

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3277717

DAL TITOLO:

**"UNA NUOVA FORMA DI IL33, FORME MUTATE DI IL33,
ANTICORPI, SAGGI E METODI PER USARE GLI STESSI"**

***** *** *****

DESCRIZIONE

La presente divulgazione si riferisce a nuove forme di IL-33; nuovi mutanti di IL-33; proteine di legame, come anticorpi specifici per una qualsiasi di dette proteine, in particolare proteine di legame in grado di modulare la quantità di detta forma presente; a composizioni comprendenti una proteina o una proteina di legame, come un anticorpo secondo la presente divulgazione; e all'uso di uno qualsiasi degli stessi, in particolare nella terapia, per esempio nel trattamento della prevenzione di malattie infiammatorie. La divulgazione nel presente documento si estende anche ai saggi per identificare e/o quantificare le diverse forme di IL-33.

STATO DELL'ARTE DELL'INVENZIONE

Interleuchina-33 (IL-33), anche denominata IL-1F11, è un membro della famiglia di citochine IL-1 che stimola la generazione di cellule, citochine e immunoglobuline caratteristiche di una risposta immunitaria di tipo due. IL-33 è una proteina di 270 amminoacidi, costituita da due domini: un omeodominio e un dominio di citochine (IL-1-simile). L'omeodominio contiene un segnale di localizzazione nucleare (NLS). IL-33 media la trasduzione di segnale attraverso ST2,

un recettore espresso su cellule Th2, mastociti e un'ampia varietà di altri tipi di cellule.

Schmitz *et al.* hanno identificato per la prima volta IL-33 come il ligando per il recettore orfano ST2 (anche denominato IL-1R4) (Schmitz *et al.*, Immunity 23 (5) 479-90 (2005)). Il recettore di IL-33 è formato da molecole eterodimeriche. ST2 e la proteina accessoria IL-1R (IL-1RAcP) si dimerizzano per formare un recettore di IL-33 (ST2:IL-1RAcP). IL-1RAcP è un componente condiviso dei recettori per IL-1 α , IL-1 β , IL-1F6, IL1F8 e IL1F9. IL-1RAcP non è richiesta per il legame, ma è fondamentale per la segnalazione. Il dominio TIR del recettore di IL-33 recluta MyD88 e TRAF6, e il segnale del recettore determina l'attivazione delle vie NF κ B e MAP chinasi (Oboki *et al.*, Allergology International 59:143-160 (2010)). Il recettore di IL-33 può potenzialmente associarsi ad altri recettori ed è stato segnalato che interagisce con il c-kit sui mastociti (Drube *et al.*, Blood 115: 3899-3906 (2010))

Recentemente, IL-33 ha dimostrato di legare un secondo complesso eterodimerico del recettore di IL-33: ST2 forma anche un complesso con un'altra molecola della famiglia IL-1R, "singola molecola correlata a Ig IL-1R" (SIGIRR) (anche denominata Toll IL-1R8 (TIR8)) per formare ST2:SIGIRR. Si ritiene che SIGIRR/TIR8 agisca come un regolatore negativo delle risposte immunitarie mediate da IL-1R e il recettore Toll-simile (TLR) (Garlanda *et al.*, Trends Immunol. 30:439-46

(2009)). A differenza di ST2:IL-1RAcP, ST2: SIGIRR sembra agire come un regolatore negativo di IL-33 (Oboki *et al.* (2010)).

L'unico ligando noto del recettore ST2 è IL-33 (si veda, *ad esempio*, Schmitz *et al.*, Immunity 23 (5) 479-90 (2005); Chackerian *et al.*, J. Immunol. 179 (4):2551- 5 (2007)). Il recettore ST2 è espresso al valore basale dalle cellule Th2 e dai mastociti, entrambi i tipi di cellule sono noti per essere importanti mediatori dell'asma allergica. La forma extracellulare di IL-33 stimola le cellule bersaglio legandosi a ST2 e conseguentemente attiva le vie NFκB e MAP chinasi, comportando una serie di risposte funzionali inclusa la produzione di citochine e chemochine. Si ritiene che ST2 solubile (sST2) sia un recettore esca, che previene la segnalazione di IL-33.

Negli esseri umani, è stato riscontrato che IL-33 si esprime costitutivamente nella muscolatura liscia e negli epiteli bronchiali. L'espressione può essere indotta da IL-1β e TNF-α nei fibroblasti polmonari e dermici (Schmitz *et al.* (2005)). I livelli di proteina di ST2 solubile e dell'mRNA/proteina di IL-33 aumentano nei sieri e nei tessuti dei pazienti con asma (Oboki *et al.*, Allergology International 59:143-160 (2010)).

In vivo, IL-33 induce l'espressione di IL-4, IL-5 e IL-13 e comporta gravi cambiamenti patologici negli organi della mucosa. La somministrazione di IL-33 ai topi ha potenti effetti infiammatori, inclusi massiccia eosinofilia nel sangue, aumento dei livelli sierici di IL-5 e IgE e iperplasia delle cellule caliciformi sulle superfici mucose (Schmitz *et al.*

(2005)). La somministrazione intraperitoneale o intranasale di IL-33 ai topi ha comportato l'induzione di infiammazione eosinofila nella mucosa polmonare e intestinale attraverso le vie dipendenti da IL-13 e STAT6 (Oboki *et al.* (2010)). Di conseguenza, IL-33 può svolgere un ruolo nelle malattie allergiche come asma e altre malattie infiammatorie delle vie aeree.

Alcuni rapporti nella letteratura suggeriscono che le cellule caliciformi secernono CXCL8/IL-8, e ciò viene aumentato da IL-33 attraverso la via ST2R-ERK, suggerendo un meccanismo di un'infiammazione delle vie aeree potenziata nelle vie aeree asmatiche con metaplasia delle cellule caliciformi (Clin Exp Allergy. aprile 2014; 44 (4):540-52)

Pertanto, si è registrato un interesse riguardo IL-33 come un bersaglio terapeutico. Tuttavia, ad oggi i benefici terapeutici del blocco di questo bersaglio terapeutico devono ancora essere pienamente realizzati. I presenti inventori hanno stabilito per la prima volta che IL-33 esiste in una forma ridotta (a cui nel presente documento viene fatto riferimento anche come redIL-33) e in una forma ossidata. Gli inventori hanno caratterizzato per la prima volta la forma ossidata di IL-33 come descritto nel presente documento. Studi *in vitro* e *in vivo* degli inventori hanno mostrato che la scomparsa di redIL-33 (la forma ridotta) era correlata alla comparsa di IL-33 ossidata. Nei fluidi fisiologici *in vitro*, redIL-33 viene rapidamente ossidata per formare una forma legata con disolfuro. La forma ossidata (a cui viene fatto riferimento nel presente

documento anche come IL-33-DSB) ha almeno uno (ad esempio, due) legami disolfuro, tra le cisteine selezionate dal gruppo Cys208, Cys 227, Cys 232 e Cys259, (numerate facendo riferimento a IL-33 umana a lunghezza intera come divulgato in UniProt O97560, i cui residui da 112 a 270 sono citati all'interno della SEQ ID NO. 632). In precedenza, non è stato apprezzato il fatto che i saggi disponibili in commercio risulta rilevino prevalentemente questa forma ossidata. I presenti inventori, pertanto, avevano bisogno di ideare saggi per rilevare selettivamente la redIL-33 che è responsabile dell'interazione con ST2 e di guidare l'attività biologica associata al rilascio di IL-33.

La forma ridotta risulta essere la forma attiva della proteina che genera la cascata di segnale e in effetti *in vivo* risulta che la forma ridotta viene convertita alla forma ossidata come un meccanismo per terminare la segnalazione attraverso ST2. I presenti inventori hanno scoperto che redIL-33 si lega a ST2 (Figura 24A). Al contrario, IL-33-DSB non ha mostrato alcun legame a ST2 (Figura 24B). Ciò ha comportato che gli inventori ipotizzassero che l'ossidazione *in vivo* potrebbe essere un meccanismo per disattivare l'attività di IL-33-ST2. In aggiunta, i presenti inventori hanno stabilito per la prima volta che la forma ossidata di IL-33 (IL-33-DSB) si lega al recettore per i prodotti finali di glicazione avanzata (RAGE) e si segnala attraverso questa via alternativa (Figura 56).

WO 2014/164959 divulga anticorpi anti-IL-33.

I presenti inventori ritengono che questa consapevolezza possa essere utilizzata per generare agenti terapeutici più efficaci. Secondo un aspetto, i presenti inventori hanno identificato un anticorpo che si lega preferibilmente alla forma ossidata ma che sorprendentemente attenua l'attività della forma ridotta catalizzando essenzialmente la conversione della forma ridotta alla forma ossidata. Vantaggiosamente, questo meccanismo aumenta semplicemente il meccanismo *in vivo* per terminare la segnalazione attraverso ST2.

Secondo un altro aspetto, gli inventori hanno identificato un anticorpo che si lega preferibilmente alla forma ridotta di IL-33 (redIL-33), con affinità femtomolare, e attenua e/o inibisce la segnalazione mediata da IL-33 attraverso ST2. Questo anticorpo fornisce per la prima volta un meccanismo per trattare o prevenire le risposte infiammatorie mediate da IL-33/ST2.

Secondo un ulteriore aspetto ancora, gli anticorpi della presente invenzione possono attenuare o inibire la via di segnalazione precedentemente non riconosciuta per IL-33-DSB attraverso RAGE e qualsiasi effetto mediato da IL-33/RAGE. Gli anticorpi della presente invenzione possono agire legandosi direttamente a IL-33-DSB e attenuando o inibendo l'interazione di ligando/recettore con RAGE o in alternativa possono legarsi a redIL-33 e prevenire o ridurre la sua conversione all'IL-33-DSB attenuando o inibendo in tal modo indirettamente l'interazione di ligando/recettore con RAGE.

BREVE SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Secondo la presente invenzione, viene fornito un anticorpo isolato che si lega a redIL-33, o a un relativo frammento di legame all'antigene, in cui l'anticorpo o il relativo frammento di legame all'antigene comprende una VHCDR1 avente la sequenza di SEQ ID NO: 543, una VHCDR2 avente la sequenza di SEQ ID NO: 544, una VHCDR3 avente la sequenza di SEQ ID NO: 545, una VLCDR1 avente la sequenza di SEQ ID NO: 548, una VLCDR2 avente la sequenza di SEQ ID NO: 549, e una VLCDR3 avente la sequenza di SEQ ID NO: 550.

Descriviamo anche IL-33 isolata in una forma ridotta (redIL-33) o un relativo frammento di legame.

Secondo un aspetto della divulgazione viene fornita una proteina IL-33 isolata stabilizzata in una forma ridotta mediante una modificazione che previene la formazione di ponti disolfuro tra le cisteine native. Tali modificazioni possono comprendere la delezione di uno o più residui di cisteina, mutazioni che sostituiscono una o più cisteine native con un amminoacido alternativo e/o la coniugazione con un'entità chimica.

Secondo un aspetto è descritta una forma mutata di IL-33 come descritta nel presente documento, in particolare come mostrato in SEQ ID NO: da 634 a 648.

Secondo un aspetto l'entità chimica è la biotina, che riduce o elimina la capacità di redIL-33 di essere convertita in IL-33-DSB.

Secondo un aspetto viene descritto un mutante IL-33 in cui una o più cisteine sono sostituite con un amminoacido non cisteina, per esempio in cui una, due, tre, quattro o più cisteine selezionate da Cys-208, Cys-227, Cys -232 e Cys-259 vengono sostituite, per esempio, con un amminoacido come la serina. Secondo un aspetto il residuo di cisteina è indipendentemente selezionato da Cys-208, Cys-227, Cys-232 e Cys-259. Quindi, secondo un aspetto, un mutante secondo la presente divulgazione non è in grado di formare uno o entrambi i legami disolfuro nell'IL-33-DSB.

Secondo un aspetto la presente divulgazione è diretta a una molecola di legame isolata che attenua l'attività di redIL-33, inclusa una relativa forma stabilizzata secondo la presente divulgazione, per esempio inibisce detta attività. Secondo un aspetto l'attenuazione avviene specificamente attraverso il legame a redIL-33. Secondo un aspetto l'attenuazione avviene attraverso il legame a IL-33-DSB e, per esempio, catalizzando o accelerando la conversione di redIL-33 in IL-33-DSB.

Secondo un aspetto l'attenuazione sottoregola o disattiva la segnalazione dipendente da ST2.

Secondo determinati aspetti, la molecola di legame o l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene della presente divulgazione inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33, per esempio nei mastociti.

Secondo un aspetto l'attenuazione sottoregola o previene il rilascio di IL-5 dalla via ST2.

Secondo un aspetto l'attenuazione sottoregola o previene l'attivazione degli eosinofili.

Secondo un aspetto l'attenuazione sottoregola o previene il rilascio di NFκB. Secondo un aspetto l'attenuazione sottoregola o previene il rilascio di IL-4. Secondo un aspetto l'attenuazione sottoregola o previene il rilascio di IL-6. Secondo un aspetto l'attenuazione sottoregola o previene il rilascio di IL-8. Secondo un aspetto l'attenuazione sottoregola o previene il rilascio di IL-13.

Secondo determinati aspetti, la molecola di legame o l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene della presente divulgazione attenua o inibisce la segnalazione mediata da IL-33/RAGE. L'attenuazione o inibizione della segnalazione mediata da RAGE può potenziare la migrazione epiteliale rispetto a quella osservata in una risposta infiammatoria guidata da IL-33 non modulata (si veda la Figura 58). Tale migrazione epiteliale potenziata può svolgere un ruolo nella riparazione dei tessuti e nella guarigione delle ferite, in particolare nel tessuto polmonare, come l'epitelio polmonare.

