin/chemokin được đo, kháng thể và nồng độ kháng thể được thử nghiệm, và môi trường được dùng. Phần trăm ức chế trung bình (%) được tính là nằm trong khoảng từ 50,6 đến 100% trong tất cả các thử nghiệm được tiến hành ở nồng độ kháng thể 2 μ g/ml, và nằm trong khoảng từ 62 đến 100% ở nồng độ kháng thể 50 μ g/ml (Fig 9).

Các kháng thể gắn kết kháng miên I của ST2LII C2521, C2519, ST2M48, ST2M49, ST2M50, và ST2M51 đã thể hiện sự ức chế kiểu nhất hoặc không sự ức chế lên, hoặc kích thích sự giải phóng bị kích thích do IL-33 theo các tế bào mast (Fig. 7A-7E và 8A-8E) ở nồng độ kháng thể 50 μ g/ml và 10 μ g/ml. Mức độ sự ức chế phụ thuộc vào xytokin/chemokin được đo, kháng thể được thử nghiệm, và môi trường được dùng. Phần trăm ức chế trung bình (%) được tính là nằm trong khoảng từ -594,4 đến 31,9% trong tất cả các thử nghiệm được tiến hành ở nồng độ kháng thể 2 μ g/ml, và nằm trong khoảng từ -481,5 – 36% ở nồng độ kháng thể 50 μ g/ml (Fig 9). Theo một số các thử nghiệm, kháng thể ST2M50 đã ức chế GM-CSF, IL-5, IL-10 và bài tiết IL-13 ở nồng độ kháng thể 10 μ g/ml (Figs 8A-8E).

Sự ức chế trung bình % được tính bằng cách sử dụng công thức sau: (1- (nồng độ xytokin được giải phóng với sự có mặt của mAb)/ (nồng độ của cùng xytokin được giải phóng trong đáp ứng với IL-33 với sự có mặt của mAb)) x 100. Nồng độ xytokin là pg/ml. Theo một số trường hợp, % ức chế là giá trị âm, chỉ ra rằng sự giải phóng xytokin với sự có mặt của mAb thực sự cao hơn sự giải phóng với sự có mặt của mAb. Các biến đổi nhẹ về khả năng các mAb có thể xảy ra phụ

thuộc vào nồng độ IL-33 được sử dụng được kích thích do sự giải phóng xytokin trong các tế bào mast. Tương tự, có thể có các biến đổi nhẹ về hoạt tính của các mAb phụ thuộc vào thử nghiệm môi trường được sử dụng (StemPro-34 so với RPMI / 10% FCS). Tất cả các kháng thể gắn kết miền I của ST2L được thử nghiệm đã ức chế sự giải phóng xytokin và chemokin đo được ít nhất là 50% như được đo bằng % ức chế trung bình ở nồng độ 2 µg/ml, 10 µg/ml hoặc 50 µg/ml.

Ví dụ 9. Các kháng thể gắn kết miền I của ST2L ức chế tái mô hình đường hô hấp bị kích thích do IL-33 trong mũi.

Các chuột C57BL/6 được tạo liệu trong mũi với 1 µg/chuột IL-33 “chín” (hoặc PBS) (các gốc 109-266 của SEQ ID NO: 215) vào các ngày D1, D3, D5, D7, và D9 và các phổi được phân tích vào ngày thứ 10 hoặc ngày thứ 20. Kháng thể kháng chuột ST2L CNTO3914 hoặc isotyp đối chứng (CNTO5516) được tạo liệu đồng thời ở 2mg/kg 6 giờ trước khi dung trong mũi IL-33 thứ nhất. Các chuột đối chứng đã nhận được isotyp đối chứng CNTO5516 hoặc PBS, 6 giờ trước khi dùng trong mũi IL-33 thứ nhất. Các phổi bơm phồng được cố định trong 10% formalin đệm nghiền cứu mô; các mẫu nhộm được sử dụng cho các phân tích bao gồm H&E, Masson Trichrome và PAS.

Sự điều hòa bị kích thích do điều trị IL-33 với sự phình to và tăng sản biểu mô phổi được đánh dấu có tăng sản tế bào biểu mô và dịch rỉ quanh phổi được trộn chủ yếu với tế bào ưa eozin. Sự phình to biểu mô và tăng sản không được chứng minh trong các động vật nhận CNTO3914. Các thuốc nhuộm Masson Trichrome là để xác định lượng collagen có mặt; việc nhuộm này bộc lộ các sự phình các tế bào biểu mô trong các động vật được điều trị bằng IL-33. Trong các động vật được điều trị bằng CNTO3914 rỉ trong các vùng quanh phổi và túi phổi là không có.

Ví dụ 10. Sự tạo ra các kháng thể ST2L ở người đầy đủ

Các Fab bổ sung gắn kết với ST2L ở người được chọn từ *các thư viện biểu hiện thị thực khuẩn thể novo pLX* chủ yếu như được mô tả trong Ví dụ 3 ngoại trừ các thư viện được mở rộng sử dụng cấu trúc thể khảm HHM-ST2L (SEQ ID NO: 6, Bảng 1) với kháng nguyên được biotinylat hóa được chụp trên các hạt từ được phủ streptavidin. Thư viện thực khuẩn thể được chặn trong PBS-T với 3% sữa khô không chất béo. Protein cạnh tranh, thể khảm MHM-ST2L (SEQ ID NO: 7, Bảng

1) được bổ sung vào dung dịch chặn để chạy sự chọn lọc thực khuẩn thể về phía các Fab mà sẽ gắn kết đặc hiệu với trình tự axit amin miền I của ST2L ở người. Các chọn lọc thực khuẩn thể được tiến hành trong ba vòng, sau đó là sàng lọc bằng ELISA đối với Fab gắn kết với protein hST2L-Fc.

19 Fabs với gắn kết với hST2L-Fc được phân lập từ các chọn lọc này và còn được sàng lọc để gắn kết với cấu trúc thể khảm ST2L (Bảng 1) cũng như với Protein ST2L ở chuột và ST2L ở người để đánh dấu miền đặc hiệu, và đặc trưng cho khả năng của chúng để chặn sự tương tác IL-33/ ST2L. Các Fab ST2F1, ST2F4 và ST2F6 đã chặn sự tương tác IL-33/ST2L và gắn kết miền I của ST2L và di chuyển về phía ái lực chín.

Bảng 9.

Fab ID	VH ID	Framework	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
			Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:
ST2F6	ST2H41	VH3-23	SYAMS	78	AISGSGGSTYYADSVKG	81	DPWSTEGSFFVLDY	84
ST2F4	ST2H39	VH3-23	SYWMH	79	GISSGGGSTYYADSVKG	82	DGWGTVYFPFDY	85
ST2F1	ST2H35	VH5-51	SYWIG	80	IIYPGDS DTRYSPSFQG	83	DTADFRRWDFDY	86

Fab ID	VL ID	khung	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
			Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:
ST2F6	ST2L24	Vk-L6	RASQSVDDALA	87	DASNRAT	90	QQFYNWPLT	92
ST2F4	ST2L23	Vk-L6	RASQSVRDDLA	88	DASNRAT	90	QQYIHAPLT	93
ST2F1	ST2L20	Vk-B3	KSSQSVLYSSNNKNYLA	89	WASTRES	91	QSNTPYFT	94

Ví dụ 11. Chín ái lực của ST2L ở người gắn kết các Fab

ST2F1, ST2F4 và ST2F6 là ái lực chín bằng cách sử dụng quy trình chín “theo dòng” được mô tả trong Shi và *các đồng tác giả*, *J Mol Biol* 397:385-396, 2010 và Công bố Patent quốc tế số WO2009/085462 và Ví dụ 4. Các thư viện ái lực chín đã được tiến hành với ST2F1, ST2F4 và ST2F6 bằng cách lần lượt đa nguyên hóa các thư viện chuỗi nhẹ tương ứng, B3, L6 và L6, và kết hợp các thư viện với các vùng Fab VH. Sơ đồ đa dạng hóa với các gốc chuỗi nhẹ với ái lực chín L6 và các thư viện ái lực chín B3 được thể hiện trong bảng 10. Vị trí đánh số là theo Kabat. Với ái lực chín ghép nhẵn, huST2-ECD-Fc được biotinylat hóa được chụp trên các hạt từ phủ streptavidin (SA) ở nồng độ 10nM với vòng 1, 1nM với vòng 2, và 0,1 nM với vòng 3. Lần rửa cuối cùng của vòng 3 được tiến hành qua đêm ở nhiệt độ trong phòng với sự có mặt của 10nM huST2L-ECD-Fc không được đánh dấu.

Bảng 10.

Giá đỡ

Mạch	Vị trí	Scaffold	
		L6	B3
L1	30	SRNAD	RNDGHSY
	30a	-	RNDGHWY
	30e	-	RNDGHSY
	31	NSKD	RNDGHWY
	32	YWDFHSAN	YNWR
L2	50	ADKGYFTN	YWNK
L3	91	RYSGF	SYWH
	92	RHNSL	SYGN
	93	NDKR	STER
	94	WA	WYSH
	96	WYFLIR	YRWH

Các chọn lọc thư viện chuỗi nhẹ chín ST2F6 đạt được sự gắn kết cải thiện (ST2F14, ST2F17, ST2F31 và ST2F41) (Fig 10 và Fig 11). Các chọn lọc này được kiểm tra làm các Fab bằng cách sử dụng ProteOn và chứng minh được các cải thiện ái lực kiểu cách nhất từ 2nM đến 400pM.

Để nâng cao hơn ái lực của ST2F14, ST2F17, ST2F31 và ST2F41, chuỗi nặng phổ biến ST2H41 trong ST2F14, ST2F17, ST2F31 và ST2F41 được ngẫu nhiên hóa ở HCDR1 và HCDR2 Kabat các vị trí 31, 32, 33, 35, 50, 52, 53, 56 và 58 nhờ sử dụng sơ đồ đa dạng hóa được thể hiện trong bảng 11. Thư viện chuỗi nặng thu được được cặp với bốn chuỗi nhẹ được cải thiện ái lực ST2L32, ST2L35, ST2L49 và ST2L59, và thư viện này đã được mở rộng và được sàng lọc như được mô tả với các thư viện chuỗi nhẹ chín. Các Fab với gắn kết được cải thiện so với ST2F14 được phân lập và chuyển hóa thành IgG để đặc trưng hơn. Các kháng thể thu được (STLM103, STLM107, STLM108, STLM123, STLM124, STLM206, STLM207, STLM208, STLM209, STLM210, STLM211, STLM212, STLM213, STLM214, STLM215, STLM216, STLM217, STLM218, STLM219, STLM220, STLM221, STLM222) (Fig 10 và Fig 11) có các khung thu được từ VH3-23 hoặc V κ -L6. Tất cả các kháng thể gắn kết với miền I của ST2L và chặn sự tương tác IL-33/ST2L.

Bảng 11.

Vị trí	Axit amin
31	SDNTAY
32	SDAY
33	SDAY
35	SN
50	SDNTAY
52	SANTKDEGR
53	SANEY
56	SANTKDEGR
58	SDNTAY

Các biến đổi bổ sung được thiết kế và biểu hiện với STLM208 VH ST2L257 để thay thế motif DP tại lúc bắt đầu HCDR3. Trình tự của các biến đổi được thể hiện trong Fig 12.

Ví dụ 11. Điều hợp khung ở người (HFA) của C2494

Quy trình khung điều hợp được tiến hành như được mô tả chủ yếu trong Công bố Patent Mỹ số US2009/0118127 và Fransson và *các đồng tác giả*, J Mol Biol 398:214-231, 2010. Nói tóm lại, trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được so sánh với trình tự dòng mầm ở người (chỉ các alen “01” từ Oct 01, 2007) sử dụng tìm kiếm BLAST theo cơ sở dữ liệu IMGT (Kaas, *các đồng tác giả*, Nucl. Acids. Res. 32, D208-D210, 2004; Lefranc và *các đồng tác giả*, Nucl. Acid Res., 33, D593-D597, 2005). Từ tập hợp các gen dòng mầm ở người, các gen dư thừa (100% giống nhau ở mức axit amin) và cả gen đó có các gốc xystein không cặp đôi bị loại bỏ. Các gen dòng mầm ở người bất cặp gần nhất còn lại ở cả hai khung và các vùng CDR được chọn làm khung nhận ở người. Tổng 9 VL và 7 VH khung dòng mầm ở người được chọn dựa trên dựa trên toàn bộ sự đồng nhất trình tự và các chiều dài CDR cũng như sự tương đồng CDR. FR-4 được chọn dựa trên trình tự sự tương đồng của các gen dòng mầm IGHJ/IGJK, JK2 với các chuỗi VL và JH1 với các chuỗi VH (Kaas, *các đồng tác giả*, Nucl. Acid Res. 32, D208-D210, 2004; Lefranc M.-P và *các đồng tác giả*, Nucl. Acid Res., 33, D593-D597, 2005) với trình tự C2494). Tiếp đó, CDR của C2494 (đường gạch dưới trong Fig 14) được di chuyển vào khung nhận được chọn ở người để tạo ra các biến đổi HFA, ngoại trừ trong vùng tương ứng với CDR-H1 của V_H. Với vùng này, sự tổ hợp của CDR và HV, hoặc HCDR2 ngắn (còn được gọi là Kabat-7, xem Công bố Patent Mỹ số US2009/0118127) được di chuyển từ không là kháng thể ở người thành các

FR ở người do gốc HCDR2 được làm nổi bật bằng màu xám trong Fig 14 không được tìm thấy tiếp xúc với các phức kháng nguyên-kháng thể của các cấu trúc đã biết (Almagro, J Mol Recognit. 17, 132, 2004).

Trình tự protein chín của C2494 (VL: SEQ ID NO:52; VH: SEQ ID NO: 48) thể hiện Fig 14. Trong hình này, gốc CDR (Kabat) là đường gạch dưới, các mạch vòng Chothia HV là các CDR được chỉ định sau đây, và gốc được di chuyển vào khung ở người được chọn được chỉ định dưới HV (HFA). Gốc HCDR2 được làm nổi bật bằng màu xám không được di chuyển trong tất cả các biến đổi.

Mô hình đồng nhất ba chiều với mảnh Fv của C2494 được cấu trúc bằng cách sử dụng sử dụng kháng thể mô hình mô đun của MOE (CCG, Montreal). Mô hình này được dùng để đánh giá trách nhiệm phát triển gốc methionin và tryptophan được phơi nhiễm, N-glycosyl hóa tiềm năng và các motif khử amit. Trong LCDR3, có gốc Met (M94) được phơi nhiễm tiềm năng, dựa trên mô hình cấu trúc Fv. Để loại bỏ nó, sự biến đổi (STLL280, O12b) với đột biến M94L được tạo ra và đặc trưng. Với chuỗi nặng, gốc R trong motif CAR (Gốc Chothia 92-94, Fig 14) chỉ trước HCDR3 có thể tác động tiêu cực đến nhóm gốc được tích điện âm (gốc Chothia D31, D32, D96 và D101a, Fig 14), có thể quan trọng với gắn kết. VH với thay thế Arginin cho Leuxin tại Gốc Chothia 94 (CAR → CAL) được tạo ra và đặc trưng.

Các mAb kết hợp với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thiết kế, cùng với bố mẹ C2494 đã biểu hiện và thử nghiệm gắn kết với ST2L ở người. từ các HFA mAb được tạo ra, các mAb với các chuỗi VH có khung chuỗi nặng khung IGHV1-24*01 (SEQ ID NO: 148) và IGHV1-f*01 (SEQ ID NO: 149) (STLH195 và STLH194) biểu hiện các giếng kháng thể và gắn kết ST2L khi kết hợp với chuỗi nhẹ HFA khác nhau có các khung IGKV3-15*01 (L2) (SEQ ID NO: 150), IGKV1-9*01 (L8) (SEQ ID NO: 151), IGKV1-5*01 (L12) (SEQ ID NO: 152), IGKV1-12*01 (L5) (SEQ ID NO: 153), IGKV1-39*01 (O12) (SEQ ID NO: 154), IGKV1-27*01 (A20) (SEQ ID NO: 155) hoặc IGKV1-33*01 (O18) (SEQ ID NO: 156) (STLL280, STLL278, STLL277, STLL276, STLL275, STLL274, STLL273, STLL272).

Trình tự của các biến đổi HFA VH và VL được thể hiện trong bảng 12. Gốc được di chuyển là đường gạch dưới, và sự thay thế bổ sung được mô tả nêu

trên được làm nổi bật bằng màu xám. Bảng 13 thể hiện SEQ ID số: cũng như pDR duy nhất (plasmid) và CBIS ID với mỗi HFA VH và VL. Sự tổ hợp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ với các mAb tạo ra được chọn với đặc trưng hơn được thể hiện trong bảng 14.

Bảng 15 thể hiện khung ở người (các vùng V và J kết hợp) được sử dụng để chuyển C2494 CDR.

Bảng 12.

các chuỗi VL của khung thích nghi (được ghép với trình tự JK2).

CDR là đường gạch dưới.

>VL2494 (parent) (SEQ ID NO: 52)

ETTVTQSPASLSVATGEKVTIRCITNTDIDDVIHWYQQKPGEPKLLISEGNTLRP
GVPSRFSSSGYGTDFTIENTLSEVDADYYCLQSDNMLTFGAGTKLEIK

>VL2494-IGKV1-33*01 O18 (SEQ ID NO: 135)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCITNTDIDDVIHWYQQKPGKAPKLLIYEGNTLRP
GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCLQSDNMLTFGQGTKLEIK

>VL2494-IGKV1-27*01 A20 (SEQ ID NO: 136)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCITNTDIDDVIHWYQQKPGKVPKLLIYEGNTLRP
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLQSDNMLTFGQGTKLEIK

>VL2494-IGKV1-39*01O12 (SEQ ID NO: 137)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCITNTDIDDVIHWYQQKPGKAPKLLIYEGNTLRP
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQSDNMLTFGQGTKLEIK

>VL2494-IGKV1-12*01 L5 (SEQ ID NO: 138)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCITNTDIDDVIHWYQQKPGKAPKLLIYEGNTLRP
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQSDNMLTFGQGTKLEIK

>VL2494-IGKV1-5*01 L12 (SEQ ID NO: 139)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCITNTDIDDVIHWYQQKPGKAPKLLIYEGNTLRP
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCLQSDNMLTFGQGTKLEIK

>VL2494-IGKV1-9*01 L8 (SEQ ID NO: 140)

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCITNTDIDDVIHWYQQKPGKAPKLLIYEGNTLRP
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQSDNMLTFGQGTKLEIK

>VL2494-IGKV3-15*01 L2 (SEQ ID NO: 141)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCITNTDIDDVIHWYQQKPGQAPRLIYEGNTLRP
GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCLQSDNMLTFGQGTKLEIK

>VL2494-IGKV1-39*01 O12b (SEQ ID NO: 142)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC ITNTDIDDVIH WYQQKPGKAPKLLIY EGNTLRP
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC LQSDNLLT FGQGTKLEIK

Các chuỗi VH khung thích nghi được ghép với JH1

>VH2494(bố mẹ) (SEQ ID NO: 48)

EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCTASAFNIKDDYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPAIGN
TEYAPKFQD
KATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCALGDFYAMDYWGQGTSTVTVSS

>VH2494-IGHV1-f*01 (SEQ ID NO: 143)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSAFNKDDYMHVQQAPGKGLEWMGRIDPAIG
NTEYAEKFQD
RVTITADTSTDATAYMELSSLRSEDVAVYYCATGDFYAMDYWGQGTLVTVSS

>VH2494-IGHV1-24*01 (SEQ ID NO: 144)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSAFNKDDYMHVVRQAPGKGLEWMGRIDPAIG
NTEYAPKFQD
RVTMTEDTSTDATAYMELSSLRSEDVAVYYCATGDFYAMDYWGQGTLVTVSS

Bảng 13.

	Biến thể HFA	pDR#	CBIS ID	SEQ ID NO:
Chuỗi VH HFA	>VH2494-IGHV1-24*01	9870	STLH195	144
	>VH2494-IGHV1-f*01	9871	STLH194	143
Chuỗi VL HFA	>VL2494-IGKV1-39*01 O12b	9865	STLL280	142
	>VL2494-IGKV3-15*01 L2	9873	STLL278	141
	>VL2494-IGKV1-9*01 L8	9874	STLL277	140
	>VL2494-IGKV1-5*01 L12	9875	STLL276	139
	>VL2494-IGKV1-12*01 L5	9876	STLL275	138
	>VL2494-IGKV1-39*01 O12	9877	STLL274	137
	>VL2494-IGKV1-27*01 A20	9878	STLL273	136
	>VL2494-IGKV1-33*01 O18	9879	STLL272	135

Bảng 14.

		Chuỗi VH		
		Gốc*	>VH2494-IGHV1-24*01	>VH2494-IGHV1-f*01
Chuỗi VL	pRD#	pDR4211	pDR9870	pDR9871
Parent*	pDR4212	STLM126	STLM186	STLM196
>VL2494-IGKV1-39*01 O12b	pDR9865	STLM127	STLM187	STLM197
>VL2494-IGKV3-15*01 L2	pDR9873	STLM129	STLM189	STLM199
>VL2494-IGKV1-9*01 L8	pDR9874	STLM130	STLM190	STLM200
>VL2494-IGKV1-5*01 L12	pDR9875	STLM131	STLM191	STLM201
>VL2494-IGKV1-12*01 L5	pDR9876	STLM132	STLM192	STLM202
>VL2494-IGKV1-39*01 O12	pDR9877	STLM133	STLM193	STLM203
>VL2494-IGKV1-27*01 A20	pDR9878	STLM134	STLM194	STLM204
>VL2494-IGKV1-33*01 O18	pDR9879	STLM135	STLM195	STLM205

*Gốc =C2494 và VL

Bảng 15.

Khung sử dụng dùng cho sự điều chỉnh khung ở người (HFA)		Trình tự	SEQ ID NO:
Gốc vùng khung V	Gốc vùng khung J		
IGHV1-24*01	JH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKVSGYTLTELSMHVVRQAPGKGLEWMGGFDPE DGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATWGQGLTVTVSS	148
IGHV1-f*01	JH1	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPED GETIYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATWGQGLTVTVSS	149
IGKV3-15*01 L2	JK2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI PARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQYNNWPTFGQGTKLEIK	150
IGKV1-9*01 L8	JK2	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVP SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPTFGQGTKLEIK	151
IGKV1-5*01 L12	JK2	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQV PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFAFYCQYNSYPTFGQGTKLEIK	152
IGKV1-12*01 L5	JK2	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSG VPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQANSFPTFGQGTKLEIK	153
IGKV1-39*01 O12	JK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVP SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYSYPTFGQGTKLEIK	154
IGKV1-27*01 A20	JK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLTQSGV PSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDVATYYCQYNSAPTFGQGTKLEIK	155
IGKV1-33*01 O18	JK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGV PSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDIATYYCQYDNLPTFGQGTKLEIK	156

Ví dụ 12. Thiết kế Alanin và các đột biến dòng mầm của người để quét paratop

Tiến hành đột biến trực tiếp điểm để đánh giá các đóng góp gắn kết của gốc CDR riêng biệt cũng như một số gốc có tác dụng tiềm ẩn trên kháng thể đặc trưng khác. Dựa trên mô hình phân tử của C2494 Fv nêu trên, dự đoán tập hợp

con của gốc CDR được phơi nhiễm trong dung môi là liên quan đến gắn kết kháng nguyên. Việc này được đột biến với Alanin và/hoặc gốc ‘giống như người’ tương ứng, là gốc tương ứng trong gen dòng mầm bất cặp gần nhất. D101aA (Gốc Chothia), (D104A trong SEQ ID NO: 48) thay thế C2494 VH đã làm giảm k_{off} khoảng gấp 4 lần, từ $1,43 \times 10^{-4}$ đến $3,2 \times 10^{-5}$.