Secondo un aspetto, la presente divulgazione è diretta a una molecola di legame isolata che si lega specificamente a redIL-33 o a un frammento di legame di redIL-33.

Secondo un aspetto, la presente divulgazione è diretta a una molecola di legame isolata che si lega specificatamente a redIL-33 e inibisce il legame della stessa a ST2.

Secondo un aspetto, la presente divulgazione è diretta a una molecola di legame isolata che si lega specificamente a redIL-33 e inibisce la segnalazione di redIL-33 bloccando fisicamente l'interazione di IL-33 con il suo recettore.

Secondo un aspetto, la presente divulgazione è diretta a una molecola che si lega a IL-33 e catalizza la conversione di redIL-33 in IL-33-DSB, sottoregolando in tal modo o disattivando la segnalazione di ST-2.

Secondo un aspetto, la presente divulgazione è diretta a una molecola di legame con una modalità di azione competitiva.

Secondo un aspetto, la presente divulgazione è diretta a una molecola di legame con una modalità di azione allosterica.

Secondo alcuni aspetti, la molecola di legame dell'invenzione comprende un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene.

La formula descritta impiega il codice di amminoacido a una sola lettera.

Una molecola di legame dell'invenzione comprende una regione variabile pesante comprendente SEQ ID NO: 543 per CDRH1, SEQ ID NO: 544 per CDRH2 e SEQ ID NO: 545 per CDRH3 e almeno una CDR in una regione variabile a catena leggera selezionata indipendentemente da SEQ ID NO: 548, 549 e 550, in particolare una

regione variabile leggera comprendente SEQ ID NO: 548 per CDRL1, SEQ ID NO: 549 per CDRL2 e SEQ ID NO: 550 per CDRL3.

In una forma di realizzazione la molecola di legame comprende una regione variabile a catena pesante di SEQ ID NO: 542 e una regione variabile a catena leggera di SEQ ID NO: 547.

In una forma di realizzazione la molecola di legame comprende una regione variabile pesante di SEQ ID NO: 616 e una regione variabile leggera di SEQ ID NO: 618.

Secondo un altro aspetto, la presente divulgazione è diretta a un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene che si lega specificamente a IL-33, comprendente una VH e una VL, in cui la VH ha una sequenza amminoacidica almeno del 90%, per esempio del 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% identica a una VH come divulgata sopra, ad esempio SEQ ID NO: 182 o SEQ ID NO 616

Secondo un altro aspetto, la presente divulgazione è diretta a un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene che si lega specificamente a IL-33, comprendente una VH e una VL, in cui una VH come divulgata sopra, ad esempio, in SEQ ID NO: 182 o SEQ ID NO 616, ha una sequenza con 1, 2, 3 o 4 amminoacidi nell'intelaiatura indipendentemente sostituiti con un amminoacido diverso o deleti.

Secondo un altro aspetto, la presente divulgazione è diretta a un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene che si lega specificamente a IL-33, comprendente una VH e una VL, in cui la

VL ha una sequenza amminoacidica almeno del 90%, per esempio del 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% identica a una VL come divulgata sopra, ad esempio, SEQ ID NO: 187 o SEQ ID NO 618.

Secondo un altro aspetto, la presente divulgazione è diretta a un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene che si lega specificamente a IL-33, comprendente una VH e una VL, in cui una VL divulgata sopra, ad esempio, in SEQ ID NO: 187 o SEQ ID NO 618, ha una sequenza con 1, 2, 3 o 4 amminoacidi nell'intelaiatura indipendentemente sostituiti con un amminoacido diverso o deleti.

Secondo un altro aspetto, la presente divulgazione è diretta a un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene che si lega specificamente a IL-33, comprendente una VH e una VL, in cui la VH ha una sequenza amminoacidica almeno del 90%, per esempio del 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% identica a una VH come divulgata sopra, ad esempio SEQ ID NO: 182 o SEQ ID NO. 616, e una VL ha una sequenza amminoacidica almeno del 90%, per esempio del 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% identica a una VL come divulgata sopra, ad esempio SEQ ID NO: 187 o SEQ ID NO 618.

Secondo un altro aspetto, la presente divulgazione è diretta a un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene che si lega specificamente a IL-33, comprendente una VH e una VL, in cui una VH come divulgata sopra ad esempio SEQ ID NO: 182 o SEQ ID NO 616 ha una sequenza con 1, 2, 3 o 4 amminoacidi nell'intelaiatura che vengono indipendentemente sostituiti con un amminoacido diverso

o deleti, una VL divulgata sopra, ad esempio in SEQ ID NO: 187 o SEQ ID NO 618 ha una sequenza con 1, 2, 3 o 4 amminoacidi nell'intelaiatura che vengono indipendentemente sostituiti con un amminoacido diverso o deleti.

Secondo un aspetto viene descritto un anticorpo o frammento di legame che blocca in modo crociato una molecola di legame, per esempio un anticorpo o frammento di legame secondo la presente divulgazione, in particolare in cui detto anticorpo o frammento di legame si lega allo stesso epitopo di una molecola divulgata nel presente documento.

In alcune forme di realizzazione, la molecola di legame o l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene è un anticorpo umano, un anticorpo chimerico o un anticorpo umanizzato. In alcune forme di realizzazione, la molecola di legame o l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene è un anticorpo presente in natura, un frammento scFv, un frammento Fab, un frammento F(ab')₂, un minibody, un diabody, un triabody, un tetrabody, o un anticorpo a catena singola. In alcune forme di realizzazione, la molecola di legame o l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene è un anticorpo monoclonale.

In un'altra forma di realizzazione, la presente divulgazione è diretta a un polinucleotide codificante la molecola di legame o l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene della divulgazione, in particolare come descritto nel presente documento. In

determinate forme di realizzazione, il polinucleotide codifica la VH di un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene della divulgazione. In determinate forme di realizzazione, il polinucleotide codifica una VL di un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene della divulgazione.

In alcune forme di realizzazione, la divulgazione è diretta a un vettore comprendente il polinucleotide della divulgazione.

In alcune forme di realizzazione, la divulgazione è diretta a una composizione comprendente il polinucleotide o un vettore della divulgazione.

In un'altra forma di realizzazione, viene fornita una cellula ospite comprendente il polinucleotide o un vettore della divulgazione.

In un'altra forma di realizzazione, la divulgazione nel presente documento è diretta a un metodo per produrre un anticorpo anti-IL-33 o relativo frammento di legame all'antigene, comprendente la coltura della cellula ospite della divulgazione e il recupero di detto anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene. In alcune forme di realizzazione, la divulgazione è diretta a un anticorpo anti-IL-33 o relativo frammento di legame all'antigene prodotto mediante un metodo della divulgazione.

In un'altra forma di realizzazione, la divulgazione è diretta a una composizione farmaceutica comprendente una molecola di legame o un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene della divulgazione e a un trasportatore.

Secondo un altro aspetto, la divulgazione è diretta a un metodo per trattare un soggetto con una condizione infiammatoria comprendente somministrare a detto soggetto una quantità efficace di un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene secondo la presente divulgazione che inibisce la produzione di citochine guidate da IL-33.

Secondo un altro aspetto, viene descritto un metodo per trattare un soggetto con una condizione infiammatoria comprendente somministrare una molecola di legame della presente divulgazione o una composizione comprendente la stessa.

Secondo un aspetto viene fornita una molecola di legame della presente divulgazione o una composizione comprendente la stessa per l'uso nel trattamento, per esempio di una condizione infiammatoria, in particolare come descritta nel presente documento.

In una forma di realizzazione viene fornito l'uso di una molecola di legame della presente divulgazione o di una composizione comprendente la stessa nella fabbricazione di un medicamento per il trattamento o la prevenzione di una condizione infiammatoria.

In una forma di realizzazione la condizione infiammatoria è selezionata tra asma, broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), rinosinusite cronica, malattia fibroproliferativa (per esempio, fibrosi polmonare), eosinofilia polmonare, neoplasia pleurica, artrite reumatoide, malattia vascolare del collagene, malattia vascolare aterosclerotica, uticaria, malattia infiammatoria intestinale (per esempio,

malattia di Crohn o celiachia), lupus eritematoso sistemico, sclerosi sistemica progressiva, granulomatosi di Wegner, shock settico e malattia di Bechet.

In alcune forme di realizzazione, la condizione infiammatoria è un disturbo allergico, per esempio, asma, rinosinusite cronica, allergia alimentare, eczema o dermatite, in particolare asma, come asma refrattaria (a cui viene fatto riferimento anche come asma grave).

In alcune forme di realizzazione la risposta o condizione infiammatoria si trova nelle vie aeree di detto soggetto.

In una forma di realizzazione la risposta o condizione infiammatoria è nella muscolatura liscia.

Secondo un altro aspetto, la divulgazione è diretta a un metodo per prevenire una risposta infiammatoria in un soggetto comprendente somministrare a detto soggetto una quantità efficace di un anticorpo o di relativo frammento di legame all'antigene che si lega a IL-33 e non blocca IL-33 nel legarsi a ST2 in cui la segnalazione ST2 è ridotta.

Secondo un altro aspetto, la divulgazione è diretta a un metodo per prevenire una risposta infiammatoria in un soggetto comprendente somministrare a detto soggetto una quantità efficace di un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene secondo la presente divulgazione che inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

Secondo un altro aspetto, la divulgazione è diretta a un metodo per prevenire una risposta infiammatoria in un soggetto comprendente somministrare a detto soggetto una quantità efficace di una molecola di

legame o un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene della divulgazione.

Secondo un altro aspetto, la divulgazione è diretta a un metodo per identificare un anticorpo terapeutico o relativo frammento di legame all'antigene comprendente selezionare un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene che si lega a IL-33, in cui detto anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene non blocca IL-33 dal legarsi a ST2 e inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

Secondo un aspetto viene descritto immunizzare un ospite con redIL-33, per esempio stabilizzato nella forma ridotta, o un relativo mutante che ha una capacità ridotta di formare legami disolfuro, in particolare una capacità ridotta di formare un legame disolfuro in una o più posizioni indipendentemente selezionate da Cys-208, Cys-227, Cys-232 e Cys-259. Secondo un aspetto, il metodo comprende inoltre le fasi di schermare gli anticorpi dall'ospite, per esempio impiegando saggi funzionali e isolando e/o replicando almeno le regioni variabili da almeno uno dei detti anticorpi.

Secondo un altro aspetto viene descritto l'uso di redIL-33, per esempio stabilizzato nella forma ridotta, o un relativo mutante che ha una capacità ridotta di formare legami disolfuro, in particolare una capacità ridotta di formare un legame disolfuro in una o più posizioni indipendentemente selezionate da Cys-208, Cys-227, Cys-232 e Cys-259, per identificare un inibitore della segnalazione ST2, in particolare un anticorpo o relativo frammento di legame specifico per redIL-33.

Secondo un aspetto, l'uso impiega l'interrogazione di una libreria, per esempio una libreria di anticorpi di visualizzazione dei fagi che impiega detta proteina o relativo frammento attivo.

Secondo alcuni aspetti, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene della divulgazione non inibisce la segnalazione di NFkB.

Secondo un aspetto viene descritto un metodo per identificare o generare una molecola di legame della presente divulgazione che impiega redIL-33 o un mutante della presente divulgazione (a cui viene fatto riferimento collettivamente come una proteina della presente divulgazione). Secondo un aspetto, il metodo comprende la fase di interrogare una libreria con le proteine della presente divulgazione per identificare una molecola di legame. Secondo un aspetto, il metodo comprende immunizzare un ospite con una proteina della presente divulgazione.

Secondo un aspetto viene fornito un epitopo da IL-33, che è legato da una molecola di legame, come un anticorpo o relativo frammento di legame, come divulgato nel presente documento, in particolare un epitopo catalitico, vale a dire, un epitopo il cui legame aumenta la velocità di conversione della forma ridotta di IL-33 alla forma ossidata.

Secondo un altro aspetto, la divulgazione è diretta a un metodo per rilevare l'espressione di redIL-33 in un campione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

I. Definizioni

"Isolata" come impiegato nel presente documento si riferisce a una proteina in un ambiente non naturale in particolare isolata dalla natura, per esempio il termine non include la proteina *in vivo*, né la proteina in un campione prelevato da un corpo umano o animale. Generalmente le proteine saranno in un trasportatore come un liquido o un terreno, o possono essere formulate, congelate o liofilizzate e tutte queste forme possono essere inglobate da "isolata" ove appropriato. In una forma di realizzazione, isolata non si riferisce alla proteina in un gel, per esempio un gel impiegato in un'analisi Western blot o simile.

Proteina IL-33 come impiegato nel presente documento si riferisce a interleuchina 33, in particolare a una proteina di interleuchina 33 di mammifero, per esempio una proteina umana depositata con numero UniProt O95760. Tuttavia, date le scoperte dei presenti inventori, è chiaro che questa entità non è una singola specie ma esiste invece come forma ridotta e ossidata. Data la rapida ossidazione della forma ridotta *in vivo*, per esempio nel periodo da 5 minuti a 40 minuti, e *in vitro*, i riferimenti generalmente dell'arte antecedente a IL-33 sono infatti riferimenti alla forma ossidata. Per di più, i saggi commerciali risulta quantifichino questa forma ossidata.

Le espressioni IL-33 ossidata, IL-33-DSB (legata con disolfuro) e IL-33 DSB sono impiegate nel presente documento in modo intercambiabile.