Do sự thay thế D101aA đã làm giảm k_{off} của C2494 Fab trong gắn kết với ST2L nên đã mong đợi rằng đột biến tương tự có thể cũng cải thiện tốc độ dừng trong các biến đổi C2494 HFA. Do đó, D101aA (đánh số Chothia) được kết hợp trong VH của STLH194 (>VH2494-IGHV1-f*01, SEQ ID NO: 143) để tạo ra VH STLH201 (SEQ ID NO: 145). STLH201 được cặp đôi với 7 chuỗi nhẹ STLL280, STLL277, STLL276, STLL275, STLL274, STLL273 và STLL272 (Bảng 13 và Bảng 14) đối với generate các mAb STLM226, STLM227, STLM228, STLM229, STLM230, STLM231 và STLM232 còn được đặc trưng hơn. Do đó, các mAb STLM226, STLM227, STLM228, STLM229, STLM230, STLM231 và STLM232 tương đồng với trình tự LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1 và HCDR2 khi so với kháng thể C2494 bố mẹ và HCDR3 khác (SEQ ID NO: 146, GDFYAMAY). Ngoài ra, kháng thể STLM266 VL STLM280 có LCDR3 duy nhất: LQSDNLLT (SEQ ID NO: 147)

STLH201 (SEQ ID NO: 145):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSAFNIKDDYMHVWVQQAPGKGLEWMGRIDPAIG
NTEYAEKFQG
RVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDTAVYYCATGDFYAMAYWGQGTLVTVSS

HCDR3 tổng hợp thay thế D101aA (đánh số Chothia):

SEQ ID NO: 146: GDFYAMAY

kháng thể STLM266 VL STLM280 có LCDR3 duy nhất: LQSDNLLT (SEQ ID NO: 147)

Ví dụ 13. Đặc trưng của các kháng thể kháng ST2L

Các kháng thể thu được từ các chiến dịch biểu hiện thực khuẩn thể, tế bào lai và điều hợp khung ở người được đặc trưng ở các thử nghiệm khác nhau bao gồm gắn kết với huST2L-ECD, cynoST2L-ECD, đo ái lực, các thể khảm gắn kết

với người/chuột để xác định miền gắn kết, thử nghiệm ức chế thụ thể -phối tử, thử nghiệm gen báo cáo, và thử nghiệm đáp ứng tế bào mast.

Các ái lực của các kháng thể thu được từ chiến lược biểu hiện thực khuẩn thể với ST2L ở người và khi cyno cũng như tính đặc hiệu gắn kết của chúng với ST2L ở người thể hiện trong bảng 16. Tất cả các kháng thể trong bảng 16 gắn kết với miền I của ST2L ở người.

Bảng 16.

	Ái lực ST2L ở người			Ái lực ST2L ở cyno			Gắn kết miền ST2L- ECD -----g
	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	KD (pM)	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	KD (pM)	
STLM103	3.97E+06	1.63E-04	41	6.42E+06	2.02E-04	31	D1
STLM107	2.90E+07	3.41E-04	12	1.00E+08	6.50E-04	7	D1
STLM108	2.29E+06	2.22E-04	97	2.05E+07	5.98E-04	29	D1
STLM123	1.37E+07	2.08E-04	15	1.00E+08	5.19E-04	5	D1
STLM124	1.65E+07	7.56E-04	46	8.71E+07	2.57E-03	30	D1
STLM206	6.39E+06	1.60E-04	25	9.40E+07	5.83E-04	6	D1
STLM207	8.33E+06	3.95E-04	48	1.00E+08	2.07E-03	21	D1
STLM208	5.97E+06	6.76E-05	11	1.39E+07	7.02E-05	5	D1
STLM209	6.59E+06	1.70E-04	26	3.39E+07	3.11E-04	9	D1
STLM210	1.21E+07	2.27E-04	19	5.70E+07	5.28E-04	9	D1
STLM211	1.70E+07	4.83E-04	29	1.00E+08	1.39E-03	14	D1
STLM212	1.24E+07	3.98E-04	32	1.43E+07	3.46E-04	24	D1
STLM213	7.54E+06	1.08E-04	14	1.64E+07	1.24E-04	8	D1
STLM214	9.16E+06	2.99E-04	33	7.20E+06	2.64E-04	37	D1
STLM215	6.91E+06	1.72E-04	25	3.54E+07	3.69E-04	10	D1
STLM216	9.63E+06	1.58E-04	16	7.89E+07	2.64E-04	3	D1
STLM217	7.27E+06	1.26E-04	17	3.81E+07	1.38E-04	4	D1
STLM218	9.89E+06	2.24E-04	23	1.45E+07	2.65E-04	18	D1
STLM219	7.54E+06	2.01E-04	27	1.07E+07	2.30E-04	22	D1
STLM220	5.80E+06	9.53E-05	16	1.60E+07	1.40E-04	9	D1
STLM221	2.73E+06	9.61E-05	35	6.04E+06	1.30E-04	22	D1
STLM222	8.22E+06	3.01E-04	37	1.18E+07	3.45E-04	29	D1
STLM226	2.16E+07	1.93E-03	90	1.00E+08	3.01E-02	301	D1
STLM227	2.66E+07	1.70E-03	64	1.00E+08	2.94E-02	294	D1
STLM228	2.01E+07	1.04E-03	52	1.00E+08	1.55E-02	155	D1
STLM229	1.29E+07	4.45E-04	35	1.00E+08	8.50E-03	85	D1
STLM230	1.11E+07	4.26E-04	38	5.06E+07	7.30E-03	144	D1
STLM231	1.97E+07	9.13E-04	46	8.27E+07	1.43E-02	172	D1
STLM232	1.78E+07	4.49E-04	25	1.00E+08	7.97E-03	80	D1

Các ái lực của các kháng thể kháng ST2L từ chiến dịch HFA liên quan đến (STLM62, C2494) bố mẹ được thể hiện trong bảng 17. Các ái lực được phân tích bằng ProteOn. Tiến hành các thử nghiệm ở 25°C bằng cách sử dụng chất đệm

PBS-T-E ProteOn (PBS, 0,005%P20 và 3mM EDTA) làm chất đệm chạy. Để thực hiện các thử nghiệm, chuẩn bị chip cảm biến GLC bằng cách cố định đồng hóa trị của kháng Fc ở người của dê (~5800 RU), 122 - 146 đơn vị phản ứng (RU) Mab được chụp. Chụp Mab, sau đó là tiêm ST2L-ECD từ 0,024-15 nM (các lần pha loãng gấp 5 lần) trong 4 phút (200 μ L ở 50 μ L/phút). Kiểm soát sự phân ly trong 30 phút đối với tất cả phản ứng. Tiến hành tái tạo ra bằng cách sử dụng hai xung động 15 giây 10mM Glyxin pH1,5. Dữ liệu được điều chỉnh đến 1:1 với mô hình hướng theo đường chuẩn.

Các tốc độ kết hợp với các mẫu là nhanh, langmuir với mô hình dịch chuyển khối lượng được sử dụng để điều chỉnh đường cong và ước lượng ái lực. Tất cả các mẫu có các tốc độ bỏ nhanh hơn dòng bố mẹ và Mab đối chứng. Sự khác biệt về tốc độ bỏ là phản đóng góp chủ yếu cho ái lực thấp của các biến đổi HFA khi so với kháng thể bố mẹ.

Bảng 17.

Sample	Ái lực ST2L ở người			Ái lực ST2L ở cyno		
	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_D (pM)	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_D (pM)
STLM62 *	1.84E+07	1.59E-04	8.67	3.84E+07	4.57E-04	12.35
STLM187	3.37E+07	1.59E-02	473.00	1.00E+08	1.10E-01	1100.00
STLM190	1.00E+08	5.34E-02	534.00	1.00E+08	1.02E-01	1020.00
STLM191	8.46E+07	2.47E-02	292.00	1.00E+08	6.66E-02	666.00
STLM192	2.11E+07	8.85E-03	420.00	1.00E+08	9.99E-02	999.00
STLM193	4.77E+07	1.27E-02	267.00	1.00E+08	9.32E-02	932.00
STLM194	1.00E+08	7.03E-02	703.00	1.00E+08	1.90E-01	1900.00
STLM195	2.49E+07	6.73E-03	271.00	1.00E+08	7.19E-02	719.00
STLM197	1.83E+07	1.62E-03	88.50	2.97E+07	6.88E-03	232.00
STLM199	2.17E+07	8.97E-04	41.40	7.78E+07	6.57E-03	84.50
STLM200	2.35E+07	1.43E-03	60.80	8.23E+07	1.10E-02	134.00
STLM201	1.76E+07	8.52E-04	48.40	3.55E+07	4.10E-03	116.00
STLM202	2.24E+07	1.19E-03	52.90	7.75E+07	1.04E-02	134.00
STLM203	2.04E+07	9.67E-04	47.30	5.88E+07	6.56E-03	111.00
STLM204	2.97E+07	2.41E-03	81.30	1.00E+08	2.05E-02	205.00
STLM205	1.73E+07	6.95E-04	40.10	4.04E+07	4.04E-03	100.00

*STLM62=kháng thể gốc

Bảng 18.

Gốc	mAb	RLB IC50, µg/ml	RGA IC50, µg/ml	Thử nghiệm màng trong Cyno	Giải phóng xytokin
Biểu hiện pha	STLM103	0.47	1.92	NT	+
	STLM107	0.44	1.10	NT	++
	STLM108	0.23	2.34	++	++
	STLM116	0.29	6.71	NT	+
	STLM123	0.28	1.25	NT	++
	STLM124	0.35	0.87	++	++
	STLM206	0.40	0.67	++	++
	STLM207	0.36	2.30	NT	++
	STLM208	0.47	0.61	++	++
	STLM209	0.32	0.97	++	++
	STLM210	0.30	2.10	NT	++
	STLM211	0.28	2.52	NT	++
	STLM212	0.33	4.32	NT	+
	STLM213	0.34	0.49	++	++
	STLM214	0.28	2.52	NT	++
	STLM215	0.29	1.30	NT	++
	STLM216	0.30	1.86	NT	++
	STLM217	0.49	1.69	NT	++
	STLM218	0.42	1.33	NT	++
	STLM219	0.29	3.16	NT	++
	STLM220	0.39	0.60	NT	++
	STLM221	0.39	2.79	NT	+
	STLM222	0.25	1.88	NT	++
	STLM226	0.26	0.25	++	++
	STLM227	0.17	0.23	++	++
	STLM228	0.20	0.28	++	++
HFA	STLM229	0.29	0.32	++	++
	STLM230	0.28	0.15	++	++
	STLM231	0.26	1.10	+	+
	STLM232	0.31	0.15	++	++
hybridoma C2494	STLM62*	0.70	0.11	++	++

++ ức chế mạnh
 + Một số ức chế
 - không số ức chế
 NT không thử nghiệm
 * Được thử nghiệm như hybridoma
 RLB= sự ức chế gắn kết phối tử với thụ thể
 RGA= thử nghiệm gen thông tin

Thử nghiệm các kháng thể được chọn cho đáp ứng tế bào mast đo sự ức chế 3ng/ml sự giải phóng IL-5, IL-13 và IL-8 bị kích thích do IL-33 từ các tế bào mast thu được máu cuống rốn ở người như được mô tả sử dụng 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml hoặc 0,01 µg/ml kháng thể trong RPMI + 10% FCS. Trong các điều kiện thử nghiệm này, tất cả các kháng thể được thử nghiệm đã ức chế sự ức

chế sự giải phóng IL-5, IL-13 và IL-8 xytokin bị kích thích do IL-33 theo khoảng 40%-100% ở nồng độ kháng thể 100 $\mu\text{g/ml}$ khi so với mẫu đối chứng bị kích thích với IL-33.

Ví dụ 14. Các con đường tín hiệu xuôi dòng ức chế kháng thể kháng ST2L trong bạch cầu ưa kiềm của người

Các kháng thể kháng ST2L thử nghiệm cho khả năng của chúng để ức chế tín hiệu p38 MAPK ở bạch cầu ưa kiềm ở người.

Toàn bộ máu được thu gom trong các ống heparin hóa và được mang vào nhiệt độ trong phòng (RT) trước khi bắt đầu thử nghiệm. Phân ước 1mL máu vào 50mL ống hình nón cụt và kháng thể kháng ST2L (STLB252) hoặc isotyp đối chứng (CNT0 8937) được pha loãng trong PBS được thêm vào với nồng độ cuối là 2, 20, hoặc 200 $\mu\text{g/mL}$. Xoáy nhẹ các ống để trộn và đặt trong máy ủ ở 37°C x 30 phút, xoáy nhẹ sau đó 15 phút. Tiếp đó, nhuộm máu bằng các kháng thể được gắn flochrom chống lại kháng nguyên bề mặt tế bào (CD123-FITC, CRTH2-PCP-CY5,5, và CD45-APC-C7) và ủ các ống ở 37°C trong 15 phút. Bổ sung 1mL môi trường nuôi cấy được làm ấm (RPMI-1640/10% FBS/1% pen-strep) vào mỗi ống trước khi pha loãng IL-33 trong môi trường nuôi cấy được làm ấm được thêm vào với nồng độ cuối là 10ng/mL. Ủ các mẫu ở 37°C x 10 phút trước khi thêm 20mL chất đệm BD Phosflow Lyse/Fix được làm ấm trước vào mỗi ống, để phân hủy đồng thời các tế bào máu và cố định các mẫu. Các ống được trộn đều bằng cách đảo 10 lần và ủ ở 37°C x 10 phút. Rửa các mẫu với 20mL RT PBS khử trùng, tái tạo huyền phù trong 2mL chất đệm 1x RT BD Perm/Wash chất đệm, và ủ ở nhiệt độ trong phòng x 30 phút. Rửa các mẫu một lần với 2 mL chất đệm BD Perm/Wash và tiếp đó tái tạo huyền phù trong 400 μL BD Perm/chất đệm rửa. Thêm kháng thể được đánh dấu PE chống lại p38-MAPK (vCell Signal, Cat. 6908S) và ủ các mẫu trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, được bảo vệ với ánh sáng. Rửa các mẫu một lần với 5 mL Perm/chất đệm rửa trước khi tái tạo huyền phù trong 100 μL chất đệm FACS và di chuyển vào tám 96 giếng đáy tròn. Các mẫu được phân tích nhờ sử dụng máy đo tốc độ chảy tế bào BD LSRII tận dụng hệ tốc độ cao (HTS) thu càng nhiều dòng càng tốt cho mỗi mẫu. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm FloJo. Bạch cầu ưa kiềm được nhận dạng là CD45⁺CRTH2⁺CD123⁺ và phần trăm bạch cầu ưa kiềm dương tính với p38

MAPK đánh giá với mỗi điều kiện.Ủ trước toàn bộ máu với kháng ST2L mAB (STLB252) thu được sự ức chế phụ thuộc liều của sự phosphoryl hóa p38-MAPK bị kích thích do IL-33, trong khi không có ảnh hưởng nào quan sát được với isotyp đối chứng (CNTO 8937). Kháng thể kháng ST2L ở người chặn đặc hiệu sự hoạt hóa bạch cầu ưa kiềm bằng IL-33 ở người tái tổ hợp trong ngữ cảnh là toàn bộ máu. Các kết quả đề xuất rằng các kháng thể kháng ST2L ức chế tín hiệu bằng IL-33 nội sinh *in vivo*.

Bảng 19.

IL-33 (10 ng/ml)	STLB252 (μ g/mL)	Isotyp đối chứng (μ g/mL)	% phosphory hóa p38 MAPK
-	0	0	2.2
+	0	0	80.6
+	2	0	44.4
+	20	0	15.7
+	200	0	1.2
+	0	2	76.7
+	0	20	79
+	0	200	77

Ví dụ 15. Hứa hẹn hướng *In vivo* bởi kháng thể kháng ST2L

Mô hình *in vivo* mIL-33 6 giờ trong mũi của tuyến chọn tế bào BAL

Dùng liều đơn của 1,2 μ g/chuột mIL-33 (R&D systems #3626-ML/CF) hoặc PBS với chuột đực Balb/c (6-8 tuần tuổi, Taconic). Kháng thể kháng chuột của chuột ST2L CNTO 3914 hoặc ở 2, 0,2, 0,06, hoặc 0,02 mg/kg, 24 giờ trước khi dùng trong mũi mIL-33 đầu tiên. Isotyp đối chứng (ITC) mAb CNTO 5516 được tạo liều đồng thời ở 2 mg/kg. 6 giờ sau khi dùng mIL-33 (hoặc PBS), gây mê chuột và máu được thu gom để phân tích huyết thanh. Tiến hành rửa túi phổi (BAL) bằng cách tiêm hai thể tích 0,7 mL của PBS/0,1% BSA vào các phổi và thu được các chất thải ra. Ly tâm các BAL (1200 vòng/phút, 10 phút) và tái tạo huyền phù viên tế bào trong 200 μ l PBS với tổng số và đếm các tế bào biệt hóa bằng cách sử dụng máy đo tế bào máu (on Wright's – Giemsa-stained cytospin preparations).

Đo CNTO 3914 ở huyết thanh của chuột

Tấm MSD SA-STD được chặn bằng 50 μ L/ giếng của chất đệm thử nghiệm trong 5 phút. Xoay tấm để loại bỏ chất đệm thử nghiệm và được chặn trên các khăn giấy. 50 μ L/ giếng của 1,4 μ g/mL thể khảm ST2L/IL1R4/Fc được biotinylat hóa ở chuột tái tổ hợp (hệ R&D) trong chất đệm thử nghiệm được thêm vào và ủ qua đêm trong tủ lạnh. Bổ sung 150 μ L chất đệm thử nghiệm vào mỗi giếng tấm được phủ trước mà không loại bỏ chất phản ứng phủ và ủ trong 30 phút. Rửa tấm ba lần với chất đệm rửa trên vật rửa tấm. Chặn tấm nhẹ nhàng trên khăn giấy để loại bỏ chất đệm rửa còn lại. 50 μ L/ giếng của mẫu CNTO 3914 được bổ sung vào mỗi giếng của tấm. Tấm được ủ trong một giờ với lắc nhẹ nhàng ở nhiệt độ môi trường. Rửa tấm ba lần bằng chất đệm rửa trên vật rửa tấm. 50 μ L/ giếng chuẩn độ của kháng IgG1b ở chuột của chuột được gắn ruten (BD Biosciences) được bổ sung vào mỗi giếng của tấm. Tấm được ủ trong một giờ với việc lắc nhẹ ở nhiệt độ môi trường. Tấm were được rửa ba lần với chất đệm rửa trên vật rửa tấm. 150 μ L chất đệm đọc được bổ sung vào mỗi giếng của tấm. Tấm được đọc ngay trên máy đọc MSD sector imager 6000 với các mức huỳnh quang.

Thử nghiệm toàn bộ máu

Máu được pha loãng 1:4 trong môi trường DMEM + 1% dung dịch Penixillin+streptomycin +/- 10 ng/ml IL-33 ở chuột trong các ống lọc Sarstedt. Các ống được ủ ở 37°C qua đêm, tiếp đó là đo các mức xytokin và chemokin trên dịch nổi bằng cách sử dụng bộ kit Millipore Milliplex Mouse Xytokin/Chemokin theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kết quả

Kháng thể kháng ST2L có thể phát hiện trong huyết thanh của chuột 24 giờ sau dùng liều với 0,2 hoặc 2 mg/kg CNTO 3914 (Fig 16A).

Dùng trong mũi sự tuyển chọn tế bào bị kích thích do IL-33 vào đường hô hấp ở 6 giờ (Fig 16B). Kháng ST2L mAb làm giảm sự tuyển chọn tế bào BAL; 0,2 mg/kg là liều tối thiểu cần thiết để quan sát sự ức chế đáng kể của sự tuyển chọn tế bào BAL (Fig 16B). Ý nghĩa thống kê được tính toán bằng cách sử dụng One-way ANOVA.

Toàn bộ máu được kích thích bằng IL-33 ở chuột đã thể hiện tăng mức xytokin và chemokin, bao gồm IL-6 (Fig 16C) và MCP-1 (Fig 16D), sau 24 giờ.

Ở các chuột có liều 20 mg/kg hoặc 2 mg/kg anti-ST2L mAb CNTO 3914, các mức IL-6 và MCP-1 giảm so với CNTO5516 (isotypic control kháng IgG1 ở chuột đối chứng isotyp), nhằm đạt được sự hứa hẹn cuối cùng. Liều tối thiểu tương quan với sự ức chế toàn bộ thử nghiệm máu, 2 mg/kg, cũng ức chế sự tuyển chọn tế bào BAL (Fig 16B).

Dữ liệu này xác nhận rằng kháng ST2L mAb đạt đến điểm hoạt tính và tác dụng được lý mong đợi đã đạt được (nhắm đến các hứa hẹn hướng đến).

Ví dụ 16. Epitop của kháng thể kháng ST2L

Tiến hành các nghiên cứu đánh dấu epitop và sự cạnh tranh để chọn các kháng thể kháng ST2L.

Các thử nghiệm gắn kết cạnh tranh

Các thử nghiệm gắn kết cạnh tranh được tiến hành để đánh giá các nhóm epitop gắn kết khác nhau với các kháng ST2L mAb. 5 μ l (10 μ g/ml) protein ST2L-ECD được phủ trên tấm MSD HighBind (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) mỗi giếng trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. 100 và 50 microlit của 5% MSD chất đệm chặn A (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tấm được rửa ba lần với 0,1M HEPES chất đệm, độ pH là 7,4, sau đó là thêm hỗn hợp thuốc nhuộm huỳnh quang MSD (gắn sulfo, NHS este) được gắn kháng thể kháng ST2L riêng biệt với các chất cạnh tranh khác nhau. Kháng thể được gắn, 10 hoặc 30 nM, được ủ với việc tăng nồng độ các kháng thể cạnh tranh, từ 1 nM đến 2 hoặc 5 μ M, và tiếp đó bổ sung vào các giếng được chỉ định trong thể tích hỗn hợp 25 μ L. Sau đó 2 giờ ủ với lắc nhẹ nhàng ở nhiệt độ trong phòng, tấm được rửa 3 lần với chất đệm 0,1M HEPES (độ pH là 7,4). Chất đệm đọc MSD T được pha loãng với nước cất (gấp 4 lần) và phân phối với thể tích là 150 μ L/giếng và được phân tích bằng SECTOR Imager 6000.

Sau đó các kháng thể được sử dụng trong các thử nghiệm gắn kết cạnh tranh: miền I của ST2L gắn kết làm trung hòa các kháng thể STLM208, STLM213, C2244 (STLM15) và C2494 (STLM62), miền I của ST2LII gắn kết kháng thể C2539, và không làm trung hòa kháng thể kháng ST2L C2240 gắn kết với miền I của ST2L ở người. Fig 17A và 17B thể hiện các thử nghiệm cạnh tranh. Dựa trên thử nghiệm này, các nhóm epitop được nhận dạng là: BinA: các

mAb C2244, C2494, STLM208 hoặc STLM213; BinB: mAb C2240, BinC: C2539. Các kháng thể chặn sự tương tác IL33/ ST2L và đáp ứng tế bào mast ức chế được tìm thấy trong cùng nhóm epitop và cạnh tranh chéo với mỗi nhóm còn lại. Tóm tắt về dữ liệu cạnh tranh thể hiện trong bảng 20.

Bảng 20.