IL-33 ossidata come impiegato nel presente documento si riferisce a una proteina visibile come una banda distinta, per esempio mediante analisi western blot in condizioni non riducenti, in particolare con una massa da 4 Da inferiore rispetto alla corrispondente forma ridotta. In particolare, si riferisce a una proteina con uno o due legami disolfuro tra le cisteine indipendentemente selezionate dalle cisteine 208, 227, 232 e 259. In una forma di realizzazione, l'IL-33 ossidata non mostra alcun legame a ST2.

Le espressioni IL-33 ridotta e redIL-33 sono impiegate nel presente documento in modo intercambiabile.

IL-33 ridotta come impiegato nel presente documento si riferisce alla forma dell'IL-33 che si lega a ST2 e innesca la segnalazione dipendente da ST2. In particolare, le cisteine 208, 227, 232 e 259 della forma ridotta non sono legate con disolfuro. Un frammento attivo di redIL-33 come impiegato nel presente documento si riferisce a un frammento con attività paragonabile a redIL-33, per esempio un'entità simile di segnalazione dipendente da ST2. In una forma di realizzazione, un frammento attivo è il 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% dell'attività del redIL-33 a lunghezza intera.

Segnalazione dipendente da ST-2 come impiegato nel presente documento si riferisce al sistema IL-33/ST2 in cui il riconoscimento di IL-33 da parte di ST2 favorisce la dimerizzazione con IL1-RAcP sulla superficie cellulare e all'interno del reclutamento cellulare dei

componenti del complesso recettore MyD88, TRAF6 e IRAK1-4 al dominio TIR intracellulare. Quindi, la segnalazione dipendente da ST-2 può essere interrotta perturbando l'interazione di IL-33 con ST2 o in alternativa interrompendo l'interazione con IL-1RAcP.

"Stabilizzato in una forma ridotta" come impiegato nel presente documento si riferisce a una modificazione che incentiva le proteine ad adottare o rimanere nella forma ridotta o previene la formazione di IL-33 ossidata.

In una forma di realizzazione la stabilizzazione avviene mediante coniugazione a un'entità chimica, per esempio la biotinilazione. redIL-33 ha la tendenza a essere mono-biotinilata quando esposta a pH neutro al reagente reattivo -SH di biotina-BMCC (disponibile da Thermo scientific). L'analisi eseguita dai presenti inventori suggerisce che la biotinilazione si verifica in Cys208. La biotinilazione in questa posizione risulta bloccare e/o ridurre l'ossidazione della proteina. Pur non volendo essere vincolati dalla teoria, l'analisi *in silico* eseguita dagli inventori suggerisce che Cys208 è un potenziale iniziatore delle attività richieste per i cambiamenti conformazionali e l'ossidazione della proteina.

In una forma di realizzazione la stabilizzazione è la biotinilazione in Cys208.

In una forma di realizzazione Cys208 è sostituito da un amminoacido, come la serina. In una forma di realizzazione Cys227 è sostituito da un amminoacido, come la serina. In una forma di

realizzazione Cys232 è sostituito da un amminoacido, come la serina. In una forma di realizzazione Cys259 è sostituito da un amminoacido, come la serina. In una forma di realizzazione, Cys208 e 227 sono indipendentemente sostituiti da un amminoacido, come la serina. In una forma di realizzazione, Cys208 e 232 sono indipendentemente sostituiti da un amminoacido, come la serina. In una forma di realizzazione, Cys208 e 259 sono indipendentemente sostituiti da un amminoacido, come la serina. In una forma di realizzazione, Cys208, 227 e 232 sono indipendentemente sostituiti da un amminoacido, come la serina. In una forma di realizzazione, Cys208, 227 e 259 sono indipendentemente sostituiti da un amminoacido, come la serina. In una forma di realizzazione, Cys208, 232 e 259 sono indipendentemente sostituiti da un amminoacido, come la serina. In una forma di realizzazione, Cys227, 232 e 259 sono indipendentemente sostituiti da un amminoacido, come la serina. In una forma di realizzazione, Cys208, 227, 232 e 259 sono indipendentemente sostituiti da un amminoacido, come la serina.

Mutazione come impiegato nel presente documento si riferisce a un cambiamento nella sequenza amminoacidica o a un cambiamento in una sequenza polinucleotidica tale che l'amminoacido codificato dal polinucleotide è diverso o qualche altro tangibile, per esempio viene conseguita una differenza funzionale. In particolare, il cambiamento può comprendere la delezione o sostituzione di un residuo amminico. L'ottimizzazione del codone o ridondanza nel codice genetico non è una mutazione nel contesto della presente domanda.

La mutazione verrà generalmente impiegata nel presente documento laddove vi sia un cambiamento di sequenza amminoacidica o polinucleotidica nella proteina nativa o di tipo selvatico, mentre la variante verrà impiegata quando si esamineranno i cambiamenti a sequenze nuove.

Nativo come impiegato nel presente documento si riferisce a un'entità, come un amminoacido che si trova nella sequenza di tipo selvatico o è altrimenti presente in natura.

Coniugato come impiegato nel presente documento si riferisce a una connessione che unisce due entità o frammenti, per esempio un legame, come un legame covalente.

Un'entità come impiegata nel presente documento si riferisce a un "elemento", molecola, frammento, atomo, componente o simili.

Un'entità chimica è una molecola o frammento del tipo preparati mediante processi chimici sintetici.

In una forma di realizzazione, la stabilizzazione avviene per mutazione della proteina IL-33, per esempio, una mutazione puntiforme, in particolare, sostituendo uno o più amminoacidi di cisteina con un amminoacido alternativo, per esempio la serina. Un amminoacido alternativo come impiegato in questo contesto si riferisce a un amminoacido non cisteina. In una forma di realizzazione, l'amminoacido è un amminoacido non presente in natura. In una forma di realizzazione, l'amminoacido è un amminoacido presente in natura. In una forma di realizzazione, l'amminoacido è proteico. In una forma di realizzazione,

l'amminoacido è serina, il che è vantaggioso poiché è una sostituzione conservativa e generalmente l'attività della proteina viene mantenuta, dopo questa sostituzione.

La stabilizzazione del redIL-33 è importante poiché fissa la forma di IL-33 nella conformazione attiva, che a sua volta può essere usata come uno strumento per trovare anticorpi, o relativi frammenti di legame all'antigene, che attenuano l'attività della proteina. In una forma di realizzazione, la proteina stabilizzata viene impiegata per interrogare una libreria di molecole come una libreria fagica di anticorpi o librerie sintetiche di anticorpi. In una forma di realizzazione, la proteina stabilizzata viene impiegata per immunizzare un ospite, fornendo in tal modo per la prima volta un'opportunità per generare anticorpi specifici per la forma ridotta.

"Attenua l'attività di" come impiegato nel presente documento si riferisce alla riduzione dell'attività pertinente o all'arresto dell'attività pertinente. Generalmente, i termini attenuazione e inibizione sono impiegati in modo intercambiabile nel presente documento salvo il contesto non indichi diversamente.

In una forma di realizzazione l'attenuazione avviene mediante legame a redIL-33. In una forma di realizzazione l'anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene è specifico per redIL-33, vale a dire che ha un'affinità maggiore per redIL-33 rispetto alla forma ossidata, per esempio maggiore di 1, 2, 3, 4, 5 affinità o superiore. A ciò viene

fatto riferimento nel presente documento come un anticorpo specifico per redIL-33.

In una forma di realizzazione, un anticorpo specifico per redIL-33 si lega in modo tale da bloccare in modo sterico il legame al recettore ST2.

In una forma di realizzazione, un anticorpo specifico per redIL-33 si lega in modo tale da bloccare in modo sterico il legame al recettore IL-1RAcP.

In una forma di realizzazione, un anticorpo specifico per redIL-33 si lega in modo tale da bloccare in modo allosterico il legame al recettore ST2.

In una forma di realizzazione, un anticorpo specifico redIL-33 si lega in modo tale da bloccare in modo allosterico il legame al recettore IL-1RAcP.

In una forma di realizzazione, un anticorpo specifico per redIL-33 si lega in modo tale da bloccare in modo allosterico la segnalazione attraverso il recettore ST2, ma può legare ST2 e/o IL-1RAcP.

In una forma di realizzazione, l'anticorpo lega la forma ossidata di IL-33 e catalizza la conversione dalla forma ridotta alla forma ossidata. Pur non volendo essere vincolati dalla teoria, è possibile che legando la forma ossidata, l'equilibrio del processo venga cambiato a favore della conversione alla forma ossidata.

Occorre notare che l'espressione "un" o "una" entità si riferisce a una o più di tali entità; per esempio, resta inteso che "un anticorpo

anti-IL-33" rappresenta uno o più anticorpi anti-IL-33. Di conseguenza, i termini "un/uno" (o "un'/una"), "uno/a o più" e "almeno uno/a" possono essere usati in modo intercambiabile nel presente documento.

Come usato nel presente documento, il termine "polipeptide" intende inglobare un "polipeptide" singolare nonché "polipeptidi" plurali e si riferisce a una molecola composta da monomeri (amminoacidi) collegati linearmente mediante legami ammidici (noti anche come legami peptidici). Il termine "polipeptide" si riferisce a qualsiasi catena o catene di due o più amminoacidi e non si riferisce a una lunghezza specifica del prodotto. Quindi, peptidi, dipeptidi, tripeptidi, oligopeptidi, "catena amminoacidica" o qualsiasi altro termine/espressione usati per riferirsi a una catena o catene di due o più amminoacidi sono inclusi nella definizione di "polipeptide" e il termine "polipeptide" può essere usato al posto di, o in modo intercambiabile con qualsiasi di questi termini/espressioni. Il termine "polipeptide" intende anche riferirsi ai prodotti di modificazioni post-espressione del polipeptide, incluse, senza limitazione, glicosilazione, acetilazione, fosforilazione, ammidazione, derivatizzazione mediante gruppi protettivi/bloccanti noti, scissione proteolitica o modificazione mediante amminoacidi non presenti in natura. Un polipeptide può essere derivato da una sorgente biologica naturale o prodotto mediante tecnologia ricombinante, ma non è necessariamente tradotto da una sequenza di acido nucleico designata. Può essere generato in un qualsiasi modo, incluso mediante sintesi chimica.

Ai polipeptidi con una struttura tridimensionale definita viene fatto riferimento anche come ripiegati e ai polipeptidi che non possiedono una struttura tridimensionale definita, al contrario possono adottare un cospicuo numero di conformazioni diverse, viene fatto riferimento come dispiegati. Come usato nel presente documento, il termine glicoproteina si riferisce a una proteina accoppiata ad almeno una frazione funzionale di carboidrato che è attaccata alla proteina tramite una catena laterale contenente ossigeno o contenente azoto di un residuo amminoacidico, ad esempio, un residuo di serina o un residuo di asparagina.

Con un polipeptide "isolato" o un relativo frammento, variante o derivato si intende riferirsi a un polipeptide che non si trova nel suo ambiente naturale. Non è richiesto alcun particolare livello di purificazione. Per esempio, un polipeptide isolato può essere rimosso dal suo ambiente nativo o naturale. I polipeptidi prodotti in modo ricombinante e le proteineesprese nelle cellule ospiti sono considerati isolati ai fini della divulgazione, così come i polipeptidi nativi o ricombinanti che sono stati separati, frazionati o parzialmente o sostanzialmente purificati mediante qualsiasi tecnica idonea.

Proteina come impiegato nel presente documento si riferisce a un polipeptide con struttura secondaria e terziaria.

Inoltre, come polipeptidi della presente divulgazione sono inclusi frammenti, derivati, analoghi o varianti dei precedenti polipeptidi e qualsiasi relativa combinazione.

I termini " frammento", "variante", "derivato" e "analogo", per esempio quando si fa riferimento a una proteina o un polipeptide della presente divulgazione, come anticorpi anti-IL-33 o polipeptidi anticorpali della presente divulgazione includono qualsiasi polipeptide che conservi almeno alcune delle proprietà di legame all'antigene del corrispondente anticorpo o polipeptide anticorpale della divulgazione. Frammenti di polipeptidi della presente divulgazione includono frammenti proteolitici, nonché frammenti di delezione, oltre a frammenti di anticorpi specifici esaminati altrove nel presente documento. Varianti di anticorpi anti-IL-33 e polipeptidi anticorpali della presente divulgazione includono frammenti come descritto sopra, e anche polipeptidi con sequenze amminoacidiche alterate dovute a sostituzioni, delezioni o inserzioni di amminoacidi. Varianti possono essere presenti in natura o non presenti in natura. Varianti non presenti in natura possono essere prodotte usando tecniche di mutagenesi note nell'arte.

I polipeptidi varianti possono comprendere sostituzioni, delezioni o addizioni di amminoacidi conservative o non conservative. Ai polipeptidi varianti può essere fatto riferimento nel presente documento anche come "analoghi del polipeptide". Come usato nel presente documento, un "derivato", per esempio, di un anticorpo anti-IL-33 o di un polipeptide anticorpale, si riferisce a un polipeptide in oggetto avente uno o più residui derivatizzati chimicamente dalla reazione di un gruppo laterale funzionale. Sono inclusi anche come "derivati" quei peptidi che contengono uno o più derivati amminoacidici presenti in

natura dei venti amminoacidi standard. Per esempio, 4-idrossiprolina può essere sostituita a prolina; 5-idrossilisina può essere sostituita a lisina; 3-metilistidina può essere sostituita a istidina; omoserina può essere sostituita a serina; e ornitina può essere sostituita a lisina. Derivati di anticorpi anti-IL-33 e polipeptidi anticorpali della presente divulgazione, possono includere polipeptidi che sono stati alterati in modo da presentare caratteristiche aggiuntive non riscontrate sull'anticorpo o sul polipeptide anticorpale di riferimento della divulgazione.