Chất cạnh tranh	Kháng thể đánh dấu			
	C2240	C2539	C2244	C2494
C2240	+	-	-	-
C2539	-	+	-	-
C2244	-	-	+	+
C2494	-	-	+	+
STLM208	-	-	+	+
STLM213	-	-	+	+

Đánh dấu epitop: phân tích trao đổi H/D

Với trao đổi H/D, quy trình được sử dụng để phân tích nhiều kháng thể giống với quy trình được mô tả trước đây (Hamuro, Y., và *các đồng tác giả*, Journal of Biomolecular Techniques, 14:171–182, 2003; Horn, J. R., *các đồng tác giả*, Biochemistry, 45: 8488-8498, 2006) với một số biến đổi. ST2-ECD tái tổ hợp (biểu hiện từ HEK293E với gắn His ở đầu C) (gốc 18-328 của SEQ ID NO: 157) được ủ trong dung dịch nước được đơ tơ ri hóa trong các lần được xác định trước thu được trong tổng hợp đơ tơ ri tại các nguyên tử hydro có thể trao đổi. ST2-ECD được đơ tơ ri được chụp trên cột chứa các phân tử kháng ST2L C2244 Fab được cố định và tiếp đó được rửa với chất đệm chứa nước. Protein ST2-ECD trao đổi sau được rửa giải từ cột và định vị đơ tơ ri chứa các mảnh được xác định bằng cách hủy Proteaza các phân tích khối phổ.

Fig 18 thể hiện biểu đồ trao đổi H/D được đơn giản hóa của ST2-ECD ở người (có thể hòa tan ST2) được phức hợp với C2244 Fab. Gốc 18-31 của ST2-ECD của SEQ ID NO: 119 (gốc axit amin RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210) được bảo vệ bằng Fab (tương ứng với gốc 35-48 của ST2L có chiều dài đầy đủ của SEQ ID NO: 1. Dữ liệu cho thấy C2244 gắn kết với epitop

RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210), VÀ các kháng thể cạnh tranh với C2244 (C2494, STLM208 hoặc STLM213) có thể gắn kết cùng epitop chéo.

Đánh dấu epitop bằng cách gây đột biến

Tạo một vài chất đột biến ST2L có sự thay thế với gốc của chuột tương ứng tại miền I của ST2L. Các kháng thể được thử nghiệm không phản ứng chéo với ST2L của chuột, do đó mong đợi rằng các biến đổi ST2L với sự gắn bị hủy bỏ và/hoặc giảm là chỉ định gốc epitop tại các vị trí thay thế trên ST2L. Các biến đổi được thực hiện trong cấu trúc HH-ST2L có gốc 19-205 của ST2L có chiều dài đầy đủ của SEQ ID NO: 1 sử dụng các phương pháp chuẩn. Các kháng thể được thử nghiệm để gắn kết với các biến đổi ST2L bằng ELISA hoặc Proteon.

Cộng hưởng plasmon bề mặt

Tiến hành các nghiên cứu gắn kết bằng cách sử dụng hệ mảng tương tác protein ProteOn XPR36 (Bio-Rad) (Bravman T, và các đồng tác giả Anal Biochem 358:281–288, 2006). Hỗn hợp Fc kháng người/kháng chuột (Jackson ImmunoResearch, Cat#, 109-005-098/115-005-071) được cố định trên chip cảm biến GLC bằng hóa học ghép amin. Tiếp đó, kháng ST2L mAb được chụp bằng tạo dòng (1µg/mL) dung dịch kháng thể được điều chế trong PBS chứa 0,5% Nonidet P-40 và 0,5% Na-deoxycholat). Tín hiệu trong các bề mặt đạt đến ~250 đơn vị cộng hưởng (RU, 1 RU = 1 pg protein/mm²) ở các bề mặt phủ kháng Fc, xác nhận rằng các kháng thể này đặc hiệu với kháng ST2L mAb chụp. Sau đó quay 90° hệ dịch lỏng, kiểu đại của ST2L-D1D2 hoặc Protein biến đổi (0,5mg/mL trong PBS chứa 0,5% Nonidet P-40 và 0,5% Na-deoxycholat) được tiêm trong các kênh chảy song song. Tất cả các thử nghiệm này được tiến hành ở 25°C. Các tín hiệu phụ thuộc ST2L-D1D2 trên các bề mặt thu được bằng cách tham chiếu kép, loại bỏ đáp ứng quan sát được trên các bề mặt cố định riêng các kháng thể, và tín hiệu quan sát được tiêm tá được lỏng (cho phép sự hiệu chỉnh đáp ứng phụ thuộc vào gắn kết). Các sơ đồ cảm biến thu được được điều chỉnh bằng mô hình tương tác 1:1 (các phân tích phần mềm ProteOn), để thu được hỗn hợp tương ứng và hằng số tốc độ phân ly (k_a và k_d).

Fig 19 thể hiện các biến đổi ST2L được thực hiện và ái lực của các kháng thể ST2B206 và ST2B252 kháng ST2L với các biến đổi. Biến thể 93NL94 (thay

thể 93TF94-> 93NL94) làm giảm sự gắn kết ái lực của cả hai STLM208 và STLB252 gấp khoảng 5 lần từ khoảng $10,8 \times 10^{-12}$ M đến $49,5 \times 10^{-12}$ M. Việc thiếu sự khử đáng kể gắn kết ái lực nhằm đến năng lượng gắn kết cho sự tương tác giữa kháng thể và ST2L-D1D2 là tổng của vùng epitop (RCPRQGKPSYTVDW; SEQ ID NO: 210) được nhận dạng bằng các phân tích trao đổi H/D và sự đóng góp bổ sung từ vị trí 93NL94. Đánh số gốc là theo chiều dài có đầy đủ ST2L ở người của SEQ ID NO: 1.

Ví dụ 17. các kháng thể gắn kết miền I của ST2L ức chế đáp ứng tế bào mast in vitro ở người chủ yếu

Khả năng của miền I của ST2L gắn kết các kháng thể để ức chế đáp ứng tế bào mast của phổi được đánh giá bằng cách giải phóng chemokin và xytokin trong các tế bào mast phổi ban đầu ở người.

Phân lập các tế bào mast phổi ban đầu ở người

Các tế bào mast phổi ban đầu ở người được phân lập từ mô không hút thuốc thu được từ Viện Quốc tế tiên tiến y học. Các tế bào được phân tán từ nhu mô ở phổi và đường hô hấp nhỏ băm nhỏ, rửa, và cất nhu mô qua đêm ở 37°C trong các enzyme collagenaza và hyaluronidaza. Các tế bào được thu gom, rửa, và đưa vào quy trình làm giàu sử dụng kit CD117 MicroBead (người) từ MACS Miletnyi Biotec để lựa chọn tích cực các tế bào mast từ quần thể. Trước thử nghiệm, các tế bào mast được nuôi cấy trong 6 tuần trong tế bào gốc StemPro-34 + 200ng/ml. Hai tuần sau khi phân lập, các tế bào đặc trưng về kiểu hình bằng cách sử dụng đo dòng tế bào chảy để xác định phần trăm độ sạch tế bào mast. Các tế bào được sử dụng trong các thử nghiệm sau là 89% dương tính kép với CD117 (C-kit hoặc thụ thể của nhân tố tế bào gốc) và FcεRI (thụ thể IgE ái lực cao). Hơn nữa, chúng dương tính 94,2% với ST2L; do đó xác nhận kiểu hình tế bào mast của chúng.

Thử nghiệm giải phóng xytokin từ các tế bào mast phổi ban đầu ở người

Các tế bào mast phổi ban đầu ở người đã được nuôi cấy trong tế bào gốc StemPro-34 + 200ng/ml trong khoảng 6 tuần được thu gom, và rửa bằng cách ly tâm trong RPMI (10% FCS bất hoạt với nhiệt). Đếm các tế bào và đặt trong môi trường RPMI / 10% FCS với mật độ 65,000 tế bào trong tấm i 96 giếng. Kháng miền I của ST2L gắn kết với các mAb được bổ sung vào các tế bào mast của phổi

sơ cấp, và cho phép gắn kết trong 30 phút ở 37°C trước khi kích thích với IL-33. Các tế bào được kích thích trong 24 giờ với 3ng/ml IL-33 để bắt đầu tích tụ các chất trung gian khác nhau vào dịch nổi canh trường. Dịch nổi canh trường được thu hoạch và bảo quản đông lạnh cho đến khi thử nghiệm trong kit Milliplex 9-plex tùy biến.

Kháng thể gắn kết kháng miên I của ST2L, STLM208, đã ức chế sự giải phóng GM-CSF, IL-5 (Fig 20B), IL-8 (Fig 20C), và IL-13 (Fig 20D) bị kích thích do IL-33 (Fig 20A) trong các tế bào mast phổi ban đầu ở người với nồng độ kháng thể 100 µg/ml, 10 µg/ml và 1 µg/ml. Các kết quả giống hệt thu được bằng cách sử dụng các tế bào mast thu được từ máu cuống rốn (dữ liệu không được thể hiện).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất đối kháng kháng thể được phân lập hoặc mảnh của nó mà gắn kết đặc hiệu với miền I (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9) của ST2L ở người, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó:
 - (a) VH chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 191; và
 - (b) VL chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 209.
2. Chất đối kháng kháng thể được phân lập theo điểm 1, trong đó chất đối kháng kháng thể này là typ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4, tùy ý có sự thay thế ở vùng Fc và tùy ý trong đó sự thay thế bao gồm sự thay thế M252Y/S254T/T256E, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S hoặc 228P/L234A/L235A, trong đó gốc đánh số là theo số EU.
3. Polynucleotit được phân lập mã hóa chất đối kháng kháng thể được phân lập theo điểm 1 hoặc 2.
4. Vector chứa polynucleotit được phân lập theo điểm 3.
5. Tế bào chủ chứa vector theo điểm 4.
6. Phương pháp sản xuất chất đối kháng kháng thể, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 5 và thu hồi chất đối kháng kháng thể từ tế bào chủ.
7. Dược phẩm chứa chất đối kháng kháng thể được phân lập theo điểm 1 hoặc 2 và chất mang dược dụng.

Fig 1

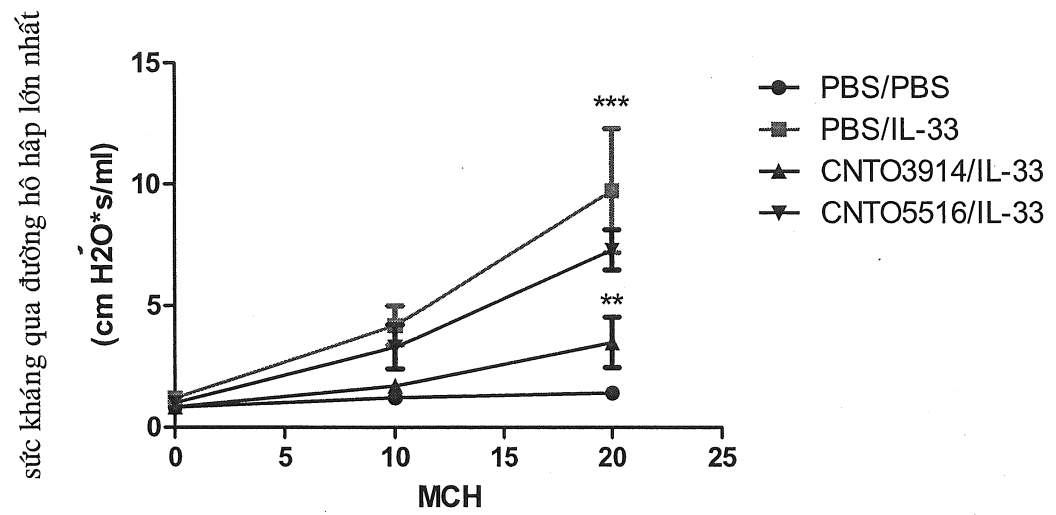


Fig 2

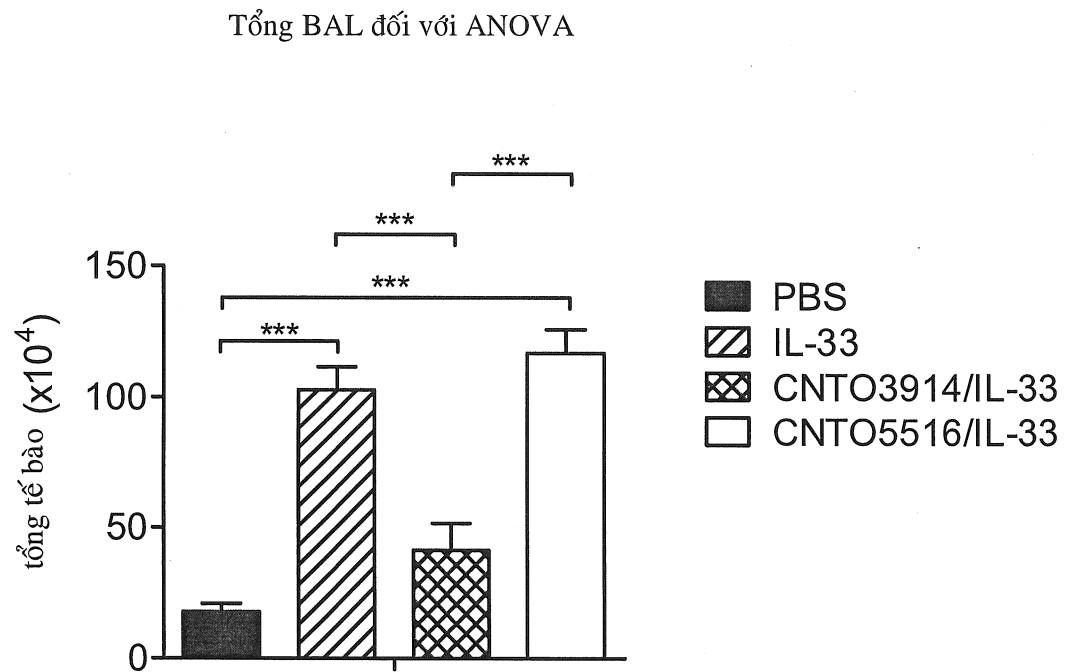


Fig 3

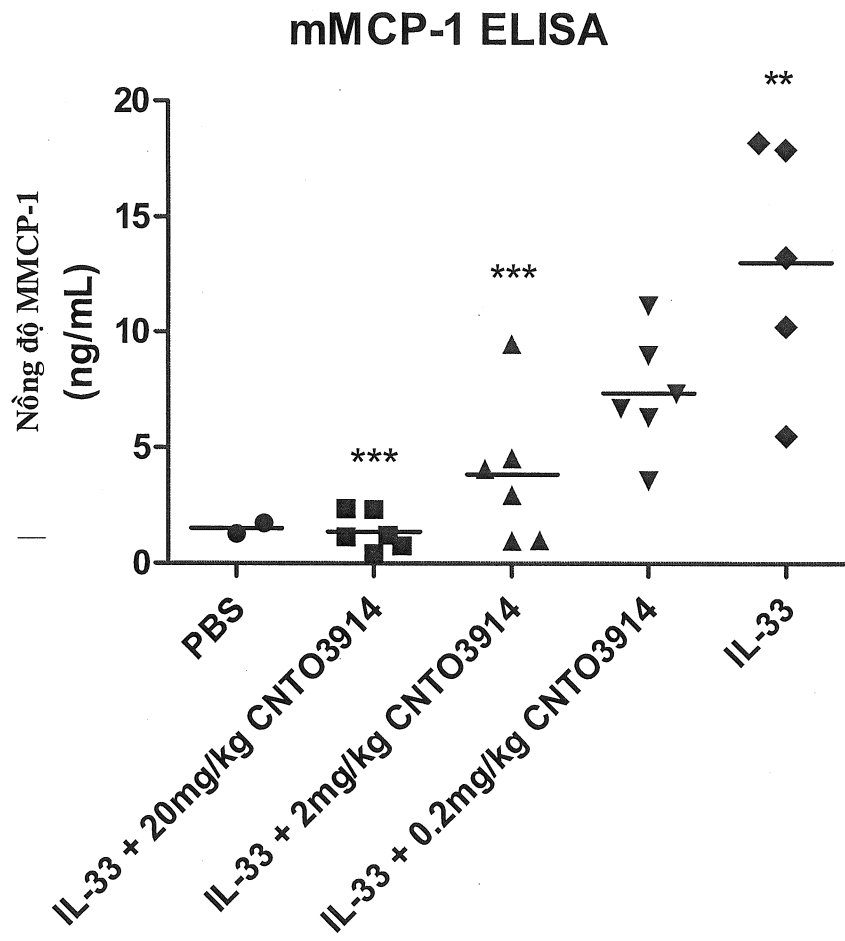


Fig 4A

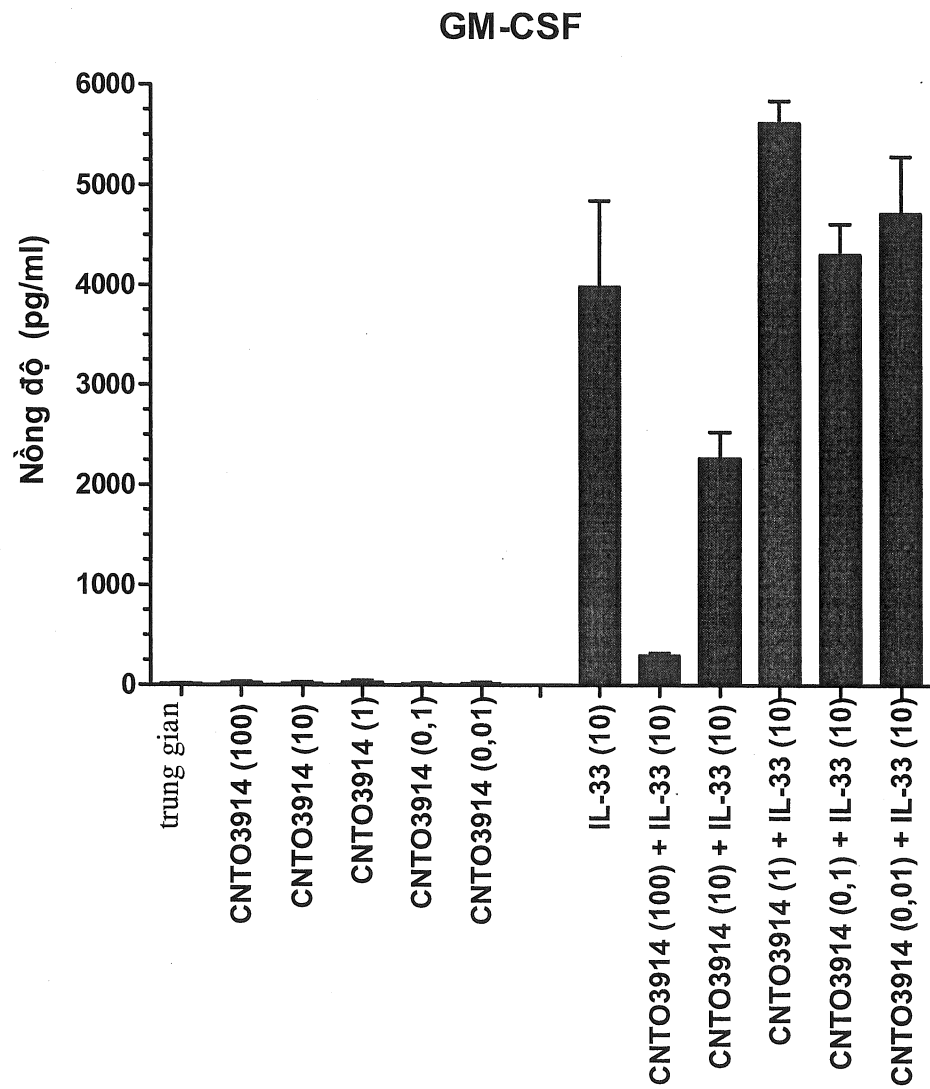


Fig 4B

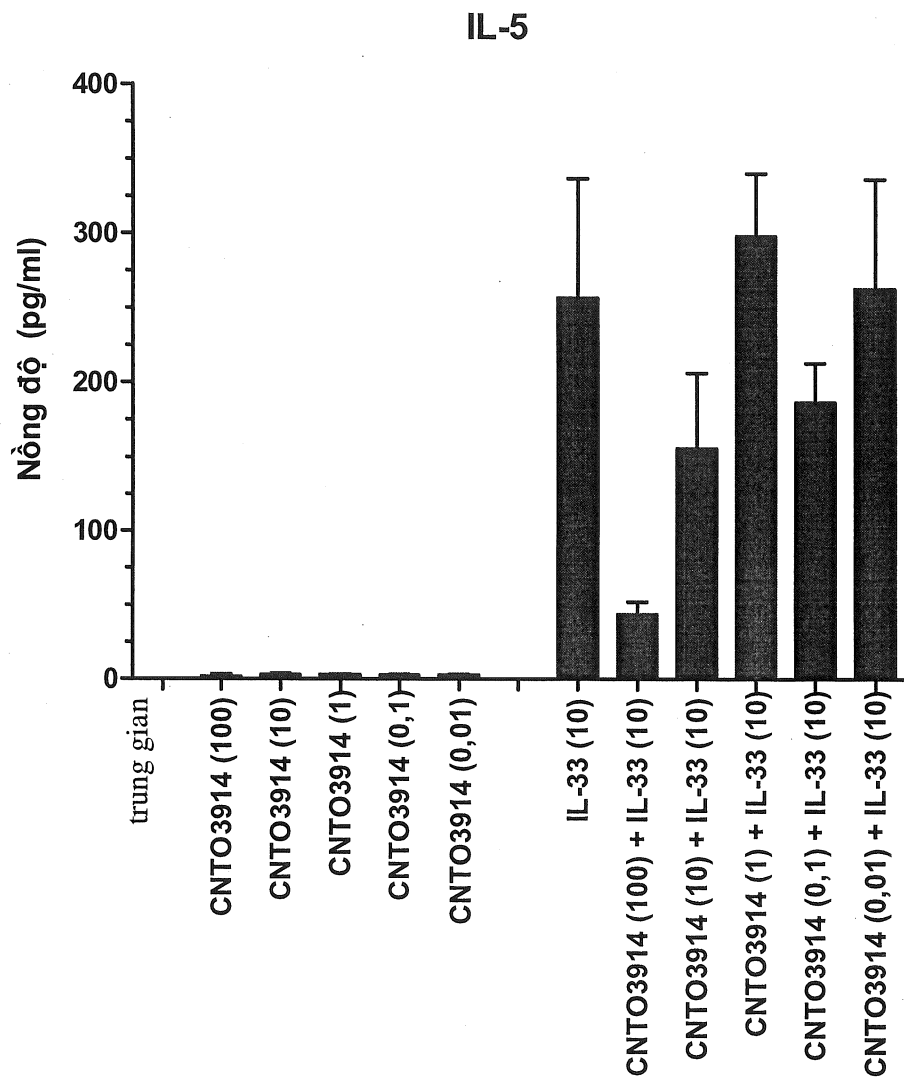


Fig 4c

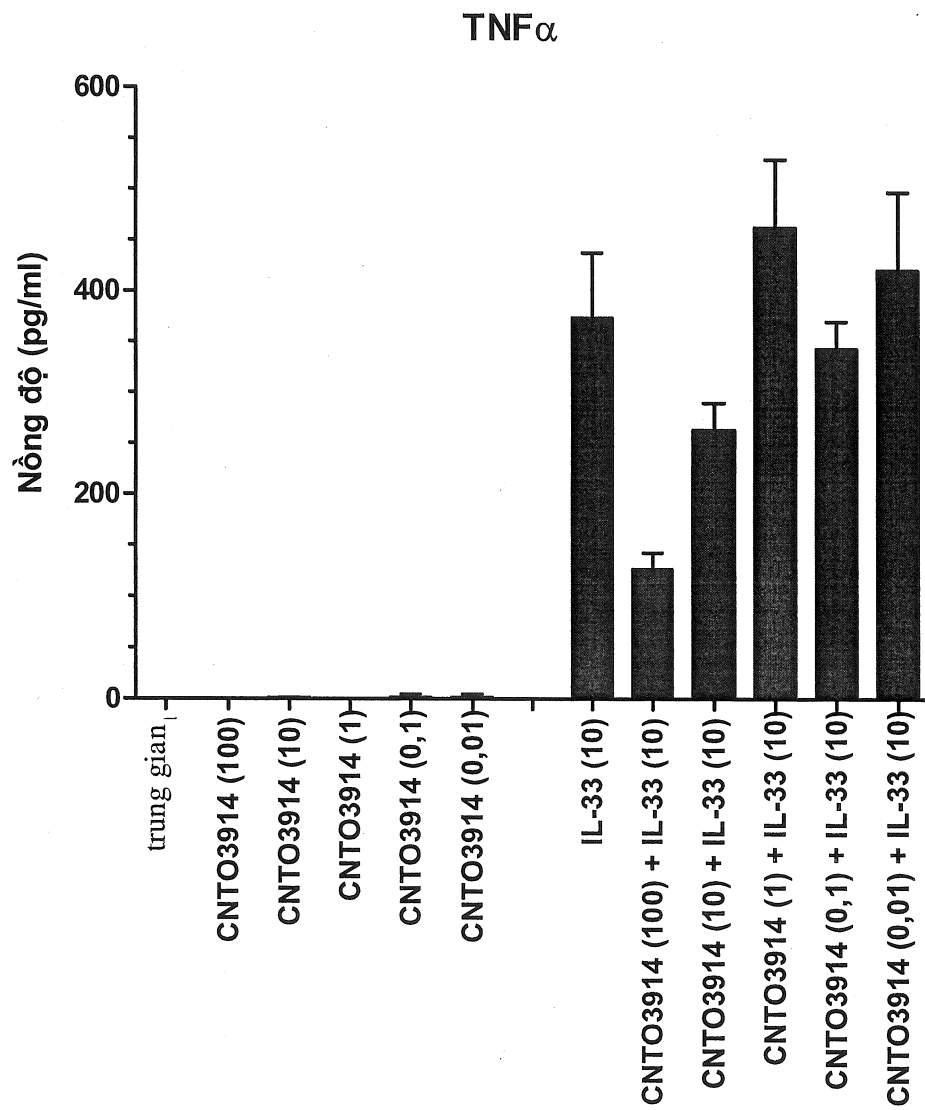
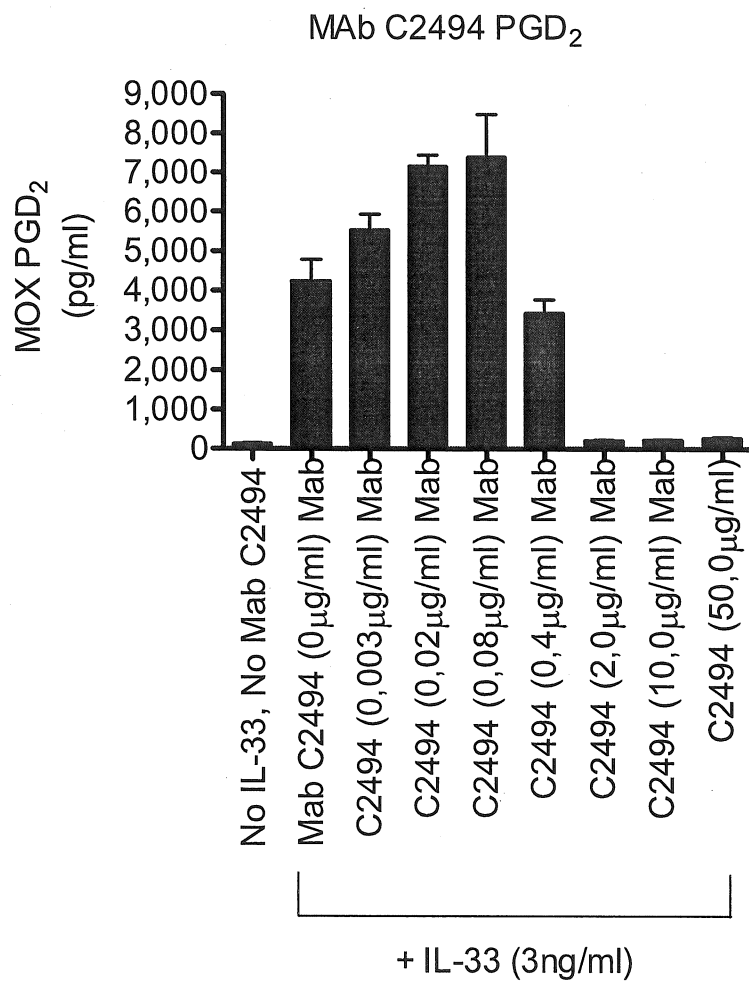


Fig 5



từ Fig 6A đến Fig 6E

Fig. 6A

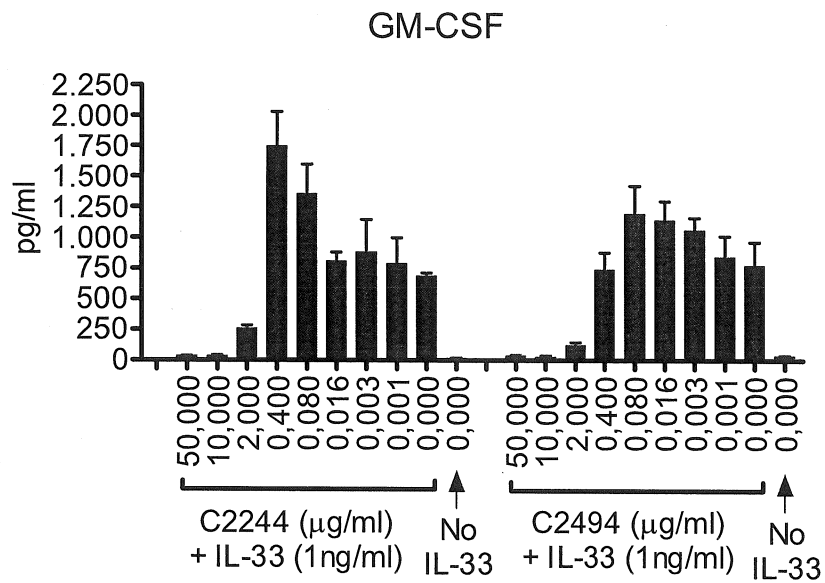


Fig 6B

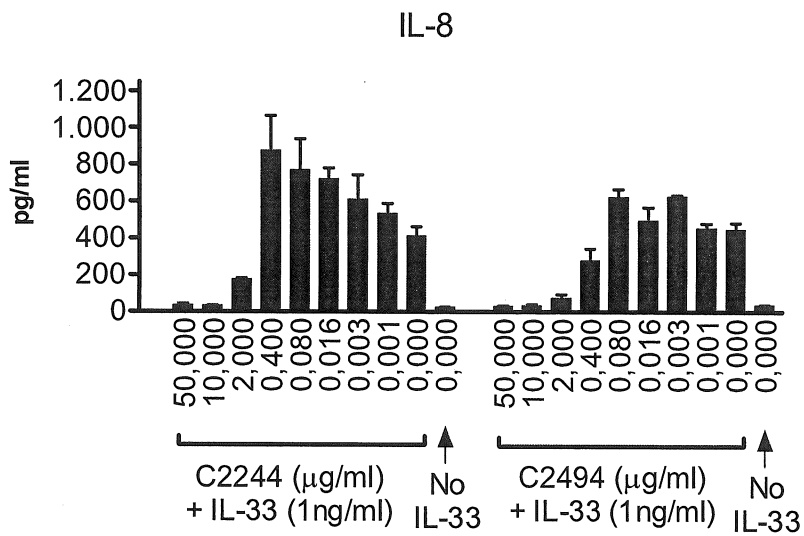


Fig 6C

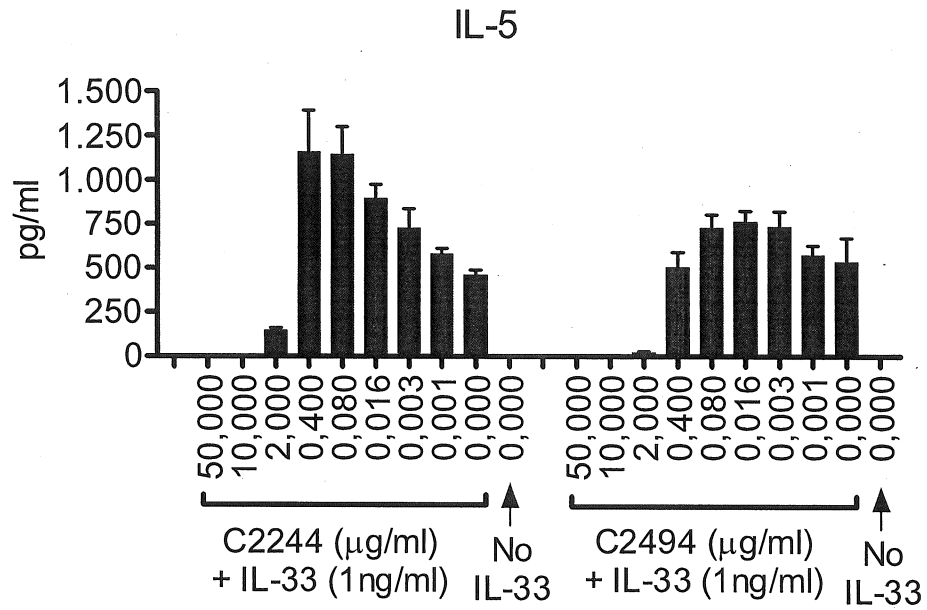


Fig 6D

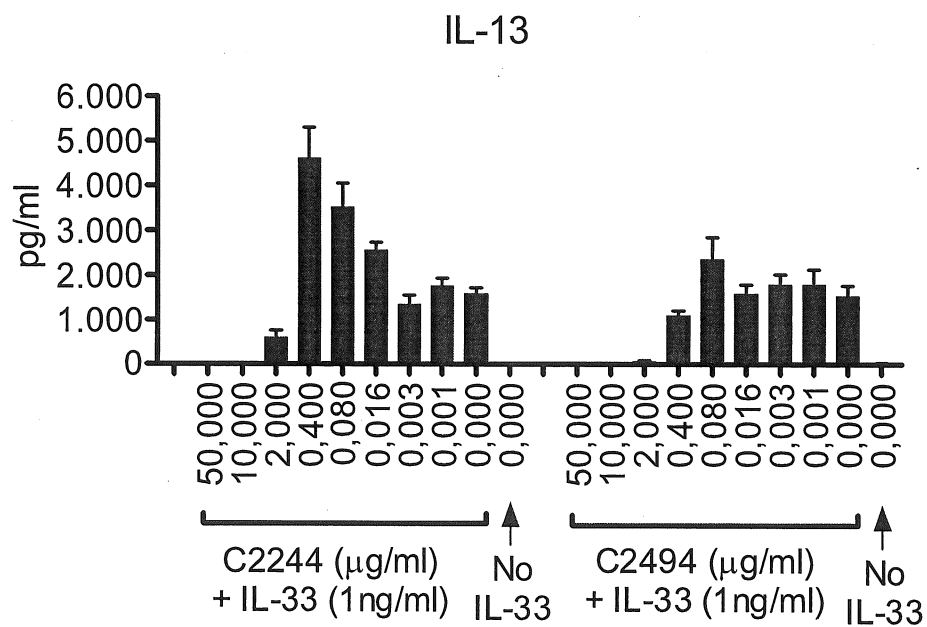
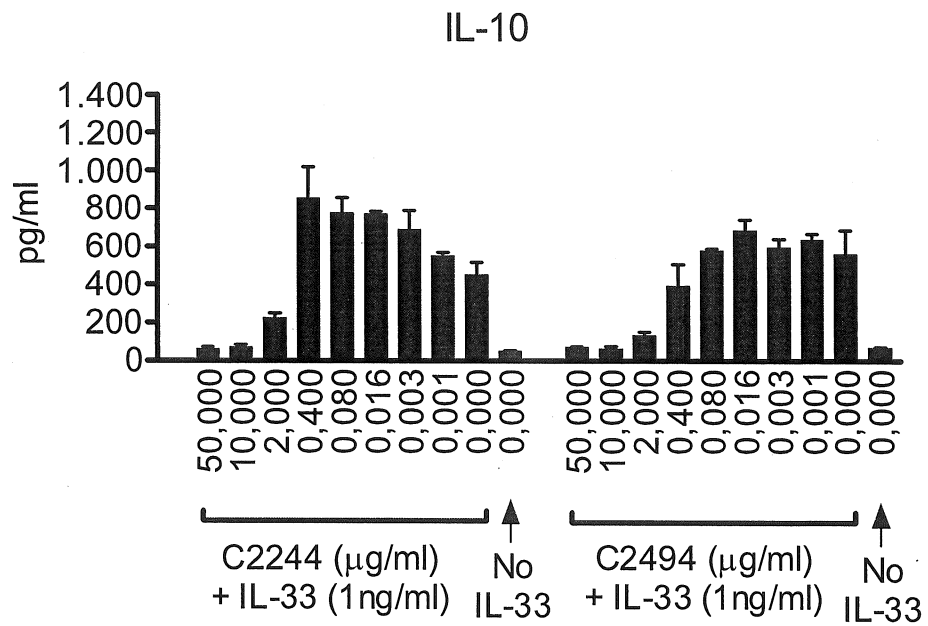