Il termine "polinucleotide" intende inglobare un acido nucleico singolare nonché acidi nucleici plurali, e si riferisce a una molecola o costrutto di acido nucleico isolato, ad esempio RNA messaggero (mRNA) o DNA plasmidico (pDNA). Un polinucleotide può comprendere un legame fosfodiesterico convenzionale o un legame non convenzionale (*ad esempio*, un legame ammidico, come riscontrato negli acidi peptidonucleici (PNA)). L'espressione "acido nucleico" si riferisce a uno qualsiasi o più segmenti di acido nucleico, *ad esempio*, frammenti di DNA o RNA, presenti in un polinucleotide. Per acido nucleico o polinucleotide "isolato" si intende una molecola di acido nucleico, DNA o RNA, che è stata rimossa dal suo ambiente nativo. Per esempio, un polinucleotide ricombinante codificante un anticorpo anti-IL-33 o relativo frammento di legame all'antigene contenuto in un vettore è considerato isolato ai fini della presente divulgazione. Ulteriori esempi di un polinucleotide isolato includono polinucleotidi ricombinanti mantenuti in

cellule ospiti eterologhe o polinucleotidi (parzialmente o sostanzialmente) purificati in soluzione. Molecole di RNA isolato includono trascritti di RNA *in vivo* o *in vitro* di polinucleotidi della presente divulgazione. Polinucleotidi o acidi nucleici isolati secondo la presente divulgazione includono inoltre tali molecole prodotte sinteticamente. In aggiunta, un polinucleotide o acido nucleico può essere o può includere un elemento regolatore come un promotore, un sito di legame ribosomiale, o un terminatore di trascrizione.

Come usata nel presente documento, una "regione codificante" è una porzione di acido nucleico che è costituita da codoni tradotti in amminoacidi. Sebbene un "codone di arresto" (TAG, TGA o TAA) non sia tradotto in un amminoacido, può essere considerato come parte di una regione codificante, ma qualsiasi sequenza fiancheggiante, per esempio promotori, siti di legame ribosomiali, terminatori di trascrizione, introni e simili, non fanno parte di una regione codificante. Due o più regioni codificanti della presente divulgazione possono essere presenti in un singolo costrutto polinucleotidico, ad esempio, su un singolo vettore, o in costrutti polinucleotidici separati, ad esempio, su vettori separati (diversi). Per di più, qualsiasi vettore può contenere una singola regione codificante, o può comprendere due o più regioni codificanti, *ad esempio*, un singolo vettore può codificare separatamente una regione variabile della catena pesante dell'immunoglobulina e una regione variabile della catena leggera dell'immunoglobulina. In aggiunta, un vettore, un polinucleotide o un

acido nucleico della divulgazione possono codificare regioni codificanti eterologhe, fuse o non fuse a un acido nucleico codificante un anticorpo anti-IL-33 o relativo frammento, variante o derivato. Le regioni codificanti eterologhe includono senza limitazione elementi specializzati o motivi, come un peptide segnale secretorio o un dominio funzionale eterologo.

In determinate forme di realizzazione, il polinucleotide o acido nucleico è DNA. Nel caso del DNA, un polinucleotide comprendente un acido nucleico che codifica un polipeptide normalmente può includere un promotore e/o altri elementi di controllo della trascrizione o traduzione operativamente associati a una o più regioni codificanti. Un'associazione operabile è quando una regione codificante per un prodotto genico, ad esempio, un polipeptide, è associata a una o più sequenze regolatrici in modo tale da porre l'espressione del prodotto genico sotto l'influenza o il controllo dell'una o più sequenze regolatrici. Due frammenti di DNA (come una regione codificante il polipeptide e un promotore a essa associato) sono "operativamente associati" se l'induzione della funzione del promotore risulta nella trascrizione dell'mRNA codificante il prodotto genico desiderato e se la natura del collegamento tra i due frammenti di DNA non interferisce con la capacità delle sequenze regolatrici di espressione di dirigere l'espressione del prodotto genico o interferire con la capacità di trascrizione del modello di DNA. Quindi, una regione del promotore sarebbe operativamente associata con un acido nucleico codificante un

polipeptide se il promotore fosse in grado di effettuare la trascrizione di quell'acido nucleico. Il promotore può essere un promotore specifico della cellula che dirige la trascrizione sostanziale del DNA solo in cellule predeterminate. Altri elementi di controllo della trascrizione, oltre a un promotore, per esempio potenziatori, operatori, repressori e segnali di terminazione della trascrizione, possono essere operativamente associati al polinucleotide per dirigere la trascrizione specifica della cellula. Promotori idonei e altre regioni di controllo della trascrizione sono divulgati nel presente documento.

Una varietà di regioni di controllo della trascrizione è nota ai tecnici del ramo. Queste includono, senza limitazione, regioni di controllo della trascrizione che funzionano nelle cellule dei vertebrati, come, ma non limitate a, segmenti di promotore e potenziatore da citomegalovirus (il promotore precoce immediato, in combinazione con l'introne-A), simian virus 40 (il promotore precoce), e retrovirus (come il virus del sarcoma di Rous). Altre regioni di controllo della trascrizione includono quelle derivate da geni di vertebrati come actina, proteina da shock termico, ormone della crescita bovino e β -globina di coniglio, nonché altre sequenze in grado di controllare l'espressione genica nelle cellule eucariotiche. Ulteriori regioni di controllo della trascrizione idonee includono promotori e potenziatori tessuto-specifici nonché promotori inducibili da linfocchine (ad esempio, promotori inducibili da interferoni o interleuchine).

Analogamente, una varietà di elementi di controllo della traduzione è nota ai tecnici del ramo di ordinaria competenza. Questi includono, ma non sono limitati a siti di legame ribosomiali, codoni di inizio e terminazione della traduzione, ed elementi derivati da picornavirus (in particolare un sito interno di entrata del ribosoma, o IRES, a cui viene fatto riferimento anche come sequenza CITE).

In altre forme di realizzazione, un polinucleotide della presente divulgazione è RNA, per esempio, sotto forma di RNA messaggero (mRNA).

Le regioni codificanti polinucleotidi e acidi nucleici della presente divulgazione possono essere associate a regioni codificanti aggiuntive che codificano peptidi secretori o di segnale, che dirigono la secrezione di un polipeptide codificato da un polinucleotide della presente divulgazione. Secondo l'ipotesi di segnale, le proteine secrete dalle cellule di mammifero hanno un peptide di segnale o una sequenza leader secretoria che viene scissa dalla proteina matura una volta iniziata l'esportazione della catena proteica in crescita attraverso il reticolo endoplasmatico ruvido. I tecnici del ramo di ordinaria competenza sono consapevoli del fatto che i polipeptidi secreti dalle cellule dei vertebrati hanno generalmente un peptide segnale fuso al N-terminale del polipeptide, che viene scisso dal polipeptide completo o "a lunghezza intera" per produrre una forma secreta o "matura" del polipeptide. In determinate forme di realizzazione, viene STATI UNITItto il peptide di segnale nativo, *ad esempio* un peptide di segnale di catena

pesante o catena leggera di immunoglobulina, o un derivato funzionale di quella sequenza che mantiene la capacità di dirigere la secrezione del polipeptide che è operativamente associato a esso. In alternativa, può essere usato un peptide di segnale di mammifero eterologo, o un relativo derivato funzionale. Per esempio, la sequenza leader di tipo selvatico può essere sostituita con la sequenza leader dell'attivatore tissutale del plasminogeno umano (TPA) o della β -glucuronidasi murina.

Un "anticorpo o un relativo frammento di legame all'antigene" della presente divulgazione si riferisce nel suo senso più ampio a un anticorpo, o a un relativo frammento di legame all'antigene, che si lega specificamente a un determinante antigenico. In una forma di realizzazione, l'anticorpo o un relativo frammento di legame all'antigene si lega specificamente a IL-33, in particolare redIL-33 o IL-33-DSB

In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, della divulgazione comprende almeno una CDR a catena pesante o leggera di una molecola di anticorpo di riferimento. In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, della divulgazione comprende almeno sei CDR da una o più molecole di anticorpi di riferimento.

La presente divulgazione è diretta a determinati anticorpi anti-IL-33, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene.

Anticorpo come impiegato nel presente documento si riferisce a una molecola di immunoglobulina come esaminato di seguito in

maggiore dettaglio, in particolare a un anticorpo a lunghezza intera o a una molecola comprendente un anticorpo a lunghezza intera, per esempio una mole di DVD-Ig e simili.

Un frammento di legame è un frammento di legame a epitopo/antigene di un frammento di anticorpo, per esempio comprendente un legame, in particolare comprendente 6 CDR, come 3 CDR nella regione variabile pesante e 3 CDR nella regione variabile leggera.

Salvo si riferisca specificamente ad anticorpi di dimensioni intere come gli anticorpi presenti in natura, l'espressione "anticorpi anti-IL-33" ingloba anticorpi di dimensioni intere nonché frammenti di legame all'antigene, varianti, analoghi o derivati di tali anticorpi, ad esempio, anticorpi presenti in natura o molecole di immunoglobulina o molecole di anticorpi ingegnerizzati o frammenti che si legano all'antigene in un modo simile alle molecole anticorpali.

Come usato nel presente documento, anticorpi "umani" o "interamente umani" includono anticorpi aventi la sequenza amminoacidica di un'immunoglobulina umana e includono anticorpi isolati da librerie di immunoglobuline umane o da animali transgenici per una o più immunoglobuline umane e che non esprimono immunoglobuline endogene. Gli anticorpi completamente umani sono particolarmente desiderabili per il trattamento terapeutico dei pazienti umani. Gli anticorpi umani possono essere prodotti mediante una varietà di metodi noti nell'arte, inclusi metodi di visualizzazione dei fagi

usando biblioteche di anticorpi derivati da sequenze di immunoglobuline umane come descritto in Vaughan et al., Nat. Biotech. 14:309-314 (1996), Sheets et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 95:6157-6162 (1998), Hoogenboom e Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1992), e Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581 (1991)). Le tecniche per la generazione e l'uso di librerie di fagi anticorpali sono anche descritte, *ad esempio*, nei Brevetti statunitensi n° 5,969,108, 6,172,197, 5,885,793, 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068; 6,706,484; e 7,264,963; e Rothe et al., J. Mol. Biol., 376:1382 (2008). In aggiunta, come noto nell'arte, gli anticorpi umani possono essere prodotti usando topi transgenici che sono incapaci di esprimere immunoglobuline endogene funzionali, ma che possono esprimere geni immunoglobulinici umani. Per una panoramica di questa tecnologia, si veda Lonberg e Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995). Gli anticorpi "umani" o "interamente umani" includono anche anticorpi comprendenti almeno il dominio variabile di una catena pesante, o almeno i domini variabili di una catena pesante e una catena leggera, dove l'uno o più domini variabili hanno la sequenza amminoacidica di uno o più domini variabili delle immunoglobuline umane.

Gli anticorpi "umani" o "interamente umani" includono anche anticorpi "umani" o "interamente umani", come descritto sopra, che comprendono, sono costituiti essenzialmente da, o sono costituiti da varianti (inclusi derivati) di molecole anticorpali (ad esempio, le regioni VH e/o le regioni VL) descritte nel presente documento, i quali anticorpi

o relativi frammenti si legano in modo immunospecifico a un polipeptide di IL-33 o frammento o relativa variante secondo la presente divulgazione.

Le tecniche standard note ai tecnici del ramo possono essere usate per introdurre mutazioni nella sequenza nucleotidica codificante per un anticorpo umano anti-IL-33, incluse, ma non limitate a, mutagenesi sito-diretta e mutagenesi mediata da PCR che determinano sostituzioni amminoacidiche. In una forma di realizzazione, le varianti (inclusi i derivati) codificano meno di 50 sostituzioni amminoacidiche, meno di 40 sostituzioni amminoacidiche, meno di 30 sostituzioni amminoacidiche, meno di 25 sostituzioni amminoacidiche, meno di 20 sostituzioni amminoacidiche, meno di 15 sostituzioni amminoacidiche, meno di 10 sostituzioni amminoacidiche, meno di 5 sostituzioni amminoacidiche, meno di 4 sostituzioni amminoacidiche, meno di 3 sostituzioni amminoacidiche o meno di 2 sostituzioni amminoacidiche rispetto alle CDRH1, CDRH2, CDRH3 di regione VH, CDRL1, CDRL2 o CDRL3 di regione VL di riferimento.

In determinate forme di realizzazione, le sostituzioni amminoacidiche sono sostituzioni amminoacidiche conservative, esaminate ulteriormente di seguito. In alternativa, le mutazioni possono essere introdotte in modo casuale lungo tutta o parte della sequenza codificante, ad esempio mediante mutagenesi di saturazione, e i mutanti risultanti possono essere sottoposti a screening per l'attività biologica per identificare mutanti che conservano l'attività (ad esempio,

la capacità di legare un polipeptide di IL-33, ad esempio, umana, di primate, murina o qualsiasi combinazione di IL-33 umana, di primate e murina). A tali varianti (o relativi derivati) di anticorpi "umani" o "interamente umani" può essere fatto riferimento come anticorpi umani o interamente umani che sono "ottimizzati" o "ottimizzati per il legame all'antigene" e includono, ma non sono limitati a, anticorpi che hanno una migliore affinità per l'antigene, anticorpi con specificità antigenica alterata o anticorpi con ridotte passività strutturali potenziali.