Fig 6E



từ Fig 7A đến Fig 7E

Fig 7A

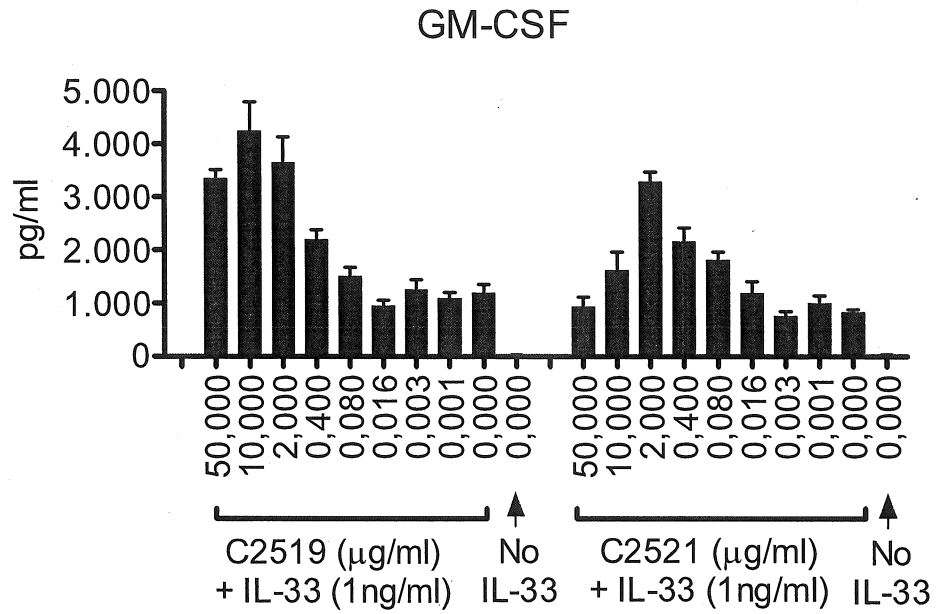


Fig 7B

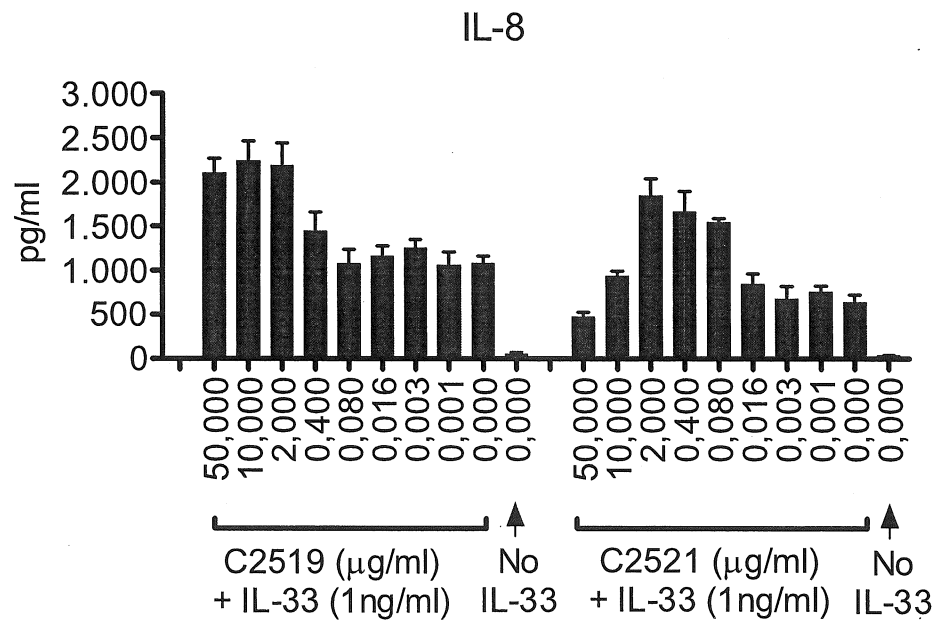


Fig 7C

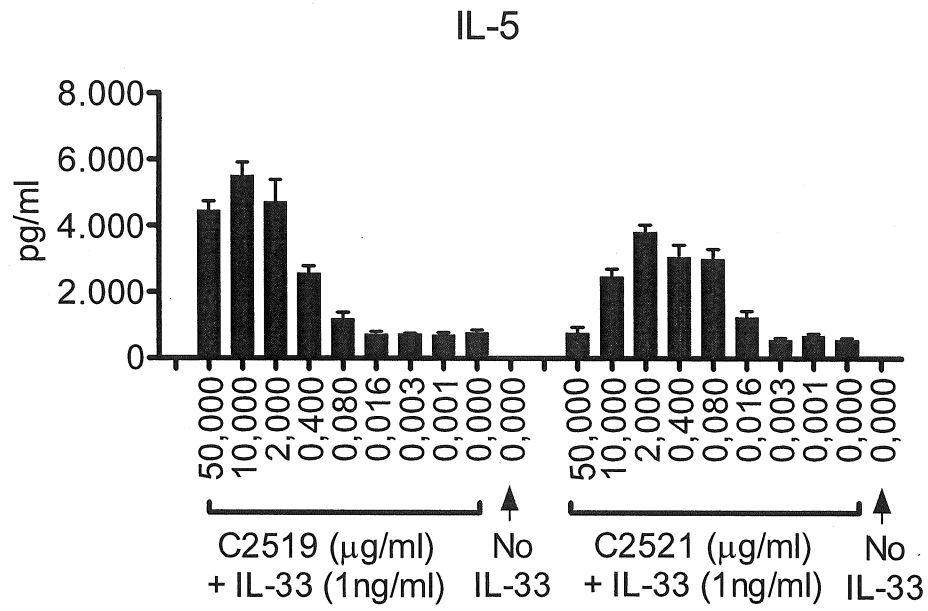


Fig 7D

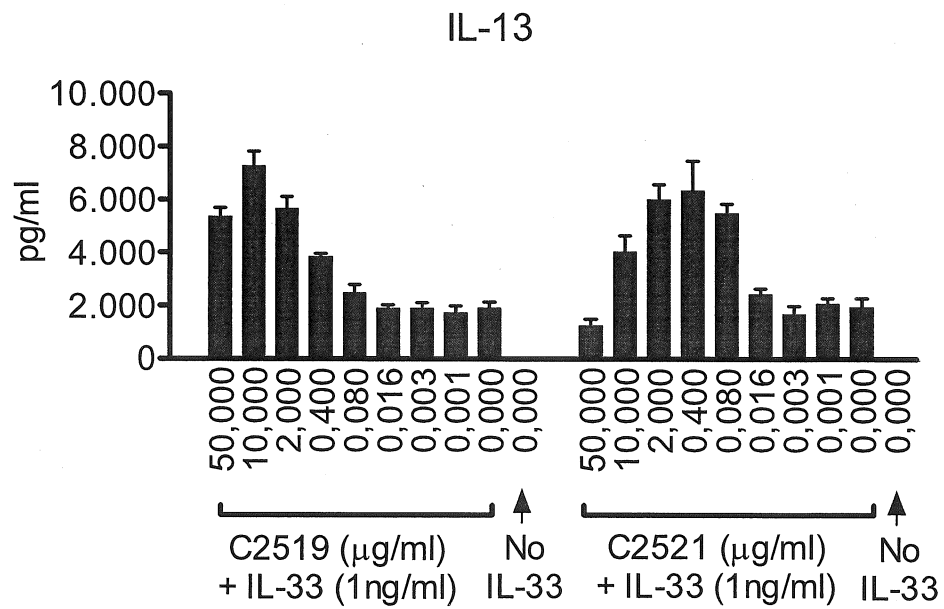


Fig 7E

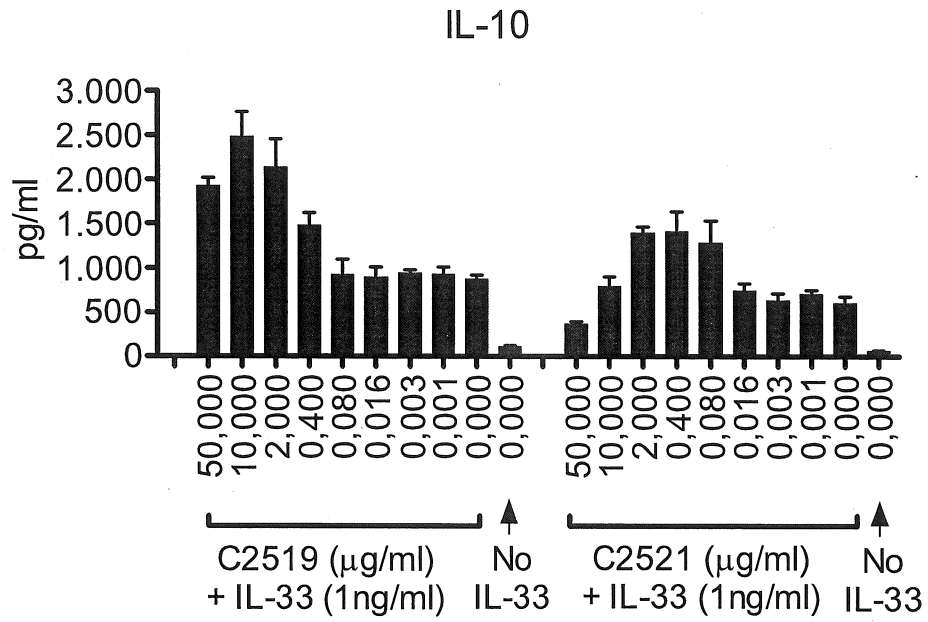


Fig 8A

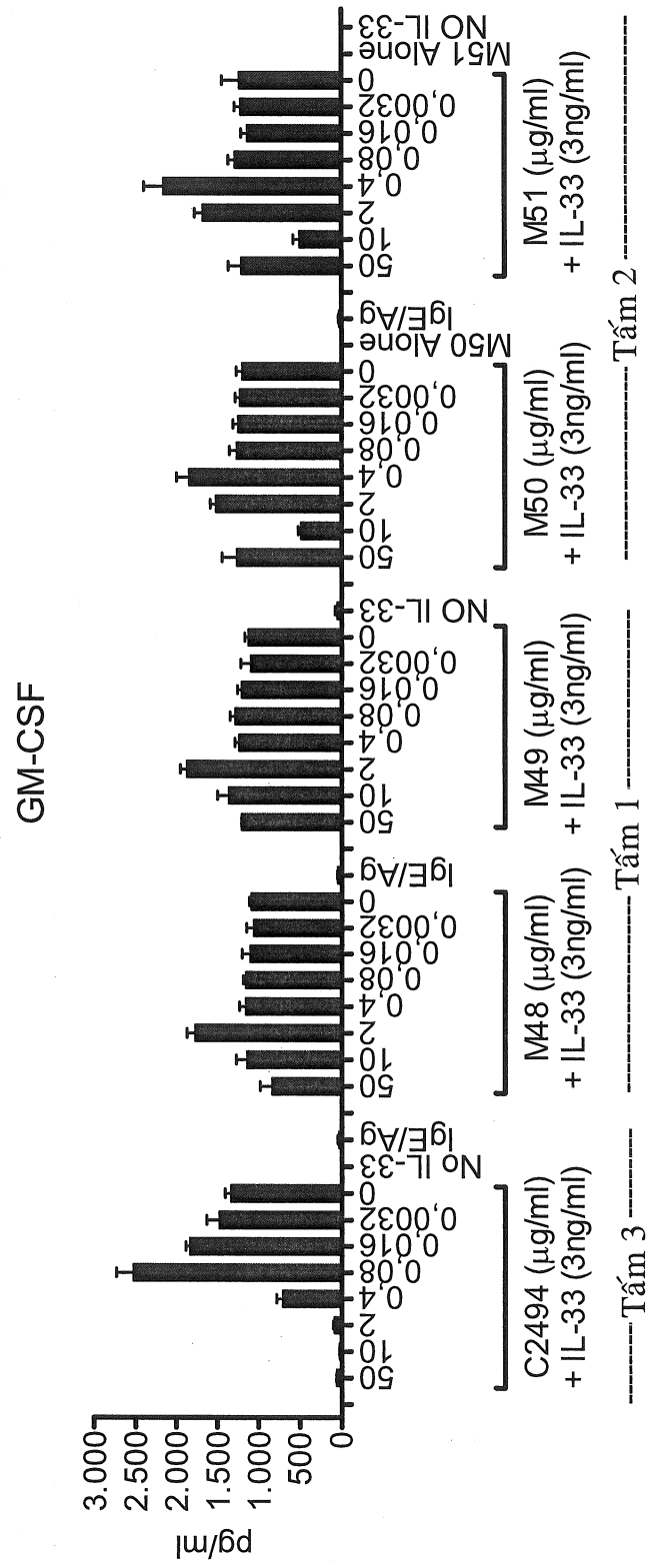


Fig 8B

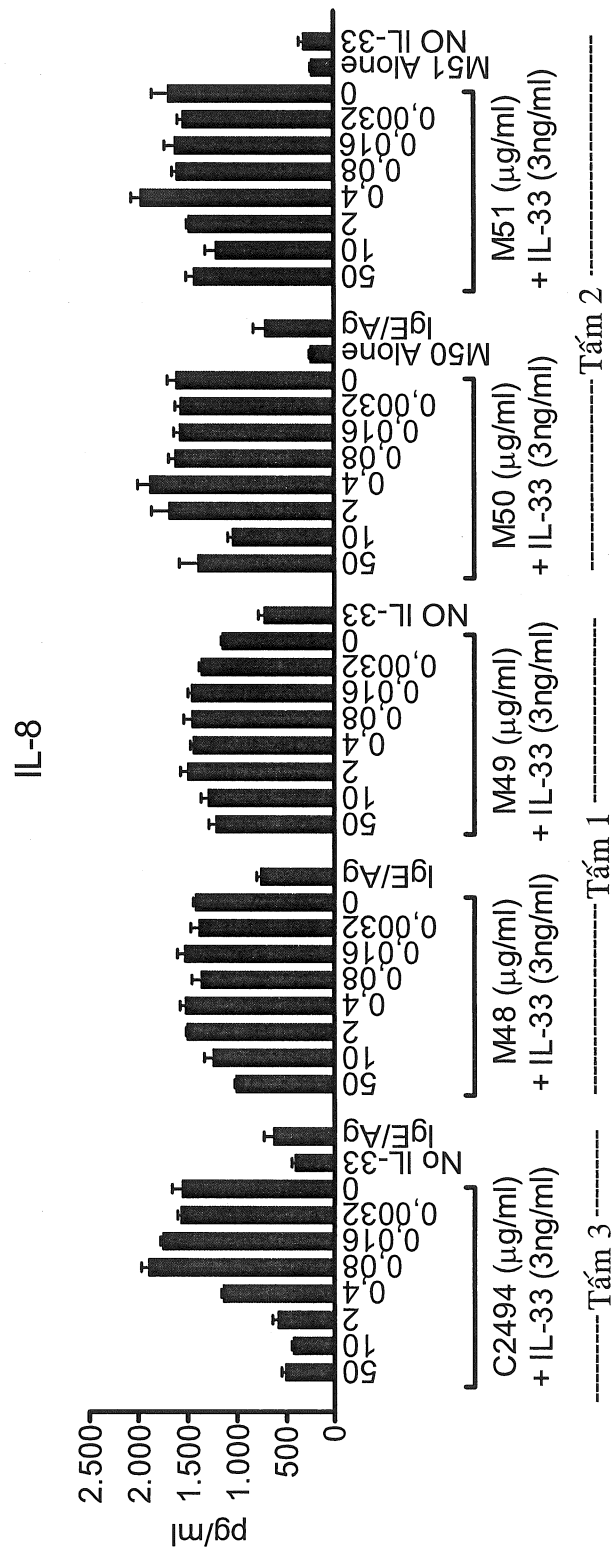


Fig 8C

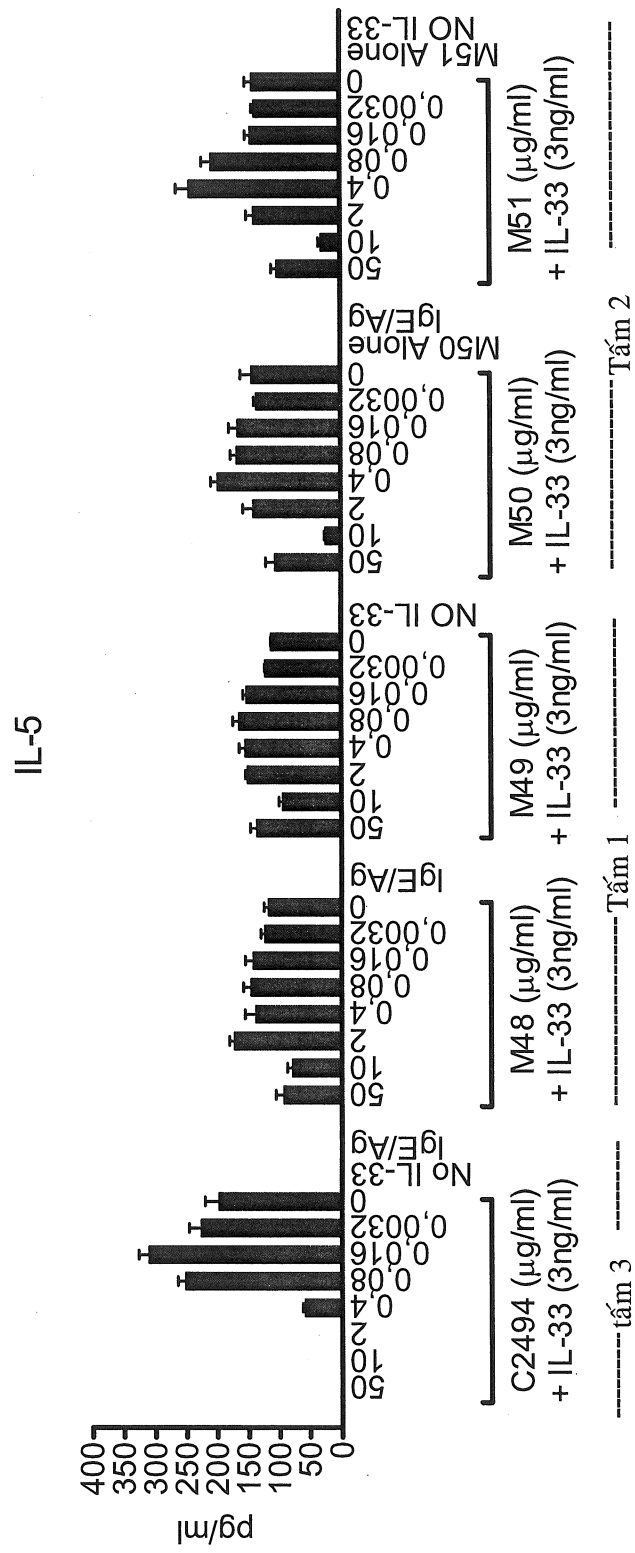


Fig 8D

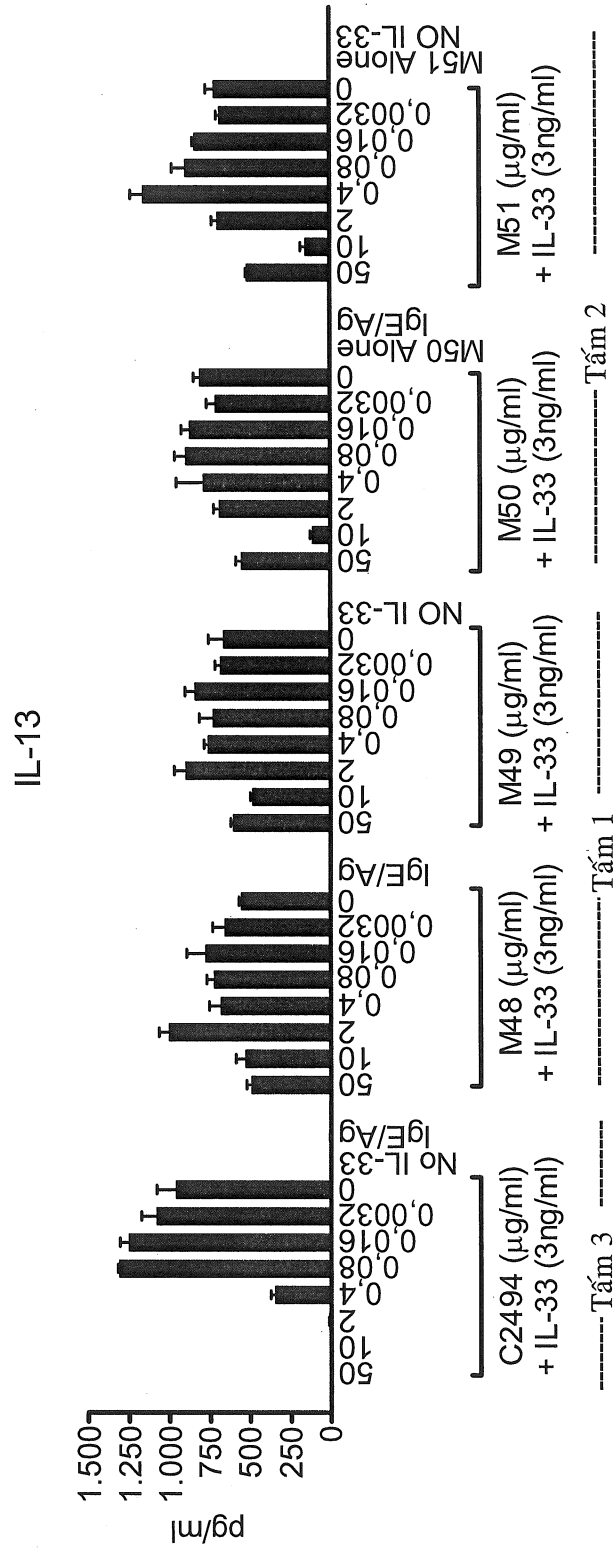


Fig 8E

IL-10

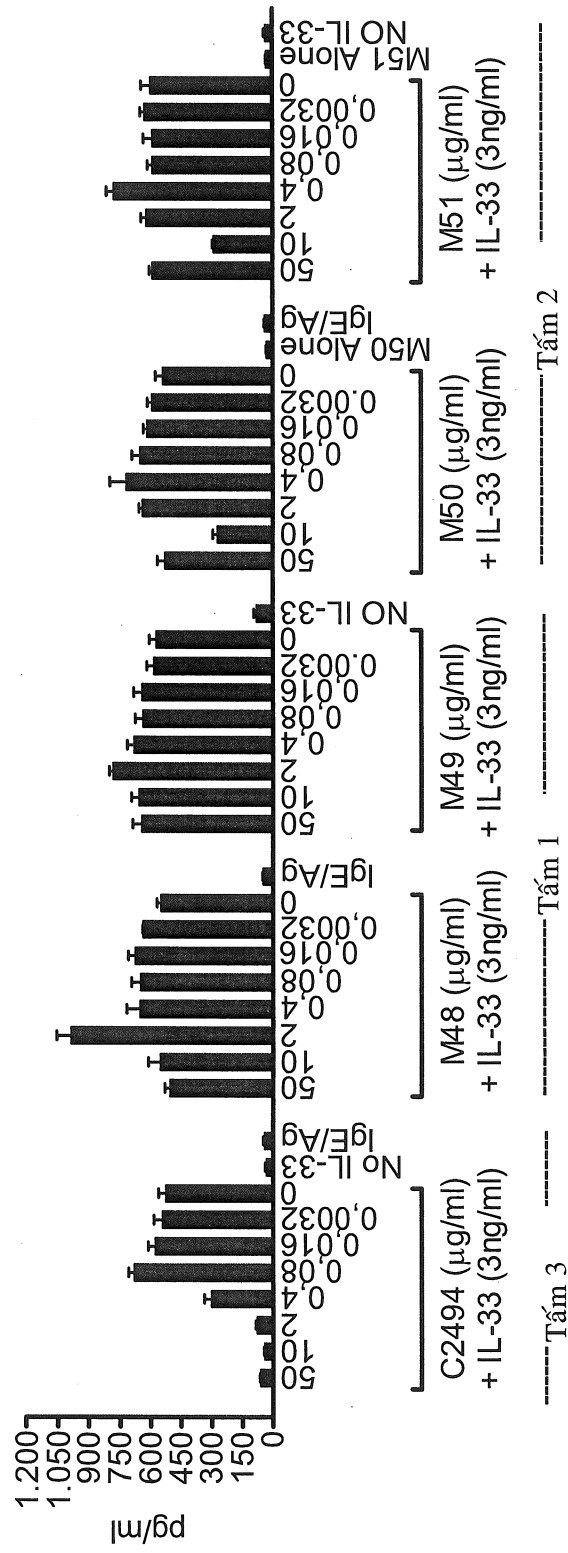


Fig 9

Kích thích với 1ng/ml IL-33 trong môi trường StemPro-34 +
:100ng/ml SCF

ST2L Domain*	Mab	% ức chế trung bình bằng 50µg/ml Mab					% ức chế trung bình bằng 2µg/ml Mab				
		GM-CSF	IL-5	IL-8	IL-10	IL-13	GM-CSF	IL-5	IL-8	IL-10	IL-13
D1	C2244	95,3	99,4	91,6	86,3	100,0	62,1	68,3	57,1	50,6	62,5
D1	C2494	95,3	99,4	93,5	87,3	100,0	84,1	96,2	83,0	76,1	95,8
D3	C2519	-179,9	-481,5	-95,5	-120,6	-180,0	-205,3	-516,3	-103,3	-144,5	-195,6
D3	C2521	-12,2	-39,4	25,5	38,8	36,0	-295,3	-594,4	-190,0	-130,6	-207,8

Kích thích với 3ng/ml IL-33 trong RPMI/10% FCS +100ng/ml SCF

vùng * ST2L	Mab	% sự ức chế trung bình bằng 50 µg/ml Mab					% sự ức chế trung bình bằng 2 µg/ml Mab				
		GM-CSF	IL-5	IL-8	IL-10	IL-13	GM-CSF	IL-5	IL-8	IL-10	IL-13
D1	C2494	95,0	99,4	67,0	87,8	99,3	92,9	99,6	62,2	84,7	98,8
D3	ST2M48	23,2	20,7	28,7	8,3	11,0	-61,6	-46,1	-5,8	-79,1	-80,8
D3	ST2M49	-7,0	-20,9	-5,7	-12,4	9,3	-65,4	-33,1	-30,0	-36,8	-35,7
D3	ST2M50	-5,7	25,7	13,2	2,0	31,9	-26,0	1,6	-4,4	-18,7	14,9
D3	ST2M51	1,9	27,3	15,0	1,3	28,6	-35,3	1,2	11,8	-3,6	3,0

*Kháng thể miễn ST2L liên kết đến

Fig 10

tên mAb/ Fab	VH name	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		trình tự	SEQ ID NO:	trình tự	SEQ ID NO:	trình tự	SEQ ID NO:
ST2F6	ST2H41	SYAMS	78	AISGGGTYADSVKG	81	DPWSTEGSFFVLDY	84
ST2F14	ST2H41	SYAMS	78	AISGGGTYADSVKG	81	DPWSTEGSFFVLDY	84
ST2F17	ST2H41	SYAMS	78	AISGGGTYADSVKG	81	DPWSTEGSFFVLDY	84
ST2F31	ST2H41	SYAMS	78	AISGGGTYADSVKG	81	DPWSTEGSFFVLDY	84
ST2F41	ST2H41	SYAMS	78	AISGGGTYADSVKG	81	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM103	ST2H112	FYDMF	95	SIRGEGGRTDYADSVKG	109	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM107	ST2H52	DYAMF	96	AIEGEGGETNYADSVKG	110	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM108	ST2H50	IYDMI	97	TIKGGGGTYADSVKG	111	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM123	ST2H52	DYAMF	96	AIEGEGGETNYADSVKG	110	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM124	ST2H50	IYDMI	97	TIKGGGGTYADSVKG	111	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM206	ST2H232	IYDMI	97	TIRGEGGTYADSVKG	112	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM207	ST2H228	SYDMI	98	TIRGEGGTAYADSVKG	113	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM208	ST2H257	IYDMI	97	SIRGEGGTYADSVKG	114	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM209	ST2H231	IYDMI	97	TIRGEGGTSYADSVKG	115	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM210	ST2H318	DDAMI	99	YIGNGGTTYADSVKG	116	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM211	ST2H316	GYAMI	100	YIEGEGTTYADSVKG	117	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM212	ST2H314	VYDMI	101	TIRGEGGTYADSVKG	118	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM213	ST2H202	FYDMI	102	TIRGEGGDTNYADSVKG	120	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM214	ST2H179	SYDMF	103	DIKGGGRTAYADSVKG	121	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM215	ST2H172	SYDMF	103	AIAGGGRTYADSVKG	122	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM216	ST2H173	SYDMF	103	DIKGGGATNYADSVKG	123	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM217	ST2H163	VYDMF	104	DIKGGGETSYADSVKG	124	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM218	ST2H162	VDSMF	105	SIEGNGGATYADSVKG	125	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM219	ST2H139	GYDMF	106	DIGGEGGTYADSVKG	126	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM220	ST2H137	FYDMF	95	DIRGEGGTYADSVKG	127	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM221	ST2H136	IYDMF	107	YIRGEGGDTNYADSVKG	128	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM222	ST2H129	IYSMF	108	DIGGEGGTSYADSVKG	129	DPWSTEGSFFVLDY	84

Fig 11

tên mAb/ Fab	Tên VL	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		trình tự	SEQ ID NO:	trình tự	SEQ ID NO:	trình tự	SEQ ID NO:
ST2F6	ST2L24	RASQSVDDALA	87	DASNRAT	90	QQFYNWPLT	92
ST2F14	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
ST2F17	ST2L35	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIDAPLT	132
ST2F31	ST2L49	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYNDAIT	133
ST2F41	ST2L59	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYITAPLT	134
STLM103	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM107	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM108	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM123	ST2L59	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYITAPLT	134
STLM124	ST2L59	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYITAPLT	134
STLM206	ST2L59	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYITAPLT	134
STLM207	ST2L59	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYITAPLT	134
STLM208	ST2L59	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYITAPLT	134
STLM209	ST2L59	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYITAPLT	134
STLM210	ST2L49	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYNDAIT	133
STLM211	ST2L49	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYNDAIT	133
STLM212	ST2L49	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYNDAIT	133
STLM213	ST2L35	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIDAPLT	132
STLM214	ST2L35	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIDAPLT	132
STLM215	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM216	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM217	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM218	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM219	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM220	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM221	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131
STLM222	ST2L32	RASQSVDDDLA	130	DASNRAT	90	QQYIGAPIT	131

Fig 12

tên mAb	tên VH	tên VL	H-CDR1		H-CDR2		H-CDR3	
			trình tự	SEQ ID NO:	trình tự	SEQ ID NO:	trình tự	SEQ ID NO:
STLM208	STLH257	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	DPWSTEGSFFVLDY	84
STLM352	STLH255	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	APWSTEGSFFVLDY	165
STLM351	STLH256	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	RPWSTEGSFFVLDY	166
STLM350	STLH257	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	NPWSTEGSFFVLDY	167
STLM349	STLH258	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	QPWSTEGSFFVLDY	168
STLM348	STLH259	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	EPWSTEGSFFVLDY	169
STLM347	STLH260	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	IPWSTEGSFFVLDY	170
STLM346	STLH261	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	HPWSTEGSFFVLDY	171
STLM345	STLH262	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	SPWSTEGSFFVLDY	172
STLM344	STLH263	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	TPWSTEGSFFVLDY	173
STLM343	STLH264	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	YPWSTEGSFFVLDY	174
STLM342	STLH265	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	DAWSTEGSFFVLDY	175
STLM341	STLH266	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	DHWSTEGSFFVLDY	176
STLM340	STLH267	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	DYWSTEGSFFVLDY	177
STLM339	STLH268	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	DEWSTEGSFFVLDY	178
STLM338	STLH269	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	DQWSTEGSFFVLDY	179
STLM337	STLH270	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	DLWSTEGSFFVLDY	180
STLM336	STLH271	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	DSWSTEGSFFVLDY	181
STLM335	STLH272	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	DNWSTEGSFFVLDY	182
STLM334	STLH273	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	DTWSTEGSFFVLDY	183
STLM333	STLH274	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	DVWSTEGSFFVLDY	184
STLM332	STLH275	ST2L59	IYDMI	97	SIRGEGGGTYADSVKG	114	DIWSTEGSFFVLDY	185

Fig 13A

mAb	VH ID	trình tự	SEQ ID NO:
STLM103	ST2H112	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSSIRGEGGRTDYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	205
STLM107	ST2H52	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSAIEGEGGETNYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	186
STLM108	ST2H50	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSTIKGEGGGTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	187
STLM123	ST2H52	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSAIEGEGGETNYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	186
STLM124	ST2H50	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSTIKGEGGGTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	187
STLM206	ST2H232	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSTIRGEGGGTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	192
STLM207	ST2H228	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSTIRGEGGGTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	194
STLM208	ST2H257	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSTIRGEGGGTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	191
STLM209	ST2H231	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSTIRGEGGGTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	193
STLM210	ST2H318	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSYIGGNGGTTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	188
STLM211	ST2H316	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSYIEGEGGGTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	189
STLM212	ST2H314	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSTIRGEGGGTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	190
STLM213	ST2H202	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSTIRGEGGDTNYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	195
STLM214	ST2H179	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSDIKGEGGRTAYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	196
STLM215	ST2H172	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSAIAGEGGRTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	198
STLM216	ST2H173	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSDIKGEGGATNYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	197
STLM217	ST2H163	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSDIKGEGGETSYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	199
STLM218	ST2H162	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSYIEGNGGATYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	200
STLM219	ST2H139	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSDIGEGGGTNYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	201
STLM220	ST2H137	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSDIRGEGGGTAYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	202
STLM221	ST2H136	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSYIRGEGGDTNYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	203
STLM222	ST2H129	EVQLLES GGG LVQ PGGSLRLSCAASGFTFSFYDMFWVRQAPGKGLEWVSDIGEGGGTNYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPWSTEGSFFVLDYWGQGT LVT VSS	204

Fig 13B

mAb	VH ID	trình tự	SEQ ID NO:
STLM103	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM107	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM108	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM123	ST2L59	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYITAPLTFGQGTKVEIK	209
STLM124	ST2L59	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYITAPLTFGQGTKVEIK	209
STLM206	ST2L59	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYITAPLTFGQGTKVEIK	209
STLM207	ST2L59	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYITAPLTFGQGTKVEIK	209
STLM208	ST2L59	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYITAPLTFGQGTKVEIK	209
STLM209	ST2L59	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYITAPLTFGQGTKVEIK	209
STLM210	ST2L49	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYNDAITFGQGTKVEIK	208
STLM211	ST2L49	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYNDAITFGQGTKVEIK	208
STLM212	ST2L49	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYNDAITFGQGTKVEIK	208
STLM213	ST2L35	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIDAPLTFGQGTKVEIK	207
STLM214	ST2L35	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIDAPLTFGQGTKVEIK	207
STLM215	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM216	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM217	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM218	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM219	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM220	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM221	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206
STLM222	ST2L32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDDLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYIGAPITFGQGTKVEIK	206

Fig 15

mAb	VL ID	VH ID	VL SEQ ID NO:	VH SEQ ID NO:	H-CDR1		H-CDR2		H-CDR3	
					trình tự	SEQ ID NO:	trình tự	SEQ ID NO:	trình tự	SEQ ID NO:
STLM226	STLL280	STLH201	142	145	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAEKFQG	28	GDFYAMAY	146
STLM227	STLL277	STLH201	140	145	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAEKFQG	28	GDFYAMAY	146
STLM228	STLL276	STLH201	139	145	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAEKFQG	28	GDFYAMAY	146
STLM229	STLL275	STLH201	138	145	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAEKFQG	28	GDFYAMAY	146
STLM230	STLL274	STLH201	137	145	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAEKFQG	28	GDFYAMAY	146
STLM231	STLL273	STLH201	136	145	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAEKFQG	28	GDFYAMAY	146
STLM232	STLL272	STLH201	135	145	DDYMH	24	RIDPAIGNTEYAEKFQG	28	GDFYAMAY	146

mAb	VL ID	VH ID	VL SEQ ID NO:	VH SEQ ID NO:	L-CDR1		L-CDR2		L-CDR3	
					trình tự	SEQ ID NO:	trình tự	SEQ ID NO:	trình tự	SEQ ID NO:
STLM226	STLL280	STLH201	142	145	ITNTDIDDVH	36	EGNTLRP	40	LQSDNMLT	147
STLM227	STLL277	STLH201	140	145	ITNTDIDDVH	36	EGNTLRP	40	LQSDNMLT	44
STLM228	STLL276	STLH201	139	145	ITNTDIDDVH	36	EGNTLRP	40	LQSDNMLT	44
STLM229	STLL275	STLH201	138	145	ITNTDIDDVH	36	EGNTLRP	40	LQSDNMLT	44
STLM230	STLL274	STLH201	137	145	ITNTDIDDVH	36	EGNTLRP	40	LQSDNMLT	44
STLM231	STLL273	STLH201	136	145	ITNTDIDDVH	36	EGNTLRP	40	LQSDNMLT	44
STLM232	STLL272	STLH201	135	145	ITNTDIDDVH	36	EGNTLRP	40	LQSDNMLT	44

Fig 16A

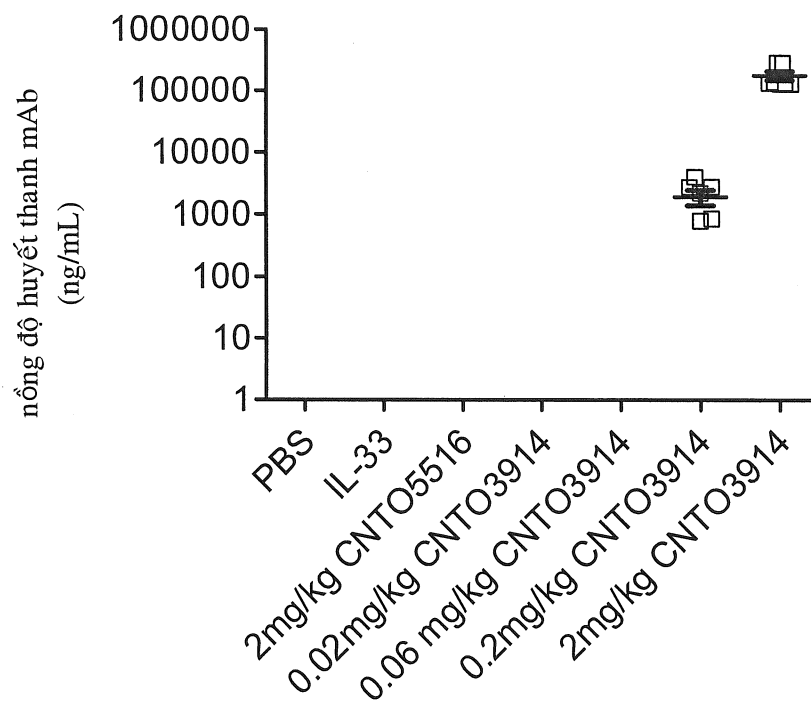


Fig 16B

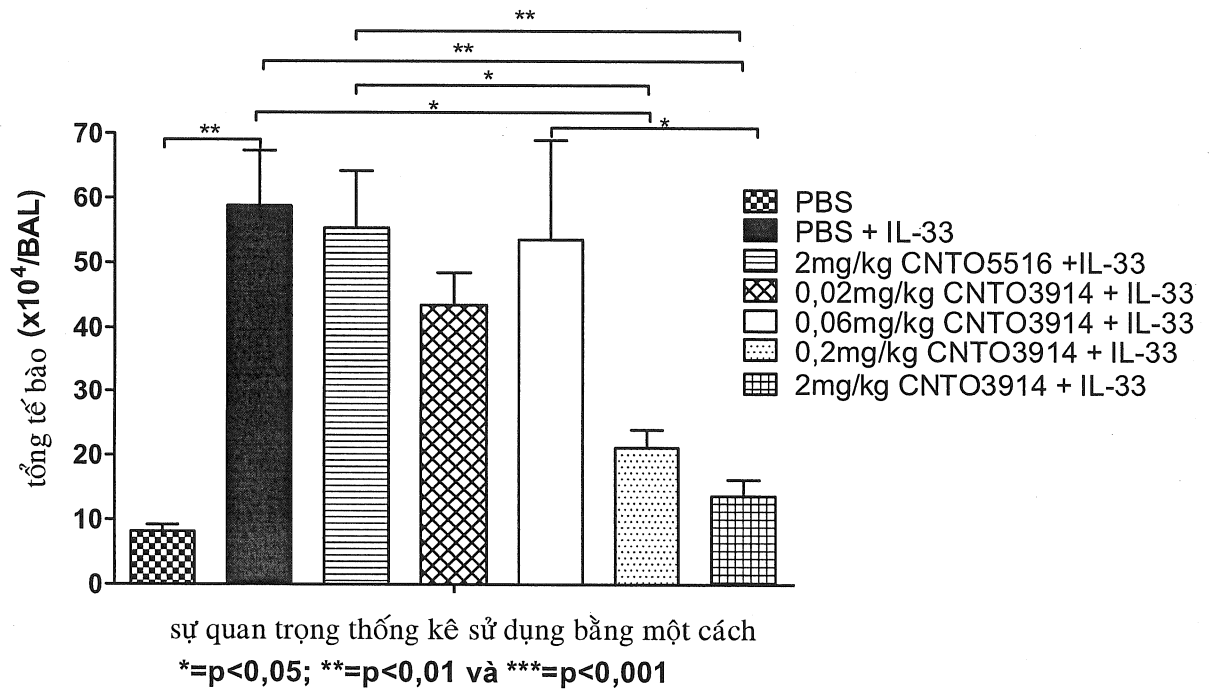
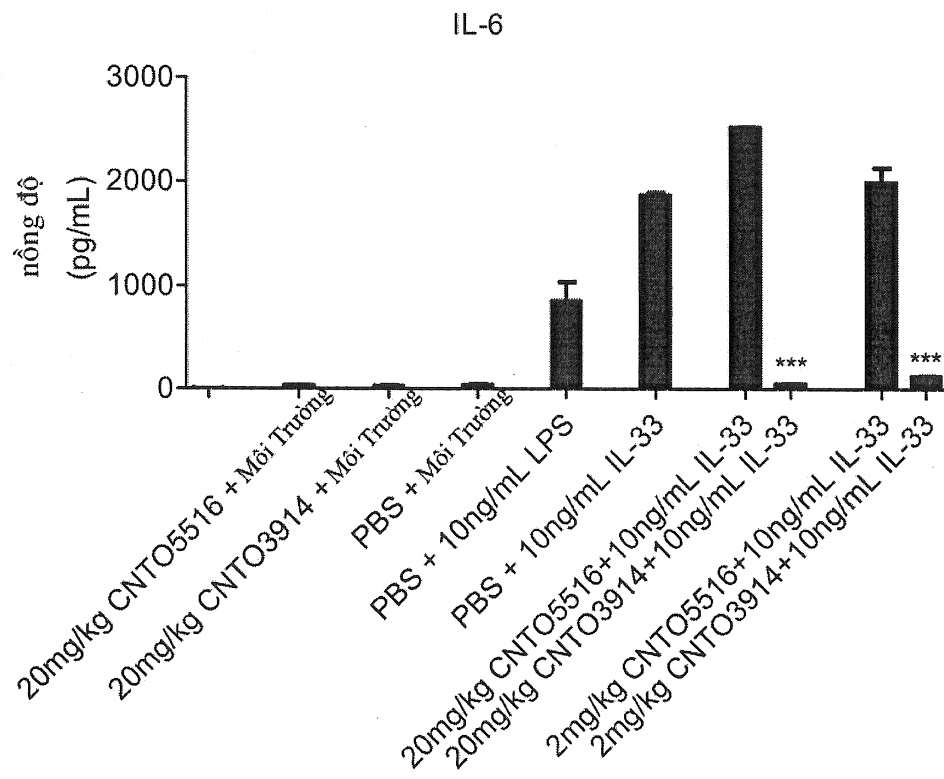
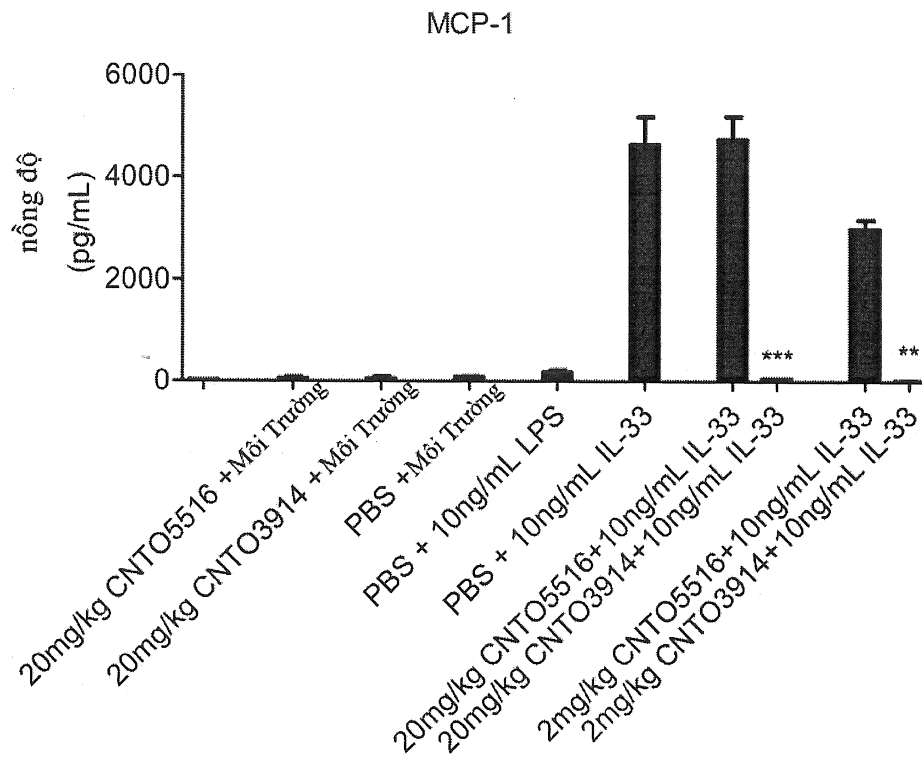


Fig 16C



sự quan trọng của MAb so với chứng isotyp ở cùng nồng độ

Fig 16D



sự quan trọng của mAb so với đối chứng isotyp ở cùng nồng độ

Fig 17A

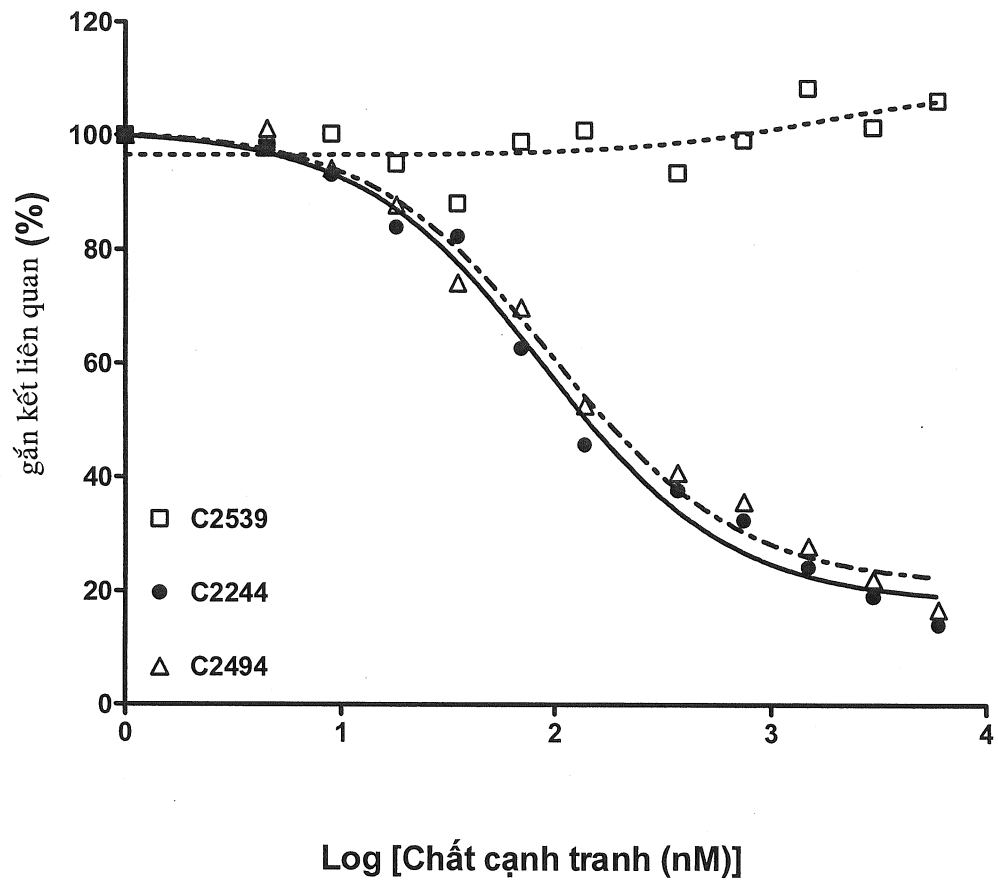


Fig 17B

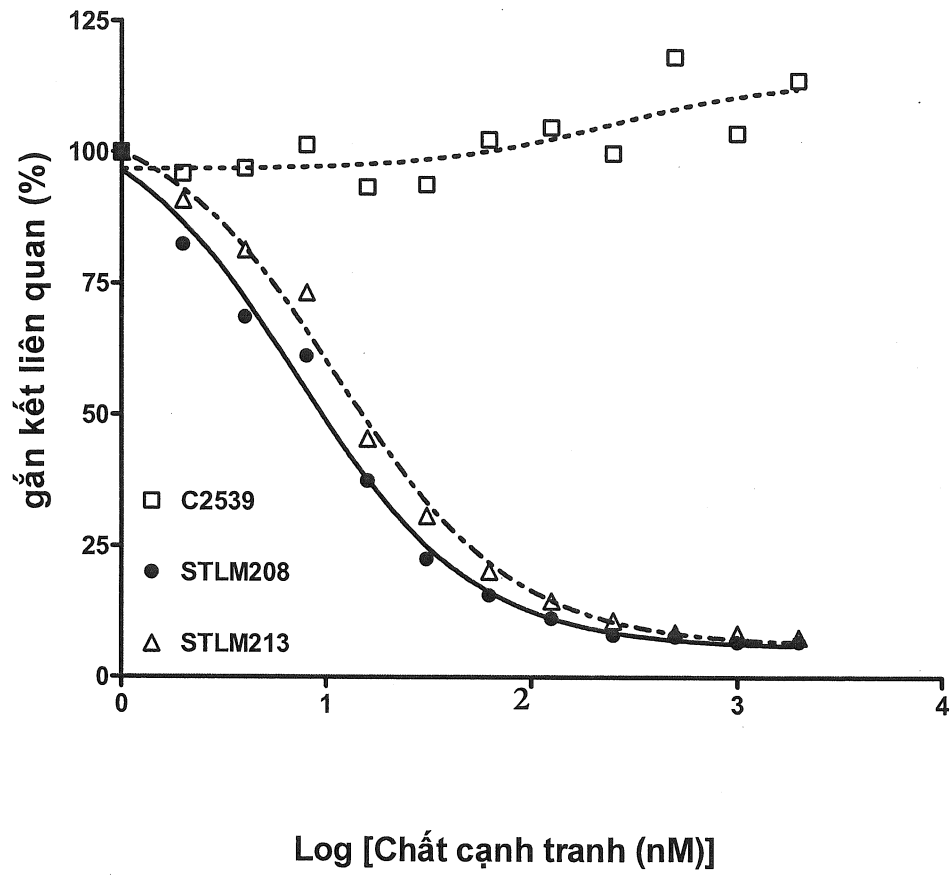


Fig 18

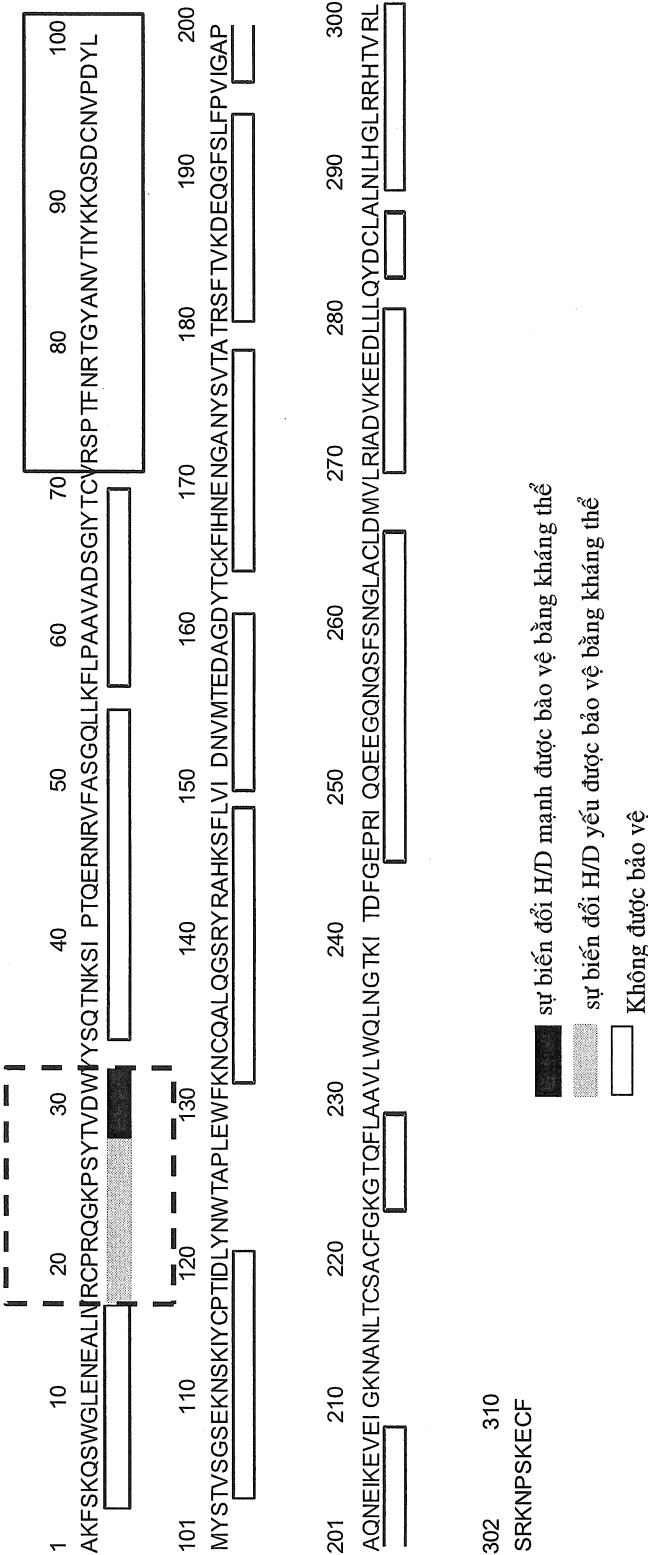


Fig 19

biến thể ST2L	kháng thể									
	STLB206 (STLM208)					STLB252				
	ka	kd	K _D	ka	kd	1/Ms	1/s	K _D	ka	K _D
	1/Ms	1/s	pM	1/Ms	1/s	1/Ms	1/s	pM	1/s	pM
kiểu hoang dã	1,14E+07	1,22E-04	10,8	8,85E+06	1,22E-04	13,8				
₁₈ AKF ₂₀ -->TEG	1,30E+07	2,29E-04	19,3	8,34E+06	1,93E-04	23,2				
K ₅₅ E	1,26E+07	1,29E-04	10	1,07E+07	1,26E-04	11,8				
E ₆₁ K	1,55E+07	1,26E-04	8,1	1,56E+07	1,21E-04	7,8				
₆₉ GQL ₇₁ -->RDR	1,02E+07	9,27E-05	9,6	8,06E+06	9,36E-05	11,6				
A ₇₈ R	1,24E+07	1,30E-04	10,4	1,08E+07	1,23E-04	11,4				
A ₈₀ E	1,15E+07	1,27E-04	11	1,13E+07	1,39E-04	12,4				
₉₃ TF ₉₄ -->NL	1,27E+07	6,25E-04	49,5	1,07E+07	5,22E-04	48,9				
₁₀₈ QSD ₁₁₀ -->PPS	1,28E+07	1,19E-04	10	8,99E+06	1,17E-04	13				