Le strutture immunoglobuliniche di base nei sistemi vertebrati sono relativamente ben comprese. Si veda, ad esempio, Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (2^a ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Come sarà esaminato più in dettaglio di seguito, il termine "immunoglobulina" comprende varie ampie classi di polipeptidi che possono essere distinti biochimicamente. I tecnici del ramo apprezzeranno che le catene pesanti sono classificate come gamma, mu, alfa, delta o epsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) con alcune sottoclassi tra loro (ad esempio, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). È la natura di questa catena che determina la "classe" dell'anticorpo come IgG, IgM, IgA IgG o IgE, rispettivamente. Le sottoclassi di immunoglobuline (isotipi), *ad esempio* IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, eccetera sono ben caratterizzate e sono note per conferire una specializzazione funzionale. Versioni modificate di ciascuna di queste classi e isotipi sono prontamente distinguibili dal tecnico del ramo in vista della presente divulgazione e, di conseguenza, rientrano

entro la portata della presente divulgazione. Sebbene la seguente disamina sarà generalmente diretta alla classe IgG di molecole di immunoglobuline, tutte le classi di immunoglobuline rientrano chiaramente entro la portata della presente divulgazione. Per quanto riguarda IgG, una molecola di immunoglobulina standard comprende due polipeptidi a catena leggera identici di peso molecolare di approssimativamente 23.000 Dalton e due polipeptidi a catena pesante identici di peso molecolare 53.000-70.000. Le quattro catene sono tipicamente unite da legami disolfuro in una configurazione "Y" in cui le catene leggere racchiudono le catene pesanti a partire dalla bocca della "Y" e proseguendo attraverso la regione variabile.

Le catene leggere sono classificate come kappa o lambda (κ , λ). Ciascuna classe di catena pesante può essere legata con una catena leggera kappa o lambda. In generale, le catene leggere e pesanti sono legate in modo covalente l'una all'altra e le porzioni di "coda" delle due catene pesanti sono legate l'una all'altra mediante collegamenti disolfuro covalenti o collegamenti non covalenti quando le immunoglobuline sono generate da ibridomi, cellule B o cellule ospiti geneticamente ingegnerizzate. Nella catena pesante, le sequenze amminoacidiche corrono da un N-terminale alle estremità biforcute della configurazione a Y al C-terminale nella parte inferiore di ciascuna catena.

La base dell'anticorpo "Y" è denominata la regione Fc (Frammento, cristallizzabile) ed è composta da due catene pesanti che

contribuiscono con due o tre domini costanti a seconda della classe dell'anticorpo. Quindi, la regione Fc si lega a una classe specifica di recettori Fc e ad altre molecole immunitarie, come le proteine di complemento. Sia la catena leggera sia quella pesante sono suddivise in regioni di omologia strutturale e funzionale. I termini "costante" e "variabile" sono usati funzionalmente. A questo proposito, si apprezzerà che i domini variabili di entrambe le porzioni di catena leggera (VL o V κ) e pesante (VH) determinano il riconoscimento e la specificità dell'antigene. Al contrario, i domini costanti della catena leggera (CL) e della catena pesante (CH1, CH2 o CH3) conferiscono proprietà biologiche importanti come secrezione, mobilità transplacentare, legame al recettore Fc, legame al complemento, e simili. Per convenzione, la numerazione dei domini della regione costante aumenta man mano che diventano più distali dal sito di legame all'antigene o dall'ammino-terminale dell'anticorpo. La porzione N-terminale è una regione variabile e alla porzione C-terminale è una regione costante; i domini CH3 e CL comprendono effettivamente il carbossi-terminale della catena pesante e leggera, rispettivamente.

Come indicato sopra, la regione variabile consente all'anticorpo di riconoscere selettivamente e legare specificamente gli epitopi sugli antigeni. Cioè, il dominio VL e il dominio VH, o sottoinsieme delle regioni determinanti la complementarità (CDR), entro questi domini variabili, di un anticorpo si combinano per formare la regione variabile che definisce un sito di legame all'antigene tridimensionale. Questa

struttura quaternaria di anticorpo forma il sito di legame all'antigene presente all'estremità di ciascun braccio della Y. Più specificamente, il sito di legame all'antigene è definito da tre CDR su ciascuna delle catene VH e VL. In alcuni casi, ad esempio, di determinate molecole di immunoglobuline derivate da specie di camelidi o ingegnerizzate sulla base di immunoglobuline di camelidi, una molecola di immunoglobulina completa può essere costituita solo da catene pesanti, senza catene leggere. Si veda, *ad esempio* Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993).

Negli anticorpi presenti in natura, le sei "regioni determinanti la complementarità" o "CDR" presenti in ciascun dominio di legame all'antigene sono brevi sequenze non contigue di amminoacidi che sono specificatamente posizionate per formare il dominio di legame all'antigene quando l'anticorpo assume la sua configurazione tridimensionale in un ambiente acquoso. Il resto degli amminoacidi nei domini di legame all'antigene, a cui viene fatto riferimento come regioni "di intelaiatura", mostrano una minore variabilità inter-molecolare. Le regioni di intelaiatura adottano in gran parte una conformazione a β -foglietto e le CDR formano anse che collegano, e in alcuni casi fanno parte, della struttura a β -foglietto. Quindi, le regioni di intelaiatura agiscono per formare un'impalcatura che fornisce il posizionamento delle CDR nell'orientamento corretto mediante interazioni inter-catena non covalenti. Il dominio di legame all'antigene formato dalle CDR posizionate definisce una superficie complementare all'epitopo

sull'antigene immunoreattivo. Questa superficie complementare favorisce il legame non covalente dell'anticorpo al suo epitopo affine. Gli amminoacidi comprendenti le CDR e le regioni di intelaiatura, rispettivamente, possono essere prontamente identificati per qualsiasi dato dominio variabile a catena pesante o leggera da un tecnico del ramo, poiché sono stati definiti con precisione (si veda di seguito).

Nel caso in cui vi siano due o più definizioni di un termine che è usato e/o accettato nell'arte, la definizione del termine, come usata nel presente documento, intende includere tutti questi significati salvo non sia esplicitamente dichiarato il contrario. Un esempio specifico è l'uso dell'espressione "regione determinante la complementarità" ("CDR") per descrivere i siti di combinazione di antigene non contigui trovati all'interno della regione variabile dei polipeptidi a catena sia pesante sia leggera. Questa particolare regione è stata descritta da Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" e da Chothia e Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), dove le definizioni includono la sovrapposizione o sottoinsiemi di residui amminoacidici quando confrontati l'uno con l'altro. Ciononostante, l'applicazione dell'una o dell'altra definizione per riferirsi a una CDR di un anticorpo o a relative varianti è intesa come rientrante entro la portata del termine come definito e usato nel presente documento. I residui amminoacidici appropriati che inglobano le CDR come definite da ciascuno dei riferimenti citati sopra sono esposti di seguito nella **Tabella 1** come confronto. I numeri esatti dei residui che

inglobano una particolare CDR variano a seconda della sequenza e delle dimensioni della CDR. I tecnici del ramo possono determinare di routine quali residui comprendono una particolare CDR data la sequenza amminoacidica di regione variabile dell'anticorpo.

Tabella 1. Definizioni di CDR¹

	Kabat	Chothia
CDR1 VH	31-35	26-32
CDR2 VH	50-65	52-58
CDR3 VH	95-102	95-102
CDR1 VL	24-34	26-32
CDR2 VL	50-56	50-52
CDR3 VL	89-97	91-96
¹ La numerazione di tutte le definizioni di CDR nella Tabella 1 è secondo le convenzioni di numerazione esposte da Kabat et al. (si veda di seguito).		

Kabat *et al.* hanno anche definito un sistema di numerazione per sequenze di domini variabili che è applicabile a qualsiasi anticorpo. Un tecnico del ramo di ordinaria competenza può assegnare senza ambiguità questo sistema di "numerazione Kabat" a qualsiasi sequenza di dominio variabile, senza avvalersi di alcun dato sperimentale oltre la sequenza stessa. Come usato nel presente documento, "numerazione Kabat" si riferisce al sistema di numerazione esposto da Kabat et al.

(1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest." Salvo diversamente specificato, riferimenti alla numerazione di posizioni di residui amminoacidici specifici in un anticorpo anti-IL-33 o di un relativo frammento, variante, o derivato di legame all'antigene della presente divulgazione sono secondo il sistema di numerazione di Kabat.

Anticorpi o frammenti di legame all'antigene, varianti o relativi derivati della divulgazione includono, ma non sono limitati a, anticorpi policlonali, monoclonali, multispecifici, di topo, umani, umanizzati, primatizzati o chimerici, anticorpi a catena singola, frammenti leganti epitopi, ad esempio, Fab, Fab' e F(ab')₂, Fd, Fvs a catena singola (scFv), Fvs disolfuro-collegato (sdFv), frammenti comprendenti un dominio VL o VH, frammenti prodotti da una libreria di espressione Fab, e anticorpi anti-idiotipici (anti-Id) (inclusi, ad esempio, anticorpi anti-Id per anticorpi anti-IL-33 divulgati nel presente documento). Le molecole di ScFv sono note nell'arte e sono descritte, ad esempio, nel Brevetto statunitense n° 5,892,019. L'immunoglobulina o le molecole anticorpali della divulgazione possono essere di qualsiasi tipo (*ad esempio*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, e IgY), classe (*ad esempio*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2, eccetera) o sottoclasse di molecola di immunoglobulina.

Come usata nel presente documento, l'espressione "porzione di catena pesante" include sequenze amminoacidiche derivate da una catena pesante di immunoglobulina. Un polipeptide comprendente una porzione di catena pesante comprende almeno uno di: un dominio CH1,

un dominio cerniera (ad esempio, regione cerniera superiore, centrale e/o inferiore), un dominio CH2, un dominio CH3 o una variante o relativo frammento. Per esempio, un polipeptide di legame per l'uso nella divulgazione può comprendere una catena polipeptidica comprendente un dominio CH1; una catena polipeptidica comprendente un dominio CH1, almeno una porzione di un dominio cerniera e un dominio CH2; una catena polipeptidica comprendente un dominio CH1 e un dominio CH3; una catena polipeptidica comprendente un dominio CH1, almeno una porzione di un dominio cerniera e un dominio CH3, o una catena polipeptidica comprendente un dominio CH1, almeno una porzione di un dominio cerniera, un dominio CH2 e un dominio CH3. In un'altra forma di realizzazione, un polipeptide della divulgazione comprende una catena polipeptidica comprendente un dominio CH3. Inoltre, un polipeptide di legame per l'uso nella divulgazione può essere privo di almeno una porzione di un dominio CH2 (ad esempio, tutto o parte di un dominio CH2). Come esposto sopra, un tecnico del ramo di ordinaria competenza comprenderà che questi domini (ad esempio, le porzioni di catena pesante) possono essere modificati in modo tale che varino nella sequenza amminoacidica dalla molecola di immunoglobulina presente in natura.

In determinati anticorpi anti-IL-33, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene divulgati nel presente documento, le porzioni di catena pesante di una catena polipeptidica di un multimerico sono identiche a quelle su una seconda catena polipeptidica del

multimero. In alternativa, i monomeri contenenti porzioni a catena pesante della divulgazione non sono identici. Per esempio, ciascun monomero può comprendere un diverso sito di legame al bersaglio, formando, per esempio, un anticorpo bispecifico.

Le porzioni a catena pesante di anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, per l'uso nei metodi diagnostici e di trattamento divulgati nel presente documento possono essere derivate da diverse molecole di immunoglobulina. Per esempio, una porzione a catena pesante di un polipeptide può comprendere un dominio C_{H1} derivato da una molecola IgG1 e una regione cerniera derivata da una molecola IgG3. In un altro esempio, una porzione a catena pesante può comprendere una regione cerniera derivata, in parte, da una molecola IgG1 e, in parte, da una molecola IgG3. In un altro esempio, una porzione a catena pesante può comprendere una cerniera chimerica derivata, in parte, da una molecola IgG1 e, in parte, da una molecola IgG4.

Come usata nel presente documento, l'espressione "porzione a catena leggera" include sequenze di amminoacidi derivate da una catena leggera di immunoglobulina, ad esempio, una catena leggera kappa o lambda. Preferibilmente, la porzione a catena leggera comprende almeno uno tra un dominio VL o CL.

Gli anticorpi anti-IL-33, o relativi frammenti, varianti, o derivati di legame all'antigene divulgati nel presente documento possono essere descritti o specificati in termini di uno o più epitopi o di una o più

porzioni di un antigene, ad esempio, un polipeptide bersaglio divulgato nel presente documento (ad esempio, IL-33 a lunghezza intera o matura) che riconoscono o legano in modo specifico. La porzione di un polipeptide bersaglio che interagisce specificamente con il dominio di legame all'antigene di un anticorpo è un "epitopo" o un "determinante antigenico". Un polipeptide bersaglio, può comprendere un singolo epitopo, ma tipicamente comprende almeno due epitopi e può includere qualsiasi numero di epitopi, a seconda della dimensione, conformazione e tipo di antigene. Per di più, si dovrebbe notare che un "epitopo" su un polipeptide bersaglio può essere o può includere elementi non polipeptidici, ad esempio un epitopo può includere una catena laterale di carboidrati.

Si ritiene che la dimensione minima di un epitopo peptidico o polipeptidico per un anticorpo sia da circa 4 a 5 amminoacidi. Gli epitopi peptidici o polipeptidici contengono preferibilmente almeno sette, più preferibilmente almeno nove e più preferibilmente in modo assoluto tra almeno circa 15 e circa 30 amminoacidi. Poiché una CDR può riconoscere un peptide o un polipeptide antigenico nella sua forma terziaria, gli amminoacidi comprendenti un epitopo non devono essere contigui e, in alcuni casi, potrebbero non essere nemmeno sulla stessa catena peptidica. Un epitopo peptidico o polipeptidico riconosciuto dagli anticorpi anti-IL-33 della presente divulgazione può contenere una sequenza di almeno 4, almeno 5, almeno 6, almeno 7, più preferibilmente almeno 8, almeno 9, almeno 10, almeno 15, almeno 20,

almeno 25, o tra circa 15 e circa 30 amminoacidi contigui o non contigui di IL-33.