Fig 20A

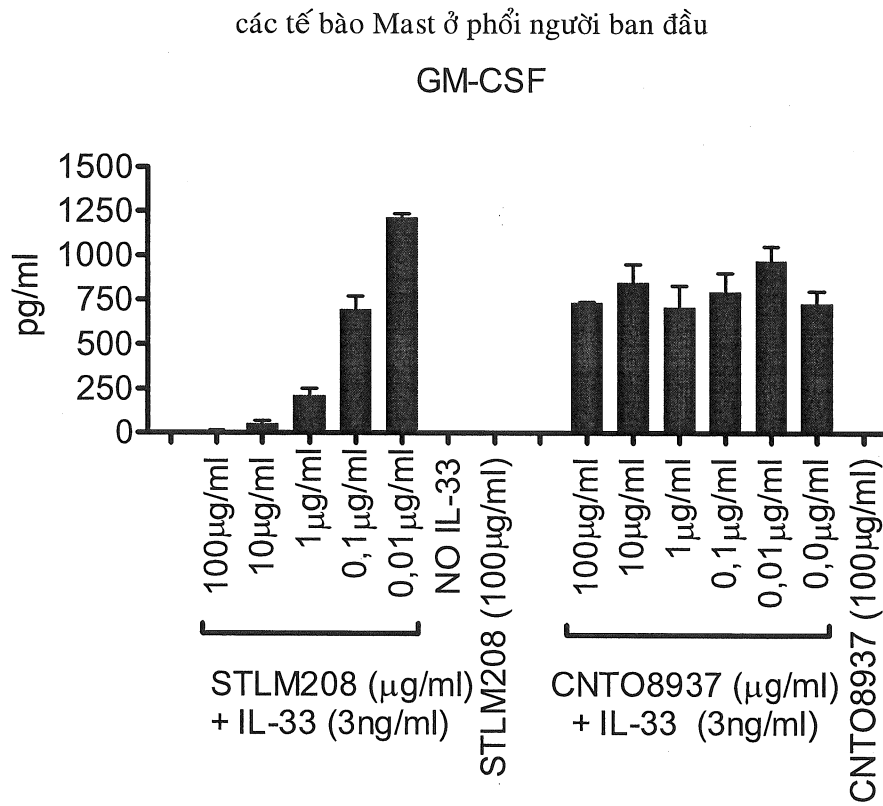


Fig 20B

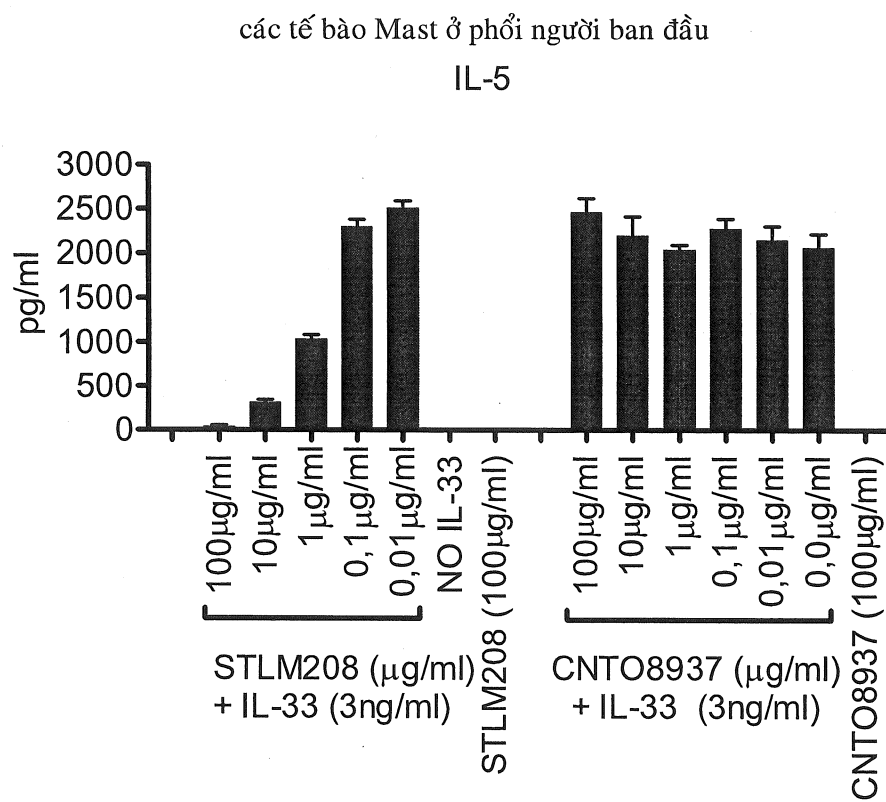


Fig 20C

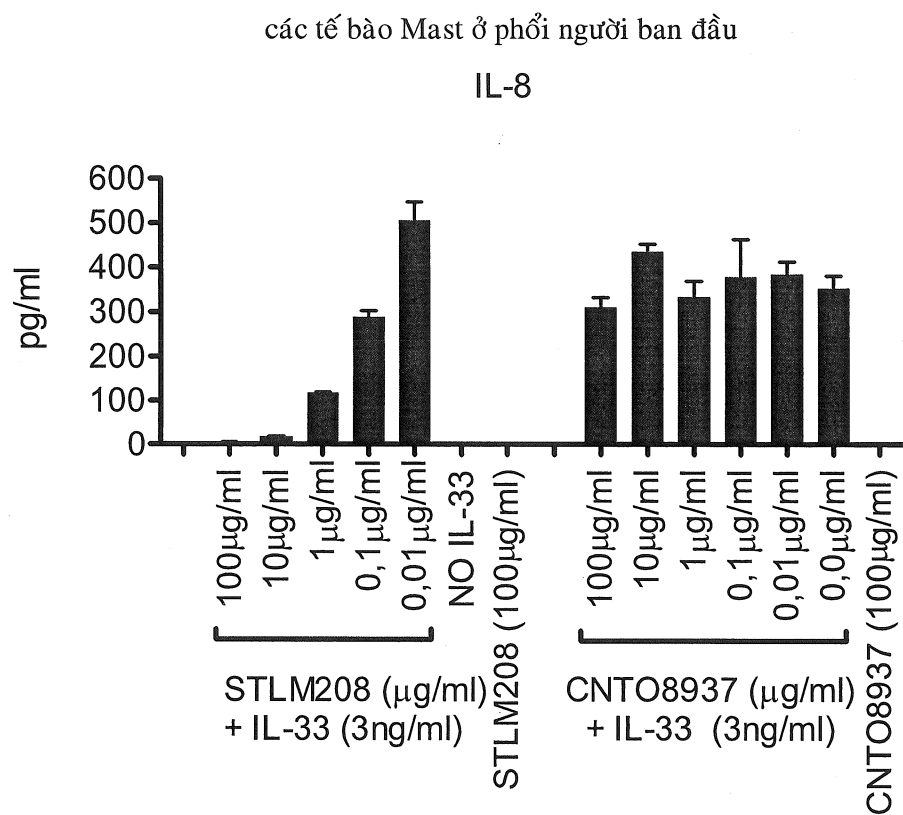
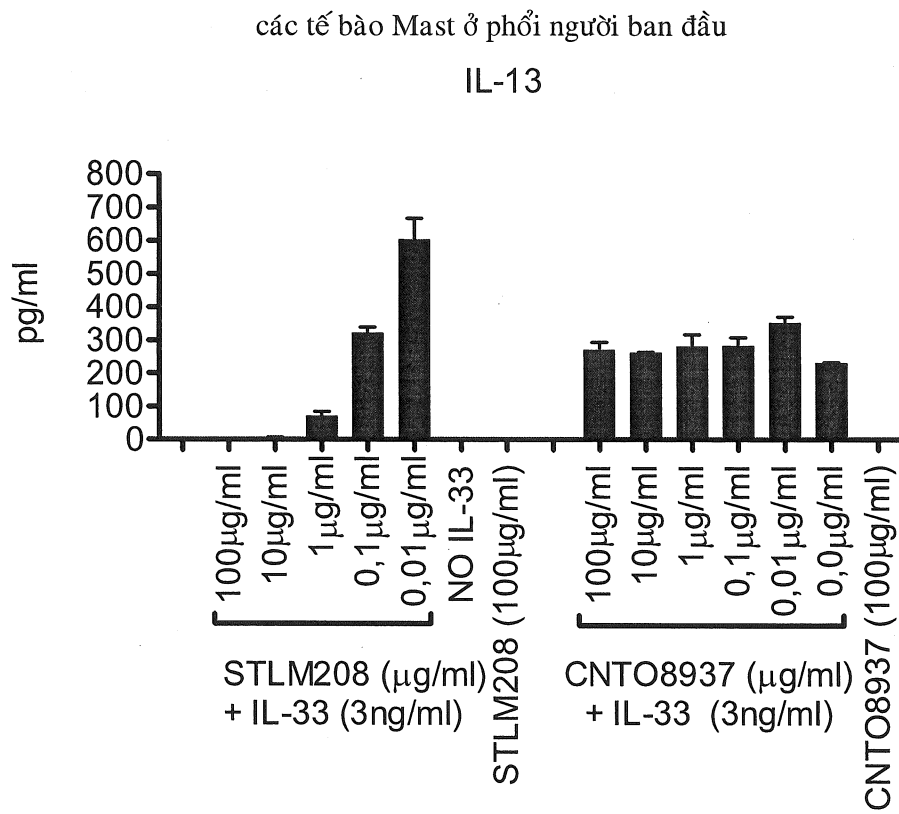


Fig 20D



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Duffy, Karen
 Fursov, Natalie
 Hall, LeRoy
 Healey, Catherine
 Lamb / Roberta
 Luo, Jinqun
 Malaviya, Ravi
 Naso, Michael
 Pratta, Michael
 Tornetta, Mark
 Wheeler, John Wu, Sheng-Jiu
- <120> Chất đối kháng kháng thể ST2L, polynucleotit được phân lập mã hoá
 chất đối kháng kháng thể và phương pháp sản xuất chất đối kháng
 kháng thể này
- <130> JBI5003WOPCT
- <150> US 61/640,407
 <151> 2012-04-30
- <150> US 61/640,238
 <151> 2012-04-30
- <150> US 13/798,204
 <151> 2013-03-13
- <150> US 13/798,226
 <151> 2013-03-13
- <160> 215
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
 <211> 556
 <212> PRT
- <213> Homo Sapiens
- <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Phe | Trp | Ile | Leu | Ala | Ile | Leu | Thr | Ile | Leu | Met | Tyr | Ser | Thr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ala | Ala | Lys | Phe | Ser | Lys | Gln | Ser | Trp | Gly | Leu | Glu | Asn | Glu | Ala | Leu |
| | | | | 20 | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Ile | Val | Arg | Cys | Pro | Arg | Gln | Gly | Lys | Pro | Ser | Tyr | Thr | Val | Asp | Trp |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Tyr | Tyr | Ser | Gln | Thr | Asn | Lys | Ser | Ile | Pro | Thr | Gln | Glu | Arg | Asn | Arg |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Val | Phe | Ala | Ser | Gly | Gln | Leu | Leu | Lys | Phe | Leu | Pro | Ala | Ala | Val | Ala |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Asp | Ser | Gly | Ile | Tyr | Thr | Cys | Ile | Val | Arg | Ser | Pro | Thr | Phe | Asn | Arg |

				85					90					95			
Thr	Gly	Tyr	Ala	Asn	Val	Thr	Ile	Tyr	Lys	Lys	Gln	Ser	Asp	Cys	Asn		
			100					105					110				
Val	Pro	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ser	Thr	Val	Ser	Gly	Ser	Glu	Lys	Asn		
		115					120					125					
Ser	Lys	Ile	Tyr	Cys	Pro	Thr	Ile	Asp	Leu	Tyr	Asn	Trp	Thr	Ala	Pro		
	130					135					140						
Leu	Glu	Trp	Phe	Lys	Asn	Cys	Gln	Ala	Leu	Gln	Gly	Ser	Arg	Tyr	Arg		
145					150					155					160		
Ala	His	Lys	Ser	Phe	Leu	Val	Ile	Asp	Asn	Val	Met	Thr	Glu	Asp	Ala		
				165					170					175			
Gly	Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Phe	Ile	His	Asn	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn	Tyr		
			180					185					190				
Ser	Val	Thr	Ala	Thr	Arg	Ser	Phe	Thr	Val	Lys	Asp	Glu	Gln	Gly	Phe		
		195					200					205					
Ser	Leu	Phe	Pro	Val	Ile	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Asn	Glu	Ile	Lys	Glu		
	210					215					220						
Val	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Ala	Asn	Leu	Thr	Cys	Ser	Ala	Cys	Phe	Gly		
225					230					235					240		
Lys	Gly	Thr	Gln	Phe	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Thr		
				245					250					255			
Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Glu	Pro	Arg	Ile	Gln	Gln	Glu	Glu	Gly	Gln		
			260					265					270				
Asn	Gln	Ser	Phe	Ser	Asn	Gly	Leu	Ala	Cys	Leu	Asp	Met	Val	Leu	Arg		
		275					280					285					
Ile	Ala	Asp	Val	Lys	Glu	Glu	Asp	Leu	Leu	Leu	Gln	Tyr	Asp	Cys	Leu		
	290					295					300						
Ala	Leu	Asn	Leu	His	Gly	Leu	Arg	Arg	His	Thr	Val	Arg	Leu	Ser	Arg		
305					310					315					320		
Lys	Asn	Pro	Ile	Asp	His	His	Ser	Ile	Tyr	Cys	Ile	Ile	Ala	Val	Cys		
				325					330					335			

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 556
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis
 <400> 2

Met Gly Leu Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Val Tyr Ser Thr
 1 5 10 15
 Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
 20 25 30
 Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Ser Ser Tyr Ile Val Asp Trp
 35 40 45
 Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg
 50 55 60
 Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Glu Val Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg
 85 90 95
 Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Pro Asp Cys Asn
 100 105 110
 Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn
 115 120 125
 Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro
 130 135 140
 Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Lys
 145 150 155 160
 Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Asp Asp Ala
 165 170 175
 Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr
 180 185 190
 Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe
 195 200 205
 Ser Leu Phe Pro Val Ile Arg Ala Pro Ala His Asn Glu Thr Lys Glu
 210 215 220
 Val Glu Ile Gly Glu Asn Thr Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly
 225 230 235 240
 Lys Gly Ala Gln Phe Leu Ala Thr Val Gln Trp Gln Leu Asn Gly Asn
 245 250 255

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

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

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

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

<210> 3
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4
<211> 269
<212> PRT
<213> thuộc khỉ Macaca
<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 567
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

Met Ile Asp Arg Gln Arg Met Gly Leu Trp Ala Leu Ala Ile Leu Thr
1 5 10 15

Leu Pro Met Tyr Leu Thr Val Thr Glu Gly Ser Lys Ser Ser Trp Gly
20 25 30

Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg Cys Pro Gln Arg Gly Arg Ser
35 40 45

Thr Tyr Pro Val Glu Trp Tyr Tyr Ser Asp Thr Asn Glu Ser Ile Pro
50 55 60

Thr Gln Lys Arg Asn Arg Ile Phe Val Ser Arg Asp Arg Leu Lys Phe
65 70 75 80

Leu Pro Ala Arg Val Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Ala Cys Val Ile Arg
 85 90 95
 Ser Pro Asn Leu Asn Lys Thr Gly Tyr Leu Asn Val Thr Ile His Lys
 100 105 110
 Lys Pro Pro Ser Cys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val
 115 120 125
 Arg Gly Ser Asp Lys Asn Phe Lys Ile Thr Cys Pro Thr Ile Asp Leu
 130 135 140
 Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Val Gln Trp Phe Lys Asn Cys Lys Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Glu Pro Arg Phe Arg Ala His Arg Ser Tyr Leu Phe Ile Asp Asn
 165 170 175
 Val Thr His Asp Asp Glu Gly Asp Tyr Thr Cys Gln Phe Thr His Ala
 180 185 190
 Glu Asn Gly Thr Asn Tyr Ile Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val
 195 200 205
 Glu Glu Lys Gly Phe Ser Met Phe Pro Val Ile Thr Asn Pro Pro Tyr
 210 215 220
 Asn His Thr Met Glu Val Glu Ile Gly Lys Pro Ala Ser Ile Ala Cys
 225 230 235 240
 Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly Ser His Phe Leu Ala Asp Val Leu Trp
 245 250 255
 Gln Ile Asn Lys Thr Val Val Gly Asn Phe Gly Glu Ala Arg Ile Gln
 260 265 270
 Glu Glu Glu Gly Arg Asn Glu Ser Ser Ser Asn Asp Met Asp Cys Leu
 275 280 285
 Thr Ser Val Leu Arg Ile Thr Gly Val Thr Glu Lys Asp Leu Ser Leu
 290 295 300
 Glu Tyr Asp Cys Leu Ala Leu Asn Leu His Gly Met Ile Arg His Thr
 305 310 315 320
 Ile Arg Leu Arg Arg Lys Gln Pro Ile Asp His Arg Ser Ile Tyr Tyr

Ile Val Ala Gly Cys Ser Leu Leu Leu Met Phe Ile Asn Val Leu Val
340 345 350

Ile Val Leu Lys Val Phe Trp Ile Glu Val Ala Leu Phe Trp Arg Asp
355 360 365

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

Tyr Ile Ile Tyr Pro Arg Val Phe Arg Gly Ser Ala Ala Gly Thr His
385 390 395 400

Ser Val Glu Tyr Phe Val His His Thr Leu Pro Asp Val Leu Glu Asn
405 410 415

Lys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys Ile Tyr Gly Arg Asp Leu Leu Pro Gly
420 425 430

Gln Asp Ala Ala Thr Val Val Glu Ser Ser Ile Gln Asn Ser Arg Arg
435 440 445

Gln Val Phe Val Leu Ala Pro His Met Met His Ser Lys Glu Phe Ala
450 455 460

Tyr Glu Gln Glu Ile Ala Leu His Ser Ala Leu Ile Gln Asn Asn Ser
465 470 475 480

Lys Val Ile Leu Ile Glu Met Glu Pro Leu Gly Glu Ala Ser Arg Leu
485 490 495

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

Gly Thr Ile Lys Trp Arg Glu Asp His Val Ala Asp Lys Gln Ser Leu
515 520 525

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

Arg Ala Ser Lys Thr Ala Ser Val Ala Ala Pro Leu Ser Gly Lys Ala
545 550 555 560

Cys Leu Asp Leu Lys His Phe
565

<210> 6
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> ST2L human mouse chimera HHM

<400> 6

Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val
 1 5 10 15

Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr
 20 25 30

Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe
 35 40 45

Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala Asp Ser
 50 55 60

Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr Gly
 65 70 75 80

Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn Val Pro
 85 90 95

Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn Ser Lys
 100 105 110

Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu Glu
 115 120 125

Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala His
 130 135 140

Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala Gly Asp
 145 150 155 160

Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr Ser Val
 165 170 175

Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Glu Glu Lys Gly Phe Ser Met Phe
 180 185 190

Pro Val Ile Thr Asn Pro Pro Tyr Asn His Thr Met Glu Val Glu Ile
 195 200 205

Gly Lys Pro Ala Ser Ile Ala Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly Ser

210 215 220
 His Phe Leu Ala Asp Val Leu Trp Gln Ile Asn Lys Thr Val Val Gly
 225 230 235 240
 Asn Phe Gly Glu Ala Arg Ile Gln Glu Glu Gly Arg Asn Glu Ser
 245 250 255
 Ser Ser Asn Asp Met Asp Cys Leu Thr Ser Val Leu Arg Ile Thr Gly
 260 265 270
 Val Thr Glu Lys Asp Leu Ser Leu Glu Tyr Asp Cys Leu Ala Leu Asn
 275 280 285
 Leu His Gly Met Ile Arg His Thr Ile Arg Leu Arg
 290 295 300

 <210> 7
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MHM thể khảm ST2L ở chuột với ở người
 <400> 7
 Lys Ser Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg Cys Pro
 1 5 10 15
 Gln Arg Gly Arg Ser Thr Tyr Pro Val Glu Trp Tyr Tyr Ser Asp Thr
 20 25 30
 Asn Glu Ser Ile Pro Thr Gln Lys Arg Asn Arg Ile Phe Val Ser Arg
 35 40 45
 Asp Arg Leu Lys Phe Leu Pro Ala Arg Val Glu Asp Ser Gly Ile Tyr
 50 55 60
 Ala Cys Val Ile Arg Ser Pro Asn Leu Asn Lys Thr Gly Tyr Leu Asn
 65 70 75 80
 Val Thr Ile His Lys Lys Pro Pro Ser Cys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu
 85 90 95
 Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn Ser Lys Ile Tyr Cys
 100 105 110
 Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu Glu Trp Phe Lys
 115 120 125

Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala His Lys Ser Phe
130 135 140

Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala Gly Asp Tyr Thr Cys
145 150 155 160

Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr Ser Val Thr Ala Thr
165 170 175

Arg Ser Phe Thr Val Glu Glu Lys Gly Phe Ser Met Phe Pro Val Ile
180 185 190

Thr Asn Pro Pro Tyr Asn His Thr Met Glu Val Glu Ile Gly Lys Pro
195 200 205

Ala Ser Ile Ala Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly Ser His Phe Leu
210 215 220

Ala Asp Val Leu Trp Gln Ile Asn Lys Thr Val Val Gly Asn Phe Gly
225 230 235 240

Glu Ala Arg Ile Gln Glu Glu Glu Gly Arg Asn Glu Ser Ser Ser Asn
245 250 255

Asp Met Asp Cys Leu Thr Ser Val Leu Arg Ile Thr Gly Val Thr Glu
260 265 270

Lys Asp Leu Ser Leu Glu Tyr Asp Cys Leu Ala Leu Asn Leu His Gly
275 280 285

Met Ile Arg His Thr Ile Arg Leu Arg
290 295

<210> 8

<211> 303

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> HMH thể khảm ST2L ở người với ổ chuột

<400> 8

Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val
1 5 10 15

Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr
20 25 30

Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe
 35 40 45
 Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala Asp Ser
 50 55 60
 Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr Gly
 65 70 75 80
 Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn Val Pro
 85 90 95
 Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Arg Gly Ser Asp Lys Asn Phe Lys
 100 105 110
 Ile Thr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Val Gln
 115 120 125
 Trp Phe Lys Asn Cys Lys Ala Leu Gln Glu Pro Arg Phe Arg Ala His
 130 135 140
 Arg Ser Tyr Leu Phe Ile Asp Asn Val Thr His Asp Asp Glu Gly Asp
 145 150 155 160
 Tyr Thr Cys Gln Phe Thr His Ala Glu Asn Gly Thr Asn Tyr Ile Val
 165 170 175
 Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe Ser Leu
 180 185 190
 Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu Val Glu
 195 200 205
 Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly
 210 215 220
 Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr Lys Ile
 225 230 235 240
 Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln Asn Gln
 245 250 255
 Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg Ile Ala
 260 265 270
 Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu Ala Leu
 275 280 285

Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg Lys
 290 295 300

<210> 9
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val
 1 5 10 15

Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr
 20 25 30

Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe
 35 40 45

Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala Asp Ser
 50 55 60

Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr Gly
 65 70 75 80

Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn Val Pro
 85 90 95

Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val
 100

<210> 10
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Ser Gly Ser Glu Lys Asn Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu
 1 5 10 15

Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu
 20 25 30

Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn
 35 40 45

Val Met Thr Glu Asp Ala Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn
 50 55 60

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

<210> 11
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

Val Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly
20 25 30

Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr
35 40 45

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

Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg
65 70 75 80

Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu
85 90 95

Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg
100 105 110

Lys Asn Pro Ile
115

<210> 12
<211> 101
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Lys Ser Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg Cys Pro
1 5 10 15

Gln Arg Gly Arg Ser Thr Tyr Pro Val Glu Trp Tyr Tyr Ser Asp Thr
20 25 30

Asn Glu Ser Ile Pro Thr Gln Lys Arg Asn Arg Ile Phe Val Ser Arg
35 40 45

Asp Arg Leu Lys Phe Leu Pro Ala Arg Val Glu Asp Ser Gly Ile Tyr
 50 55 60

Ala Cys Val Ile Arg Ser Pro Asn Leu Asn Lys Thr Gly Tyr Leu Asn
 65 70 75 80

Val Thr Ile His Lys Lys Pro Pro Ser Cys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu
 85 90 95

Met Tyr Ser Thr Val
 100

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 13

His Tyr Gly Met Ala
 1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14

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

Gly

<210> 15
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 15

Gln Ser Asp Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 16

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 17

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 18

Phe Gln Ala Thr His Asp Pro Phe Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 19

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Ser Asp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 20

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Val Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

Thr His Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 21

Asp Tyr Asn Met Asn
 1 5

<210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 22

Thr Tyr Trp Met Asn
 1 5

<210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 23

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 24

Asp Asp Tyr Met His
1 5

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 25

Asn Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 26

Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Met Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 27
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 27

Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Asp Thr Ser Phe Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 28

Arg Ile Asp Pro Ala Ile Gly Asn Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Asp

<210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 29

Glu Gly Asp Thr Tyr Leu Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 30

Ser Glu Asn Ile Tyr Tyr Ile Asn Phe Gln Tyr Tyr Phe Ala Tyr
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 31

Tyr Asp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 32

Gly Asp Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5

<210> 33
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 33

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 34

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Arg Met His
 1 5 10

<210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 35

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Ser Ser Tyr Met Phe
 1 5 10 15

<210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 36

Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val Ile His
 1 5 10

<210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 37

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 38

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5

<210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 39

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 40

Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro
 1 5

<210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 41

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
 1 5

<210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 42

Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe Thr
 1 5

<210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 43

Gln His Ser Arg Glu Ile Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 44
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 44

Leu Gln Ser Asp Asn Met Leu Thr
 1 5

<210> 45
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> C2519A VH

<400> 45

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 46

<211> 124

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> C2521A VH

<400> 46

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

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

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

Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Met Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Glu Asn Ile Tyr Tyr Ile Asn Phe Gln Tyr Tyr Phe Ala
100 105 110

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

<210> 47

<211> 117

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> C2244/ STLM15 VH

<400> 47

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Phe Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

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

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

Lys Ser Arg Ile Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

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

Ala Ser Tyr Asp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 48

<211> 117

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> C2494A/ STLM62 VH

<400> 48

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Ala Phe Asn Ile Lys Asp Asp
20 25 30

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

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

Gln Asp Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 49

<211> 112

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> C2519A VL

<400> 49

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 50

<211> 106

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> C2521A VL

<400> 50

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

Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Arg Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
35 40 45

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 51

<211> 111

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> C2244/ STLM15 VL

<400> 51

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Ser Ser Tyr Met Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> C2494A/ STLM62 VL

<400> 52

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

Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Thr Leu Ser
65 70 75 80

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

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> STLM48, STLM49, STLM50 HCDR1
 <400> 53

Thr Ser Tyr Trp Ile Gly
 1 5

<210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> STLM51 HCDR1
 <400> 54

Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5

<210> 55
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> STLM48, STLM49, STLM50 HCDR2
 <400> 55

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 1 5 10 15

Gln Gly

<210> 56
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> STLM51 HCDR2
 <400> 56

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 57
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> STLM48, STLM50 HCDR3
 <400> 57

Leu Ser Gly Arg Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> STLM49 HCDR3
 <400> 58

Ile Gly Gly Met Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> STLM51 HCDR3
 <400> 59

Asp Thr Pro Gln Leu Asp Tyr
 1 5

<210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> STLM48 LCDR1
 <400> 60

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asp Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>

<223> STLM49 LCDR1

<400> 61

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

<210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> STLM50 LCDR1

<400> 62

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

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> STLM51 LCDR1

<400> 63

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> STLM48, STLM50 LCDR2

<400> 64

Phe Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> STLM49 LCDR2

<400> 65

Lys Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> STLM51 LCDR2

<400> 66

Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> STLM48 LCDR3

<400> 67

Gln Gln Phe Asn Thr Trp Pro Ile Thr
 1 5

<210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> STLM49 LCDR3

<400> 68

Gln Gln Tyr Tyr Gly Trp Pro Ile Thr
 1 5

<210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> STLM50 LCDR3

<400> 69

Gln Gln Phe Phe Asn Trp Pro Ile Thr
 1 5

<210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> STLM51 LCDR3

<400> 70

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 71

<211> 116

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> STLM48, STLM50 VH

<400> 71

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

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

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Ser Gly Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 72

<211> 116

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> STLM49 VH

<400> 72

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

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

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Gly Gly Met Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 116
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> STLM51 VH

<400> 73

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Thr Pro Gln Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 74
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> STLM48 VL

<400> 74

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asp Ala
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Thr Trp Pro Ile
 85 90 95

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

<210> 75
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> STLM49 VL

<400> 75

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ala Asn Ala
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Gly Trp Pro Ile
85 90 95

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

<210> 76

<211> 107

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> STLM50 VL

<400> 76

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Trp
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Ala Pro Trp
85 90 95

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

<210> 77

<211> 107

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

27001

<220>

<223> STLM51 VL

<400> 77

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 78

<211> 5

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2F6 HCDR1

<400> 78

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2F4 HCDR1

<400> 79

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 80

<211> 5
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2F1 HCDR1

<400> 80

Ser Tyr Trp Ile Gly
 1 5

<210> 81
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2F6 HCDR2

<400> 81

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

Gly

<210> 82
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2F4 HCDR2

<400> 82

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

Gly

<210> 83
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2F1 HCDR2

<400> 83

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 84
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2F6 HCDR3

<400> 84

Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 85
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2F4 HCDR3

<400> 85

Asp Gly Trp Gly Thr Val Tyr Phe Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 86
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2F1 HCDR3

<400> 86

Asp Thr Ala Asp Phe Arg Arg Trp Asp Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 87
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2F6 LCDR1

<400> 87

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 88
 <211> 11
 <212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2F4 LCDR1

<400> 88

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asp Asp Leu Ala
1 5 10

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2F1 LCDR1

<400> 89

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2F6, ST2F4 LCDR2

<400> 90

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2F1 LCDR2

<400> 91

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2F6 LCDR3

<400> 92

Gln Gln Phe Tyr Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2F4 LCDR3

<400> 93

Gln Gln Tyr Ile His Ala Pro Leu Thr
1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2F1 LCDR3

<400> 94

Gln Gln Ser Asn Thr Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 95

<211> 5

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2H112, ST2H137 HCDR1

<400> 95

Phe Tyr Asp Met Phe
1 5

<210> 96

<211> 5

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2H52 HCDR1

<400> 96

Asp Tyr Ala Met Phe
1 5

<210> 97
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> ST2H50, ST2H232, ST2H257, ST2H231 HCDR1
 <400> 97

Ile Tyr Asp Met Ile
 1 5

<210> 98
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> ST2H228 HCDR1
 <400> 98

Ser Tyr Asp Met Ile
 1 5

<210> 99
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> ST2H318 HCDR1
 <400> 99

Asp Asp Ala Met Ile
 1 5

<210> 100
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> ST2H316 HCDR1
 <400> 100

Gly Tyr Ala Met Ile
 1 5

<210> 101
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>

<223> ST2H314 HCDR1

<400> 101

Val Tyr Asp Met Ile
1 5

<210> 102

<211> 5

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2H202 HCDR1

<400> 102

Phe Tyr Asp Met Ile
1 5

<210> 103

<211> 5

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2H179, ST2H172, ST2H173 HCDR1

<400> 103

Ser Tyr Asp Met Phe
1 5

<210> 104

<211> 5

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2H163 HCDR1

<400> 104

Val Tyr Asp Met Phe
1 5

<210> 105

<211> 5

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2H162 HCDR1

<400> 105

Val Asp Ser Met Phe
1 5

<210> 106
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H139 HCDR1

<400> 106

Gly Tyr Asp Met Phe
 1 5

<210> 107
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H136 HCDR1

<400> 107

Ile Tyr Asp Met Phe
 1 5

<210> 108
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H129 HCDR1

<400> 108

Ile Tyr Ser Met Phe
 1 5

<210> 109
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H112 HCDR3

<400> 109

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

Gly

<210> 110
 <211> 17

<212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H52 HCDR3

<400> 110

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

Gly

<210> 111
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H50 HCDR3

<400> 111

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

Gly

<210> 112
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H232 HCDR3

<400> 112

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

Gly

<210> 113
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H228 HCDR3

<400> 113

Thr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 114
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H257 HCDR3

<400> 114

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

Gly

<210> 115
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H231 HCDR3

<400> 115

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

Gly

<210> 116
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H318 HCDR3

<400> 116

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

Gly

<210> 117
 <211> 17

<212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H316 HCDR3

<400> 117

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

Gly

<210> 118
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H314 HCDR3

<400> 118

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

Gly

<210> 119
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 119

Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile
 1 5 10 15

Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr
 20 25 30

Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val
 35 40 45

Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Glu Val Ala Asp
 50 55 60

Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr
 65 70 75 80

Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn Val
 85 90 95

Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn Ser
100 105 110

Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu
115 120 125

Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala
130 135 140

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

Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr Ser
165 170 175

Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe Ser
180 185 190

Leu Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu Val
195 200 205

Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys
210 215 220

Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr Lys
225 230 235 240

Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln Asn
245 250 255

Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg Ile
260 265 270

Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu Ala
275 280 285

Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg Lys
290 295 300

Asn Pro Ser Lys Glu Cys Phe
305 310

<210> 120

<211> 17

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2H202 HCDR3

<400> 120

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

Gly

<210> 121

<211> 17

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2H179 HCDR3

<400> 121

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

Gly

<210> 122

<211> 17

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2H172 HCDR3

<400> 122

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

Gly

<210> 123

<211> 17

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ST2H173 HCDR3

<400> 123

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

Gly

<210> 124
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> ST2H163 HCDR3
 <400> 124

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

Gly

<210> 125
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> ST2H162 HCDR3
 <400> 125

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

Gly

<210> 126
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> ST2H139 HCDR3
 <400> 126

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

Gly

<210> 127
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H137 HCDR3

<400> 127

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

Gly

<210> 128
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H136 HCDR3

<400> 128

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

Gly

<210> 129
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2H129 HCDR3

<400> 129

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

Gly

<210> 130
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2L32 LCDR1

<400> 130

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Asp Leu Ala
 1 5 10

<210> 131
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2L32 LCDR3

<400> 131

Gln Gln Tyr Ile Gly Ala Pro Ile Thr
 1 5

<210> 132
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2L35 LCDR3

<400> 132

Gln Gln Tyr Ile Asp Ala Pro Leu Thr
 1 5

<210> 133
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2L49 LCDR3

<400> 133

Gln Gln Tyr Asn Asp Ala Ile Thr
 1 5

<210> 134
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ST2L59 LCDR3

<400> 134

Gln Gln Tyr Ile Thr Ala Pro Leu Thr
 1 5

<210> 135
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL2494-IGKV1-33*01 018

<400> 135

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val
 20 25 30

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

Tyr Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 136

<211> 106

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL2494-IGKV1-27*01 A20

<400> 136

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 137

<211> 106

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL2494-IGKV1-39*01012

<400> 137

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val
20 25 30

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

Tyr Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 138

<211> 106

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL2494-IGKV1-12*01 L5

<400> 138

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

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

<210> 139
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> VL2494-IGKV1-5*01 L12
 <400> 139

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

<210> 140
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>

<223> VL2494-IGKV1-9*01 L8

<400> 140

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val
20 25 30

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

Tyr Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 141

<211> 106

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL2494-IGKV3-15*01 L2

<400> 141

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val
20 25 30

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

Tyr Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 142

<211> 106

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL2494-IGKV1-39*01 012b

<400> 142

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Val
20 25 30

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

Tyr Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 143

<211> 117

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH2494-IGHV1-f*01

<400> 143

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Ala Phe Asn Ile Lys Asp Asp
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ala Thr Gly Asp Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 144

<211> 117

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH2494-IGHV1-24*01

<400> 144

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Ala Phe Asn Ile Lys Asp Asp
20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Gly Asp Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 145
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH STLH201

<400> 145

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Ala Phe Asn Ile Lys Asp Asp
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

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

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

Ala Thr Gly Asp Phe Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 146
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR3 of STLM226-STLM232

<400> 146

Gly Asp Phe Tyr Ala Met Ala Tyr
 1 5

<210> 147
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> STLM266 VL

<400> 147

Leu Gln Ser Asp Asn Leu Leu Thr
1 5

<210> 148

<211> 109

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> khung IGHV1-24*01

<400> 148

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

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

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

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

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

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

Ala Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105

<210> 149

<211> 109

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> khung IGHV1-f*01

<400> 149

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

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

<210> 150

<211> 106

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> khung IGKV3-15*01 L2

<400> 150

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 151

<211> 106

<212> PRT

<213> khung

<220>

<223> khung IGKV1-9*01 L8

<400> 151

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 152

<211> 106

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> IGKV1-5*01 L12

<400> 152

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

$\langle 210 \rangle$	153
$\langle 211 \rangle$	106
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	nhân tạo

<220>
<223> IGKV1-12*01 L5

<400> 153

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210>	154
<211>	106
<212>	PRT
<213>	nhân tạo

<220>
<223> IGKV1-39*01 012

<400> 154

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 155

<211> 106

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> IGKV1-27*01 A20

<400> 155

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 156

<211> 106

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> IGKV1-33*01 018

<400> 156

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 157

<211> 328

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 157

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

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

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

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

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

Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg
 85 90 95
 Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn
 100 105 110
 Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn
 115 120 125
 Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro
 130 135 140
 Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg
 145 150 155 160
 Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala
 165 170 175
 Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr
 180 185 190
 Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe
 195 200 205
 Ser Leu Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu
 210 215 220
 Val Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly
 225 230 235 240
 Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr
 245 250 255
 Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln
 260 265 270
 Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg
 275 280 285
 Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu
 290 295 300
 Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg
 305 310 315 320
 Lys Asn Pro Ser Lys Glu Cys Phe
 325

<210> 158

<211> 109

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> khung VH 3-23

<400> 158

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105

<210> 159

<211> 106

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> khung VK L6 (IGKV-11)

<400> 159

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

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

<210> 160

<211> 5

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 consensus

<220>

<221> Xaa1

<222> (1)..(1)

<223> Xaa1 is S, F, D, I, G or V

<220>

<221> Xaa2

<222> (2)..(2)

<223> Xaa2 is Y or D

<220>

<221> Xaa3

<222> (3)..(3)

<223> Xaa3 is A, D or S

<220>

<221> Xaa4

<222> (5)..(5)

<223> Xaa4 is S, F or I

<400> 160

Xaa Xaa Xaa Met Xaa
1 5

<210> 161

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> HCDR2 consensus

<220>

<221> Xaa1

<222> (1)..(1)

<223> Xaa1 is A, S, T, Y or D

<220>
 <221> Xaa2
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa2 is S, R, E, K, G or A

<220>
 <221> Xaa3
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa3 is S, E or N

<220>
 <221> Xaa4
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa4 is S, R, E, G, T, D or A

<220>
 <221> Xaa5
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa5 is Y, D, N, A or S

<400> 161

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

Gly

<210> 162
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> HCDR3 consensus

<220>
 <221> Xaa1
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa1 is D, A, R, N, Q, P, E, I, H, S, T or Y

<220>
 <221> Xaa2
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa2 is P, A, H, Y, E, Q, L, S, N, T, V or I

<400> 162

Xaa Xaa Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 163
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 consensus

<220>
 <221> Xaa1
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa1 is A or D

<400> 163

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Xaa Leu Ala
 1 5 10

<210> 164
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> LCDR3 consensus

<220>
 <221> Xaa1
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa1 is F or Y

<220>
 <221> Xaa2
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa2 is Y, I or N

<220>
 <221> Xaa3
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa3 is N, G, D or T

<220>
 <221> Xaa4
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa4 is W or A

<220>
 <221> Xaa5
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa5 is P or deleted

<220>
 <221> Xaa6
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa6 is L or I

<400> 164

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
 1 5

<210> 165
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
<223> STLH255 HCDR3

<400> 165

Ala Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 166
<211> 14
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> STLH256 HCDR3

<400> 166

Arg Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 167
<211> 14
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> STLH257 HCDR3

<400> 167

Asn Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 168
<211> 14
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> STLH258 HCDR3

<400> 168

Gln Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 169
<211> 14
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> STLH259 HCDR3

<400> 169

Glu Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 170

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> STLH260 HCDR3

<400> 170

Ile	Pro	Trp	Ser	Thr	Glu	Gly	Ser	Phe	Phe	Val	Leu	Asp	Tyr
1				5					10				

<210> 171

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> STLH261 HCDR3

<400> 171

His	Pro	Trp	Ser	Thr	Glu	Gly	Ser	Phe	Phe	Val	Leu	Asp	Tyr
1				5					10				

<210> 172

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> STLH262 HCDR3

<400> 172

Ser	Pro	Trp	Ser	Thr	Glu	Gly	Ser	Phe	Phe	Val	Leu	Asp	Tyr
1				5					10				

<210> 173

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> STLH263 HCDR3

<400> 173

Thr	Pro	Trp	Ser	Thr	Glu	Gly	Ser	Phe	Phe	Val	Leu	Asp	Tyr
1				5					10				

<210> 174

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>
 <223> STLH264 HCDR3

<400> 174

Tyr Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 175
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> STLH265 HCDR3

<400> 175

Asp Ala Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 176
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> STLH266 HCDR3

<400> 176

Asp His Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 177
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> STLH267 HCDR3

<400> 177

Asp Tyr Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 178
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> STLH268 HCDR3

<400> 178

Asp Glu Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 179
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> STLH269 HCDR3

<400> 179

Asp Gln Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 180
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> STLH270 HCDR3

<400> 180

Asp Leu Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 181
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> STLH271 HCDR3

<400> 181

Asp Ser Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 182
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> STLH272 HCDR3

<400> 182

Asp Asn Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 183
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> STLH273 HCDR3

<400> 183

Asp Thr Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 184
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> STLH274 HCDR3

<400> 184

Asp Val Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 185
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> STLH275 HCDR3

<400> 185

Asp Ile Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 186
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> ST2H52

<400> 186

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 187

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H50

<400> 187

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 188

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H318

<400> 188

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 189

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H316

<400> 189

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 190
<211> 123
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> ST2H314

<400> 190

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 191
<211> 123
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H257

<400> 191

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 192

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H232

<400> 192

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 193

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H231

<400> 193

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 194

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H228

<400> 194

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 195

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H202

<400> 195

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

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

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

Ser Thr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 196

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H179

<400> 196

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

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

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

Ser Asp Ile Lys Gly Glu Gly Gly Arg Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 197

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H173

<400> 197

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

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

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

Ser Asp Ile Lys Gly Glu Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 198

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H172

<400> 198

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 199

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H163

<400> 199

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 200

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H162

<400> 200

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Asp
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 201

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H139

<400> 201

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 202

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H137

<400> 202

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 203

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H136

<400> 203

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

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

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

Ser Tyr Ile Arg Gly Glu Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 204

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H129

<400> 204

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 205

<211> 123

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2H112

<400> 205

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Trp Ser Thr Glu Gly Ser Phe Phe Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 206

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2L32

<400> 206

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Asp
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Gly Ala Pro Ile
 85 90 95

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

<210> 207

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2L35

<400> 207

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Asp
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Asp Ala Pro Leu
85 90 95

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

<210> 208
<211> 106
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> ST2L49

<400> 208

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Asp
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Ala Ile Thr
85 90 95

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

<210> 209
<211> 107
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> ST2L59

<400> 209

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Asp
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Thr Ala Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 210

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> ST2L epitope

<400> 210

Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp
 1 5 10

<210> 211

<211> 369

<212> DNA

<213> nhân tạo

<220>

<223> VH ADN đối với STLM208

<400> 211

gaggtgcagc tgctggagag cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggcag cctgcgcctg 60

agctgcgccg ccagcggcctt caccttcagc atctacgaca tgatctgggt gcgccaggcc 120

cccggcaagg gcctggagtg ggtcagcagc atccgcggcg agggcggcgg cacctactac 180

gccgacagcg tgaagggccg cttcaccatc agccgcgaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgcgacccc 300

tggagcaccg agggcagctt cttcgtgctg gactactggg gccagggcac cctggtgacc 360

gtgagcagc 369

<210> 212

<211> 321

<212> DNA

<213> nhân tạo

<220>

<223> VL cDNA for STLM208

<400> 212

gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccccggcga gcgcgccacc 60
 ctgagctgcc gcgccagcca gagcgtggac gacgacctgg cctggtacca gcagaagccc 120
 ggccaggccc cccgcctgct gatctacgac gccagcaacc gcgccaccgg catccccgcc 180
 cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctggagccc 240
 gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag tacatcaccg cccccctgac cttcggccag 300
 ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 213

<211> 351

<212> DNA

<213> nhân tạo

<220>

<223> VH CADN ddoosio với c2244

<400> 213

gaggtgcagc ttcaggagtc aggacctggc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60
 acctgcactg tctactggctt ctcaatcacc agtgattatg cctggaactg gatccggcag 120
 tttccaggaa gcaagctaga gtggatgggc ttcataagct acagtgggtga cactagcttc 180
 aacccatctc tcaaaagtcg aatctctgtc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc 240
 ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aagttatgat 300
 ggttactcat ttgactactg gggccaaggc actactctca cagtctcctc a 351

<210> 214

<211> 333

<212> DNA

<213> nhân tạo

<220>

<223> VL CADN đối với c2244

<400> 214

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttcc ttagctatat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct ctagttatat gttctggtac 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatcaa cctagaatct 180
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatacat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgcagcctat tactgtcaac acagtagga gattccgtac 300
 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 215

<211> 266
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 215

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

Phe Ser Ser Thr Ala Gly Glu Ala Leu Val Pro Pro Cys Lys Ile Arg
 20 25 30

Arg Ser Gln Gln Lys Thr Lys Glu Phe Cys His Val Tyr Cys Met Arg
 35 40 45

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

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

Asn Phe Ser Ala Tyr Pro Arg Asp Ser Arg Lys Arg Ser Leu Leu Gly
 85 90 95

Ser Ile Gln Ala Phe Ala Ala Ser Val Asp Thr Leu Ser Ile Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Thr Tyr Asn Asp
 115 120 125

Gln Ser Val Ser Phe Val Leu Glu Asn Gly Cys Tyr Val Ile Asn Val
 130 135 140

Asp Asp Ser Gly Lys Asp Gln Glu Gln Asp Gln Val Leu Leu Arg Tyr
 145 150 155 160

Tyr Glu Ser Pro Cys Pro Ala Ser Gln Ser Gly Asp Gly Val Asp Gly
 165 170 175

Lys Lys Leu Met Val Asn Met Ser Pro Ile Lys Asp Thr Asp Ile Trp
 180 185 190

Leu His Ala Asn Asp Lys Asp Tyr Ser Val Glu Leu Gln Arg Gly Asp
 195 200 205

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

Asp Phe Val Ser Phe Glu Cys Lys Asn Leu Pro Gly Thr Tyr Ile Gly

27001

225					230					235					240
Val	Lys	Asp	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Val	Glu	Glu	Lys	Asp	Glu	Ser	Cys
				245					250					255	
Asn	Asn	Ile	Met	Phe	Lys	Leu	Ser	Lys	Ile						
			260					265							