Con "si lega specificamente" si intende generalmente che un anticorpo si lega a un epitopo tramite il suo dominio di legame all'antigene e che il legame implica una certa complementarità tra il dominio di legame all'antigene e l'epitopo. Secondo questa definizione, si afferma che un anticorpo "si lega specificamente a" un epitopo quando si lega a tale epitopo tramite il suo dominio di legame all'antigene più facilmente di quanto si legherebbe a un epitopo casuale non correlato. Il termine "specificità" viene usato nel presente documento per qualificare l'affinità relativa con la quale una determinata molecola di legame si lega a un determinato epitopo. Per esempio, si può ritenere che l'anticorpo "A" abbia una specificità superiore per un dato epitopo rispetto all'anticorpo "B", o si può affermare che l'anticorpo "A" si leghi all'epitopo "C" con una specificità superiore rispetto a quella che ha per l'epitopo "D" correlato.

In una forma di realizzazione, un anticorpo o relativo frammento di legame si lega preferibilmente a IL-33. Con "si lega preferibilmente", si intende che l'anticorpo si lega specificamente a un epitopo più prontamente di quanto si legherebbe a un epitopo correlato, simile, omologo o analogo. Quindi, un anticorpo che "si lega preferibilmente" a un dato epitopo si legherebbe più probabilmente a tale epitopo rispetto a un epitopo correlato, sebbene un tale anticorpo possa reagire in modo crociato con l'epitopo correlato.

A titolo esemplificativo non limitativo, si può considerare che un anticorpo si leghi preferibilmente a un primo epitopo se lega detto primo epitopo con una costante di dissociazione (K_D) che è inferiore rispetto alla K_D dell'anticorpo per il secondo epitopo. In un altro esempio non limitativo, si può considerare che un anticorpo si leghi preferibilmente a un primo antigene se lega il primo epitopo con un'affinità che è almeno due ordini di grandezza inferiore rispetto alla K_D dell'anticorpo per il secondo epitopo. In un altro esempio non limitativo, si può considerare che un anticorpo si leghi preferibilmente a un primo epitopo se lega il primo epitopo con un'affinità che è almeno due ordini di grandezza inferiore rispetto alla K_D dell'anticorpo per il secondo epitopo.

In un altro esempio non limitativo, si può considerare che un anticorpo si leghi preferibilmente a un primo epitopo se lega il primo epitopo con una costante di dissociazione ($k(off)$) che è inferiore rispetto alla ($k(off)$) dell'anticorpo per il secondo epitopo. In un altro esempio non limitativo, si può considerare che un anticorpo si leghi preferibilmente a un primo epitopo se lega il primo epitopo con un'affinità che è almeno due ordini di grandezza inferiore rispetto alla ($k(off)$) dell'anticorpo per il secondo epitopo. In un altro esempio non limitativo, si può considerare che un anticorpo si leghi preferibilmente a un primo epitopo se lega il primo epitopo con un'affinità che è almeno due ordini di grandezza inferiore rispetto alla ($k(off)$) dell'anticorpo per il secondo epitopo.

In una forma di realizzazione, si può affermare che un anticorpo o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene secondo la presente divulgazione si lega a un polipeptide bersaglio divulgato nel presente documento (*ad esempio*, IL-33, *ad esempio* umana, di primate, murina, o qualsiasi combinazione di IL-33 umana, di primate e murina) o a un relativo frammento o variante con una costante di dissociazione ($k(\text{off})$) inferiore o uguale a $5 \times 10^{-1} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-1} sec^{-1} , $5 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-2} sec^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ o 10^{-3} sec^{-1} . Per esempio, si può affermare che un anticorpo della divulgazione si lega a un polipeptide bersaglio divulgato nel presente documento (*ad esempio*, IL-33, *ad esempio*, umana, di primate, murina, o qualsiasi combinazione di IL-33 umana, di primate e murina) o a un relativo frammento o variante con una costante di dissociazione ($k(\text{off})$) inferiore o uguale a $5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-4} sec^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$, o 10^{-5} sec^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-6} sec^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ sec}^{-1}$ o 10^{-7} sec^{-1} .

In una forma di realizzazione si può affermare che un anticorpo o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene divulgati nel presente documento si lega a un polipeptide bersaglio divulgato nel presente documento (*ad esempio*, IL-33, *ad esempio* IL-33 umana, primate, murina, o qualsiasi combinazione di umana, primate e murina) o un frammento o relativa variante con una costante di dissociazione ($k(\text{on})$) superiore o uguale a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ o $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Per esempio, si può affermare che un anticorpo della divulgazione si lega a un polipeptide bersaglio divulgato

nel presente documento (*ad esempio* IL-33, *ad esempio*, umana, di primate, murina, o qualsiasi combinazione di IL-33 umana, di primate e murina) o a un relativo frammento o variante con una costante di dissociazione ($k(\text{off})$) superiore o uguale a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, o $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ or $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$

La reattività crociata come impiegata nel presente documento intende riferirsi al punto in cui gli anticorpi, o relativi frammenti di legame all'antigene, per esempio anticorpi o relativi frammenti di legame si legano allo stesso epitopo o ad epitopi sovrapposti. L'inibizione competitiva di legame come impiegata nel presente documento è una forma di reattività crociata.

Si afferma che un anticorpo inibisce in modo competitivo il legame di un anticorpo di riferimento a un dato epitopo se si lega preferibilmente a tale epitopo nella misura in cui blocca, in una certa misura, il legame dell'anticorpo di riferimento all'epitopo. L'inibizione competitiva può essere determinata mediante qualsiasi metodo noto nell'arte, per esempio, saggi in fase solida come saggi ELISA di competizione, saggi immunologici a fluorescenza di lantanidi potenziati da dissociazione (DELFI[®]A, Perkin Elmer), e saggi di legame del radioligando. Si può affermare che un anticorpo inibisce in modo competitivo il legame dell'anticorpo di riferimento a un dato epitopo di almeno il 90%, almeno l'80%, almeno il 70%, almeno il 60% o almeno il 50%.

Come usato nel presente documento, il termine "affinità" si riferisce a una misura della forza del legame di un singolo epitopo con la CDR di una molecola di immunoglobulina. Si veda, *ad esempio*, Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a edizione) pagine 27-28. Come usato nel presente documento, il termine "avidità" si riferisce alla stabilità complessiva del complesso tra una popolazione di immunoglobuline e un antigene, cioè la forza di combinazione funzionale di una miscela di immunoglobuline con l'antigene. Si veda, *ad esempio*, Harlow alle pagine 29-34. L'avidità è correlata sia all'affinità delle singole molecole di immunoglobuline nella popolazione con epitopi specifici, sia alle valenze delle immunoglobuline e dell'antigene. Per esempio, l'interazione tra un anticorpo monoclonale bivalente e un antigene con una struttura epitopica altamente ripetitiva, come un polimero, sarebbe di elevata avidità.

Gli anticorpi anti-IL-33 o relativi frammenti, varianti, o derivatidi legame all'antigene della divulgazione possono anche essere descritti o specificati in termini di loro reattività crociata. Come usata nel presente documento, l'espressione "reattività crociata" si riferisce alla capacità di un anticorpo, specifico per un antigene, di reagire con un secondo antigene; una misura della correlazione tra due diverse sostanze antigeniche. Quindi, un anticorpo è reattivo in modo crociato se si lega a un epitopo diverso da quello che ha indotto la sua formazione. L'epitopo reattivo in modo crociato contiene generalmente molte delle

stesse caratteristiche strutturali complementari dell'epitopo inducente e, in alcuni casi, può effettivamente adattarsi meglio rispetto all'originale.

Per esempio, determinati anticorpi hanno un certo grado di reattività crociata, in quanto si legano a epitopi correlati ma non identici, ad esempio, epitopi con almeno il 95%, almeno il 90%, almeno l'85%, almeno l'80%, almeno il 75%, almeno il 70%, almeno il 65%, almeno il 60%, almeno il 55% e almeno il 50% di identità (come calcolato usando metodi noti nell'arte e descritti nel presente documento) rispetto a un epitopo di riferimento. Si può affermare che un anticorpo ha una reattività crociata scarsa o nulla se non si lega a epitopi con meno del 95%, meno del 90%, meno dell'85%, meno dell'80%, meno del 75%, meno del 70%, meno del 65%, meno del 60%, meno del 55% e meno del 50% di identità (come calcolata usando metodi noti nell'arte e descritti nel presente documento) rispetto a un epitopo di riferimento. Un anticorpo può essere ritenuto "altamente specifico" per un determinato epitopo, se non si lega a nessun altro analogo, ortologo o omologo di tale epitopo.

Gli anticorpi anti-IL-33 o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene della divulgazione possono anche essere descritti o specificati in termini di loro affinità di legame con un polipeptide della divulgazione, *ad esempio*, IL-33, *ad esempio*, umana, di primate, murina o qualsiasi combinazione di IL-33 umana, di primate e murina. Affinità di legame preferite includono quelle con una costante di dissociazione o K_d inferiore a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, $5 \times$

10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M.

Gli anticorpi anti-IL-33 o relativi frammenti, varianti o derivatidi legame all'antigene della divulgazione possono essere "multispecifici", ad esempio bispecifici, trispecifici o di maggiore multispecificità, il che significa che riconoscono e si legano a due o più epitopi diversi presenti su uno o più antigeni diversi (ad esempio, proteine) contemporaneamente. Quindi, se un anticorpo anti-IL-33 è "monospecifico" o "multispecifico", ad esempio "bispecifico", ci si riferisce al numero di epitopi diversi con cui reagisce un polipeptide di legame. Gli anticorpi multispecifici possono essere specifici per diversi epitopi di un polipeptide bersaglio descritto nel presente documento o possono essere specifici per un polipeptide bersaglio nonché per un epitopo eterologo, come un polipeptide eterologo o materiale di supporto solido.

Come usato nel presente documento, il termine "valenza" si riferisce al numero di domini di legame potenziali, ad esempio, domini di legame all'antigene presenti in un polipeptide di legame o anticorpo IL-33 o relativo frammento di legame all'antigene. Ciascun dominio di legame si lega specificamente a un epitopo. Quando un polipeptide di legame o un anticorpo IL-33, o relativo frammento di legame all'antigene, comprende più di un dominio di legame, ciascun dominio di

legame può legarsi specificamente allo stesso epitopo, per un anticorpo con due domini di legame, definito "bivalente monospecifico", o a epitopi diversi, per un anticorpo con due domini di legame, definiti "bispecifici bivalenti". Un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene può anche essere bispecifico e bivalente per ciascuna specificità (definiti "anticorpi tetravalenti bispecifici"). In un'altra forma di realizzazione, possono essere prodotti minibody tetravalenti o anticorpi deleti dal dominio.

Gli anticorpi bivalenti bispecifici e i metodi per produrli sono descritti, per esempio nei Brevetti statunitensi n° 5,731,168; 5,807,706; 5,821,333; e nelle Pubblicazioni di domanda di brevetto statunitense n° 2003/020734 e 2002/0155537. Anticorpi tetravalenti bispecifici e metodi per produrli sono descritti, per esempio, in WO 02/096948 e WO 00/44788. Si vedano in generale, le pubblicazioni PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); i Brevetti statunitensi n° 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992).

Come precedentemente indicato, le strutture delle sottounità e la configurazione tridimensionale delle regioni costanti delle varie classi di immunoglobuline sono ben note. Come usate nel presente documento, l'espressione "dominio VH" include il dominio variabile ammino terminale di una catena pesante di immunoglobulina e l'espressione "dominio CHI" include il primo dominio di regione costante

(più ammino terminale) di una catena pesante di immunoglobulina. Il dominio CH1 è adiacente al dominio VH ed è ammino terminale alla regione cerniera di una molecola di catena pesante di immunoglobulina.

Come usata nel presente documento, l'espressione "dominio CH2" include la porzione di una molecola a catena pesante che si estende, ad esempio, da circa il residuo 244 al residuo 360 di un anticorpo usando schemi di numerazione convenzionali (residui da 244 a 360, sistema di numerazione Kabat; e residui 231-340, sistema di numerazione EU; si veda Kabat EA *et al.*). Il dominio CH2 è unico in quanto non è strettamente appaiato a un altro dominio. Semmai, due catene di carboidrati ramificate N-collegate sono interposte tra i due domini CH2 di una molecola IgG nativa intatta. È anche ben documentato che il dominio CH3 si estende dal dominio CH2 al C-terminale della molecola IgG e comprende approssimativamente 108 residui.

Come usata nel presente documento, l'espressione "regione cerniera" include la porzione di una molecola a catena pesante che unisce il dominio CH1 al dominio CH2. Questa regione cerniera comprende approssimativamente 25 residui ed è flessibile, consentendo quindi alle due regioni di legame all'antigene N-terminali di muoversi in modo indipendente. Le regioni cerniera possono essere suddivise in tre domini distinti: domini cerniera superiore, medio e inferiore (Roux et al., J. Immunol. 161:4083 (1998)).

Come usata nel presente documento, l'espressione "legame disolfuro" include il legame covalente formato tra due atomi di zolfo. L'amminoacido cisteina comprende un gruppo tiolo che può formare un legame o ponte disolfuro con un secondo gruppo tiolo. Nella maggior parte delle molecole IgG presenti in natura, le regioni CH1 e CL sono collegate mediante un legame disolfuro e le due catene pesanti sono collegate mediante due legami disolfuro in posizioni corrispondenti a 239 e 242 usando il sistema di numerazione Kabat (posizione 226 o 229, sistema di numerazione EU).

Come usata nel presente documento, l'espressione "anticorpo chimerico" si riterrà indichi qualsiasi anticorpo in cui la regione o sito immunoreattivo è ottenuto o derivato da una prima specie e la regione costante (che può essere intatta, parziale o modificata secondo la presente divulgazione) è ottenuta da una seconda specie. In determinate forme di realizzazione la regione o il sito di legame bersaglio deriverà da una sorgente non umana (ad esempio, topo o primate) e la regione costante è umana.

Come usata nel presente documento, l'espressione "anticorpo ingegnerizzato" si riferirà a un anticorpo umano in cui il dominio variabile nella catena pesante o leggera o in entrambe è alterato da almeno una sostituzione amminoacidica. In una forma di realizzazione, la sostituzione amminoacidica dei residui di intelaiatura ridurrà la potenziale immunogenicità cambiando il residuo di intelaiatura in linea germinale. In un'altra forma di realizzazione, la sostituzione

amminoacidica di residui di intelaiatura o CDR può rimuovere potenziali passività strutturali che possono determinare instabilità, aggregazione o eterogeneità del prodotto. Esempi di passività indesiderabili includono cisteine non appaiate (che possono comportare un rimescolamento del legame disolfuro, o formazione di addotti sulfidrilici variabili), siti di glicosilazione N-collegati (determinando eterogeneità di struttura e attività), nonché deamidazione (ad esempio, NG, NS), isomerizzazione (DG), siti di ossidazione (metionina esposta), e idrolisi (DP). In un'altra forma di realizzazione, la sostituzione amminoacidica di CDR e residui di intelaiatura mediante un approccio di mutagenesi bersagliata o casuale può determinare anticorpi con caratteristiche di legame, potenza o specificità potenziate. In un'altra forma di realizzazione, "anticorpo ingegnerizzato" si riferisce a un anticorpo in cui il dominio variabile nella catena pesante o leggera o in entrambe è alterato dalla sostituzione almeno parziale di una o più CDR da un anticorpo di specificità nota e, se necessario, dalla sostituzione parziale della regione di intelaiatura e dal cambiamento di sequenza. Sebbene le CDR possano essere derivate da un anticorpo della stessa classe o anche sottoclasse dell'anticorpo da cui derivano le regioni di intelaiatura, si prevede che le CDR saranno derivate da un anticorpo di classe diversa e preferibilmente da un anticorpo di una diversa specie.

Come usata nel presente documento, l'espressione "anticorpo umanizzato" si riferirà a una molecola di anticorpo derivata da un anticorpo di specie non umana (a cui viene fatto riferimento anche

come anticorpo donatore) che si lega all'antigene desiderato avente una o più regioni determinanti la complementarità (CDR) dalla specie non umana e una regione di intelaiatura da una molecola di immunoglobulina umana (a cui viene fatto riferimento anche come anticorpo accettore). Potrebbe non essere necessario sostituire tutte le CDR con le CDR complete dal dominio della variabile del donatore per trasferire la capacità di legame all'antigene di un dominio variabile a un altro. Semmai, potrebbe essere necessario trasferire solo quei residui che sono necessari per mantenere l'attività del sito di legame al bersaglio.

È inoltre riconosciuto che le regioni di intelaiatura all'interno del dominio variabile in una catena pesante o leggera, o entrambe, di un anticorpo umanizzato possono comprendere esclusivamente residui di origine umana, nel qual caso queste regioni di intelaiatura dell'anticorpo umanizzato sono indicate come "regioni di intelaiatura completamente umane". In alternativa, uno o più residui dell'una o più regioni di intelaiatura del dominio variabile donatore possono essere ingegnerizzati all'interno della posizione corrispondente dell'una o più regioni di intelaiatura umana di un dominio variabile in una catena pesante o leggera, o entrambe, di un anticorpo umanizzato, se necessario, per mantenere un legame appropriato o per potenziare il legame all'antigene IL-33. Una regione di intelaiatura umana che è stata ingegnerizzata in questo modo comprenderebbe quindi una miscela di residui di intelaiatura umana e di donatore, e a cui viene fatto

riferimento nel presente documento come una "regione di intelaiatura parzialmente umana".

Per esempio, l'umanizzazione di un anticorpo anti-IL-33 può essere essenzialmente eseguita mediante metodi noti nell'arte (ad esempio, il metodo di Winter e collaboratori (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)), sostituendo CDR o sequenze CDR di roditori o mutanti con le sequenze corrispondenti di un anticorpo anti-IL-33 umano. Si vedano anche i Brevetti statunitensi n° 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,859,205 . L'anticorpo anti-IL-33 umanizzato risultante comprenderebbe almeno una CDR di roditore o roditore mutante all'interno delle regioni di intelaiatura completamente umana del dominio variabile a catena pesante e/o leggera dell'anticorpo umanizzato. In alcuni casi, i residui all'interno delle regioni di intelaiatura di uno o più domini variabili dell'anticorpo anti-IL-33 umanizzato vengono sostituiti da corrispondenti residui non umani (per esempio, roditori) (si vedano, per esempio, i Brevetti statunitensi n° 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; e 6,180,370), nel qual caso l'anticorpo anti-IL-33 umanizzato risultante comprenderebbe regioni di intelaiatura parzialmente umane all'interno del dominio variabile a catena pesante e/o leggera.

Per di più, gli anticorpi umanizzati possono comprendere residui che non si trovano nell'anticorpo ricevente o nell'anticorpo donatore. Queste modificazioni vengono apportate per affinare ulteriormente le

prestazioni dell'anticorpo (ad esempio, per ottenere l'affinità desiderata). In generale, l'anticorpo umanizzato comprenderà sostanzialmente tutto di almeno uno, e tipicamente due, domini variabili nei quali tutte o sostanzialmente tutte le regioni CDR corrispondono a quelle di un'immunoglobulina non umana e tutte o sostanzialmente tutte le regioni di intelaiatura sono quelle di una sequenza consenso di immunoglobulina umana. L'anticorpo umanizzato comprenderà anche facoltativamente almeno una porzione di una regione costante di immunoglobulina (Fc), tipicamente quella di un'immunoglobulina umana. Per ulteriori dettagli si vedano Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Di conseguenza, tali anticorpi "umanizzati" possono includere anticorpi in cui sostanzialmente meno di un dominio variabile umano intatto è stato sostituito dalla corrispondente sequenza di una specie non umana. In pratica, anticorpi umanizzati sono tipicamente anticorpi umani in cui alcuni residui di CDR e possibilmente alcuni residui di intelaiatura sono sostituiti da residui provenienti da siti analoghi in anticorpi di roditore. Si vedano, per esempio, i Brevetti statunitensi n° 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,859,205. Si vedano anche il Brevetto statunitense 6,180,370 e la Pubblicazione internazionale n° WO 01/27160, in cui sono descritti anticorpi umanizzati e tecniche per produrre anticorpi umanizzati aventi affinità migliorata per un antigene predeterminato.

Come usati nel presente documento, i termini "collegato", "fuso" o "fusione" sono usati in modo intercambiabile. Questi termini si riferiscono all'unione di due più elementi o componenti, mediante qualsiasi mezzo, inclusa la coniugazione chimica o mezzi ricombinanti. Una "fusione in intelaiatura" si riferisce all'unione di due o più quadri di lettura aperti (ORF) polinucleotidici per formare un ORF continuo più lungo, in un modo che mantiene il quadro di lettura traduzionale corretto degli ORF originali. Quindi, una proteina di fusione ricombinante è una singola proteina contenente due o più segmenti che corrispondono a polipeptidi codificati dagli ORF originali (i quali segmenti normalmente non sono così uniti in natura). Sebbene il quadro di lettura sia quindi reso continuo attraverso i segmenti fusi, i segmenti possono essere fisicamente o spazialmente separati, per esempio, da una sequenza di agente di collegamento nell'intelaiatura. Per esempio, i polinucleotidi codificanti le CDR di una regione variabile di immunoglobulina possono essere fusi, in intelaiatura, ma essere separati da un polinucleotide codificante almeno una regione di intelaiatura di immunoglobulina o regioni CDR aggiuntive, purché le CDR "fuse" siano co-tradotte come parte di un polipeptide continuo.

Nel contesto dei polipeptidi, una "sequenza lineare" o una "sequenza" è un ordine di amminoacidi in un polipeptide in una direzione da ammino a carbossi terminale in cui i residui vicini l'uno all'altro nella sequenza sono contigui nella struttura primaria del polipeptide.

Il termine "espressione" come usato nel presente documento si riferisce a un processo mediante il quale un gene produce una sostanza biochimica, per esempio, un polipeptide. Il processo include qualsiasi manifestazione della presenza funzionale del gene all'interno della cellula, inclusi, senza limitazione, il knockdown del gene nonché sia l'espressione transitoria sia l'espressione stabile. Include senza limitazione la trascrizione del gene in RNA messaggero (mRNA) e la traduzione di tale mRNA in uno o più polipeptidi. Se il prodotto finale desiderato è una sostanza biochimica, l'espressione include la creazione di quella sostanza biochimica ed eventuali precursori. L'espressione di un gene produce un "prodotto genico". Come usato nel presente documento, un prodotto genico può essere un acido nucleico, *ad esempio*, un RNA messaggero prodotto mediante trascrizione di un gene, o un polipeptide che è tradotto da un trascritto. I prodotti genici descritti nel presente documento includono inoltre acidi nucleici con modificazioni post-trascrizionali, *ad esempio* poliadenilazione, o polipeptidi con modificazioni post-traduzionali, *ad esempio*, metilazione, glicosilazione, l'addizione di lipidi, associazione con altre sottounità proteiche, scissione proteolitica, e simili.

Come usati nel presente documento i termini "trattare" o "trattamento", si riferiscono sia a un trattamento terapeutico sia a misure profilattiche o preventive, in cui lo scopo è prevenire o rallentare (attenuare) un cambiamento fisiologico indesiderato o un disturbo, come la progressione di una malattia o di una condizione infiammatoria.

Risultati clinici benefici o desiderati includono, ma non sono limitati a, alleviamento di sintomi, diminuzione dell'estensione di malattia, stato di malattia stabilizzato (*vale a dire*, non in peggioramento), ritardo o rallentamento della progressione di una malattia, miglioramento o lenimento dello stato di malattia, e remissione (parziale o totale), rilevabile o non rilevabile. "Trattamento" può anche significare prolungare la sopravvivenza rispetto alla sopravvivenza prevista se non si riceve il trattamento. Coloro che necessitano di un trattamento includono coloro che sono già affetti dalla condizione o dal disturbo, nonché coloro inclini ad avere la condizione o il disturbo o coloro nei quali la condizione o il disturbo devono essere prevenuti.

Con "soggetto" o "individuo" o "animale" o "paziente" o "mammifero" si intende qualsiasi soggetto, in particolare un soggetto mammifero, per il quale si desidera una diagnosi, prognosi o terapia. I soggetti mammiferi includono: esseri umani, animali domestici, animali da fattoria e animali da zoo, sport o da compagnia come cani, gatti, porcellini d'India, conigli, ratti, topi, cavalli, bovini, mucche, e così via.

Come usate nel presente documento, frasi come "un soggetto che trarrebbe beneficio dalla somministrazione di un anticorpo anti-IL-33" e "un animale che necessita di trattamento" includono soggetti, come soggetti mammiferi, che trarrebbero beneficio dalla somministrazione di un anticorpo anti-IL-33 usato, *ad esempio*, per il rilevamento di un polipeptide anti-IL-33 (*ad esempio*, per una procedura

diagnostica) e/o dal trattamento, *vale a dire*, cure palliative o prevenzione di una malattia, con un anticorpo anti-IL-33.

II. Descrizione di polipeptide bersaglio

Come usate nel presente documento, le espressioni "IL-33" e "polipeptide IL-33" sono usate in modo intercambiabile. In determinate forme di realizzazione, IL-33 è a lunghezza intera. In un'altra forma di realizzazione, IL-33 è IL-33 matura, troncata (amminoacidi 112-270). Studi recenti suggeriscono che IL-33 a lunghezza intera sia attiva (Cayrol e Girard, Proc Natl Acad Sci STATI UNITI 106(22):9021-6 (2009); Hayakawa et al., Biochem Biophys Res Commun 387(1):218-22 (2009); Talabot-Ayer et al., J Biol Chem. 284(29):19420-6 (2009)). Tuttavia, IL-33 processata N-terminale o troncata includente ma in via non limitativa aa 72-270, 79-270, 95-270, 99-270, 107-270, 109-270, 111-270, 112-270 può avere attività potenziata (Lefrancais 2012, 2014). In altre forme di realizzazione, IL-33 può includere una IL-33 a lunghezza intera, un relativo frammento o un mutante o polipeptide variante di IL-33, in cui il frammento di IL-33 o di polipeptide variante di IL-33 conserva alcune o tutte le proprietà funzionali di IL-33 attiva.

IL-33 umana è una proteina di 270 amminoacidi (Numero di accesso O95760), costituita da due domini: un dominio omeodominio e una citochina (IL-1-simile). L'omeodominio contiene un segnale di localizzazione nucleare (NLS). IL-33 è stata originariamente identificata come gene "DVS27" che è stato sovraregolato nelle arterie cerebrali vasospastiche a seguito di emorragia subaracnoidea (Onda et al., J.

Cereb. Blood Flow Metab. 19:1279-88 (1999)), e come un "fattore nucleare da venule endoteliali alte (NF-HEV)", che è espresso nei nuclei delle cellule endoteliali (Baekkevold et al., Am. J. Pathol 163:69-79 (2003)). IL-33 (anche denominato IL-1F11) è ora considerato l'11° membro della famiglia IL-1 per le citochine, che include anche IL- α , IL1 β e IL-18. Si veda Oboki et al., Allergology International 59:143-160 (2010).

Schmitz *et al.* hanno identificato per la prima volta IL-33 come il ligando per il recettore orfano ST2 (anche denominato IL-1R4) (Schmitz et al., Immunity 23 (5):479-90 (2005)). L'unico ligando noto del recettore ST2 è IL-33 (Schmitz *et al.* (2005)). Il recettore di IL-33 è formato da molecole eterodimeriche, costituite da ST2 e dalla proteina accessoria IL-1R (IL-1RAcP). IL-1RAcP è un componente condiviso dei recettori per IL-1 α , IL-1 β , IL-1F6, IL1F8 e IL1F9. IL-33 si lega al recettore di IL-33, che un dimero di ST2 e IL-1RAcP. IL-1RAcP non è richiesta per il legame, ma è fondamentale per la segnalazione. Il dominio TIR del recettore di IL-33 recluta MyD88 e TRAF6 e il segnale del recettore determina l'attivazione delle vie NF κ B e MAP chinasi (Oboki *et al.* (2010)). Il recettore di IL-33 può potenzialmente associarsi ad altri recettori ed è stato segnalato che attiva in modo crociato il recettore tirosina chinasi c-Kit nei mastociti umani e murini (Drube et al., Blood 115:3899-906 (2010)). La base strutturale per questa attivazione crociata è la formazione complessa tra c-Kit, ST2 e IL-1RAcP. C-Kit e

IL-1RAcP interagiscono in modo costitutivo e ST2 si unisce a questo complesso dopo il legame al ligando.

Recentemente, IL-33 ha dimostrato di legare un secondo complesso eterodimerico del recettore di IL-33. ST2 forma un complesso con un'altra molecola della famiglia IL1R, "singola molecola correlata a Ig IL-1R" (SIGIRR) (anche denominata Toll IL-1R8 (TIR8)). Si ritiene che SIGIRR/TIR8 agisca come un regolatore negativo delle risposte immunitarie mediate da IL-1R e il recettore Toll-simile (TLR) (Garlanda et al., Trends Immunol. 30:439-46 (2009)). A differenza di ST2:IL-1RAcP, ST2:SIGIRR sembra agire come un regolatore negativo di IL-33.

ST2 è espresso al valore basale dalle cellule Th2 e dai mastociti, entrambi tipi di cellule noti per essere importanti mediatori dell'asma allergica. IL-33 è in grado di stimolare queste (e varie altre cellule) a produrre una gamma di risposte funzionali incluse citochine e chemochine.

Anticorpi Anti-IL-33

In determinate forme di realizzazione, gli anticorpi o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene, della divulgazione, ad esempio, gli anticorpi IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180 e 33_640076-4B, 33_640081-AB; 33_640082-6B, 33_640082-7B, 33_640084-2B, 33_640086-6B, 33_640087-7B, 33_640201-2B e 33_640237-2B, si legano a IL-33 e inibiscono il rilascio

di citochine guidato da IL-33 da mastociti, cellule endoteliali e proliferazione delle cellule TF-1.

In determinate forme di realizzazione, gli anticorpi della divulgazione comprendono anticorpi anti-IL-33 o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene che si legano a IL-33, ad esempio gli anticorpi IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180 e 33_640076-4B, 33_640081-AB; 33_640082-6B, 33_640082-7B, 33_640084-2B, 33_640086-6B, 33_640087-7B, 33_640201-2B e 33_640237-2B. In determinate forme di realizzazione gli anticorpi anti-IL-33 si legano a IL-33 umana, di primate, murina, o qualsiasi combinazione di IL-33 umana, di primate e murina. In determinate forme di realizzazione, gli anticorpi anti-IL-33 inibiscono la produzione di citochine guidata da IL-33.

In una forma di realizzazione, la presente divulgazione fornisce un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene, che si lega specificamente allo stesso epitopo di IL-33 degli anticorpi IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 o IL330180 e 33_640076-4B, 33_640081-AB; 33_640082-6B, 33_640082-7B, 33_640084-2B, 33_640086-6B, 33_640087-7B, 33_640201-2B e 33_640237-2B. In un'altra forma di realizzazione, la presente divulgazione fornisce un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene, che si lega specificamente a IL-33, e inibisce in modo competitivo gli anticorpi IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 o IL330180 e 33_640076-4B, 33_640081-AB; 33_640082-6B,

33_640082-7B, 33_640084-2B, 33_640086-6B, 33_640087-7B, 33_640201-2B e 33_640237-2B dal legarsi specificamente a IL-33, ad esempio, umana, di primate, murina, o qualsiasi combinazione di IL-33 umana, di primate e murina.

In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, della divulgazione ha una sequenza amminoacidica che ha almeno il 75%, 80%, 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o il 95% di identità di sequenza rispetto alla sequenza amminoacidica per la molecola di anticorpo anti-IL-33 di riferimento. In un'ulteriore forma di realizzazione, l'anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, condivide almeno il 96%, 97%, 98%, 99% o il 100% di identità di sequenza con l'anticorpo di riferimento. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo di riferimento è IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 o IL330180 e 33_640076-4B, 33_640081-AB; 33_640082-6B, 33_640082-7B, 33_640084-2B, 33_640086-6B, 33_640087-7B, 33_640201-2B e 33_640237-2B.

In un'altra forma di realizzazione, la presente divulgazione fornisce un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene comprendente, costituito essenzialmente da, o costituito da un dominio variabile a catena pesante dell'immunoglobulina (dominio VH), in cui almeno una delle CDR del dominio VH ha una sequenza amminoacidica che è almeno il 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o identica a una regione CDR1, CDR2 o CDR3 delle CDR VH divulgate sopra, in cui un anticorpo o relativo frammento di legame

all'antigene comprendente il dominio VH codificato si lega specificamente o preferibilmente a IL-33. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

In un'altra forma di realizzazione, la presente divulgazione fornisce un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene comprendente, costituito essenzialmente da, o costituito da un dominio variabile a catena pesante dell'immunoglobulina (dominio VH), in cui almeno una delle CDR del dominio VH ha una sequenza amminoacidica che è almeno il 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o identica alle CDR VH divulgate sopra, in cui un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene comprendente il dominio VH codificato si lega in modo specifico o preferibilmente a IL-33. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo isolato comprende inoltre un dominio variabile a catena leggera dell'immunoglobulina (dominio VL). In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

In un'altra forma di realizzazione, la presente divulgazione fornisce un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene comprendente, costituito essenzialmente da, o costituito da un dominio variabile a catena pesante dell'immunoglobulina (dominio VH), in cui almeno una delle CDR del dominio VH ha una sequenza amminoacidica identica, eccetto per 1, 2, 3, 4 o 5 sostituzioni di

amminoacidi conservative, alle CDR VH divulgate sopra, in cui un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene comprendente il dominio VH codificato si lega specificamente o preferibilmente a IL-33. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo isolato comprende inoltre un dominio VL. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

In un'altra forma di realizzazione, la presente divulgazione fornisce un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene comprendente, costituito essenzialmente da, o costituito da un dominio VH che ha una sequenza amminoacidica che è almeno il 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o il 100% identica a una sequenza amminoacidica VH di SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42 o 52, in cui un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene comprendente il dominio VH codificato si lega specificamente o preferibilmente a IL-33. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo isolato comprende inoltre un dominio VL. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

In un'altra forma di realizzazione, la presente divulgazione fornisce un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene comprendente, costituito essenzialmente da, o costituito da un dominio variabile a catena leggera dell'immunoglobulina (dominio VL), in cui almeno una delle CDR del dominio VL ha una sequenza amminoacidica

che è almeno il 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o identica a una regione CDR1, CDR2 o CDR3 delle sequenze amminoacidiche VH SEQ divulgate sopra, in cui un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene comprendente il dominio VL codificato si lega specificamente o preferibilmente a IL-33. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo isolato comprende inoltre un dominio VH. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

In un'altra forma di realizzazione, la presente divulgazione fornisce un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene comprendente, costituito essenzialmente da, o costituito da un dominio variabile a catena leggera dell'immunoglobulina (dominio VL), in cui almeno una delle CDR del dominio VL ha una sequenza amminoacidica che è almeno il 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o identica alle CDR VL divulgate sopra, in cui un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene comprendente il dominio VL codificato si lega specificamente o preferibilmente a IL-33. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo isolato comprende inoltre un dominio VH. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

In un'altra forma di realizzazione, la presente divulgazione fornisce un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene comprendente, costituito essenzialmente da, o costituito da un dominio variabile a catena leggera dell'immunoglobulina (dominio VL), in cui

almeno una delle CDR del dominio VL ha una sequenza amminoacidica identica, eccetto per 1, 2, 3, 4 o 5 sostituzioni amminoacidiche conservative, alle CDR VL divulgate sopra, in cui un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene comprendente il dominio VL codificato si lega specificamente o preferibilmente a IL-33. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo isolato comprende inoltre un dominio VH. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

In un'ulteriore forma di realizzazione, la presente divulgazione include un anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene comprendente, costituito essenzialmente da, o costituito da un dominio VL che ha una sequenza amminoacidica che è almeno il 75%, 80%, 85%, 90 %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o il 100% identica a una sequenza amminoacidica VL divulgata sopra, in cui un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene comprendente il dominio VL codificato si lega specificamente o preferibilmente a IL-33. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo isolato comprende inoltre un dominio VH. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

Varianti biologicamente attive idonee degli anticorpi anti-IL-33 della divulgazione possono essere usate nei metodi della presente divulgazione. Tali varianti manterranno le proprietà di legame

desiderate dell'anticorpo genitore anti-IL-33. I metodi per produrre varianti di anticorpi sono generalmente disponibili nell'arte.

I metodi per la mutagenesi e le alterazioni della sequenza nucleotidica sono ben noti nell'arte. Si vedano, per esempio, a cura di Walker e Gastra, (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. STATI UNITI* 82:488-492 (1985); Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987); Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); il Brevetto statunitense n° 4,873,192. Indicazioni sulle sostituzioni amminoacidiche appropriate che non influenzano l'attività biologica del polipeptide di interesse sono reperibili nel modello di Dayhoff et al. (1978) in *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), pagine 345-352, incorporato nel presente documento per riferimento nella sua interezza. Il modello di Dayhoff *et al.* usa la matrice di similarità amminoacidica della Mutazione puntuale accettata (PAM) (matrice PAM 250) per determinare sostituzioni amminoacidiche conservative idonee. Possono essere preferite sostituzioni conservative, come lo scambio di un amminoacido con un altro avente proprietà simili. Esempi di sostituzioni amminoacidiche conservative come insegnato dalla matrice PAM 250 del modello di Dayhoff *et al.* include, ma non in via limitativa, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln, e Phe↔Trp↔Tyr.

Nella costruzione di varianti di un anticorpo anti-IL-33 o di un relativo frammento di legame all'antigene, di polipeptidi di interesse, vengono apportate modificazioni in modo tale che le varianti continuino a possedere le proprietà desiderate, ad esempio, siano in grado di legarsi specificamente a una IL-33, e in determinate forme di realizzazione non blocchino il legame di IL-33 a ST2. Ovviamente, eventuali mutazioni effettuate nel DNA codificante per il polipeptide variante non devono collocare la sequenza fuori dal quadro di lettura e preferibilmente non creeranno regioni complementari che possano produrre una struttura di mRNA secondario.

I metodi per misurare la specificità di legame dell'anticorpo anti-IL-33 o di relativo frammento di legame all'antigene includono, ma in via non limitativa, saggi di legame di competizione standard, saggi ELISA, saggi BIACORE, saggi funzionali come proliferazione o rilascio di fattori e simili. Si vedano, per esempio, tali saggi divulgati in WO 93/14125; Shi et al., *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh et al., *J Immunol* 169:1375-1381 (2002); Watanabe et al., *J Immunol* 167:4321-4328 (2001); Wang et al., *Blood* 97:3498-3504 (2001); e Giraudon et al., *J Immunol* 172(2):1246-1255 (2004).

Come esaminato nel presente documento, laddove qualsiasi particolare polipeptide, incluse le regioni costanti, CDR, domini VH o domini VL divulgati nel presente documento, sia almeno il 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o anche il 100% identico a un altro polipeptide, l'identità in % può

essere determinata usando metodi e programmi/software per computer noti nell'arte come, ma in via non limitativa, il programma BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versione 8 per Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53713). BESTFIT usa l'algoritmo di omologia locale di Smith e Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489, per trovare il miglior segmento di omologia tra due sequenze. Quando si usa BESTFIT o qualsiasi altro programma di allineamento di sequenze per determinare se una particolare sequenza è, per esempio, identica al 95% a una sequenza di riferimento secondo la presente divulgazione, i parametri sono impostati, ovviamente, in modo tale che la percentuale di identità sia calcolata sull'intera lunghezza della sequenza polipeptidica di riferimento e che lacune nell'omologia fino al 5% del numero totale di amminoacidi nella sequenza di riferimento siano consentite.

Ai fini della presente divulgazione, l'identità di sequenza in percentuale può essere determinata usando l'algoritmo di ricerca per omologia di Smith-Waterman usando una ricerca di lacune affine con una penalità di lacuna pari a 12 e una penalità di estensione di lacuna pari a 2, matrice BLOSUM pari a 62. L'algoritmo di ricerca per omologia di Smith-Waterman è insegnato in Smith e Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489. Una variante può, per esempio, differire da un anticorpo anti-IL-33 di riferimento (ad esempio, IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 o IL330180) da un minimo di 1 a 30

residui amminoacidici, da un minimo di 1 a 15 residui amminoacidici, da un minimo di 1 a 10 residui amminoacidici, come 6-10, un minimo di 5, un minimo di 4, 3, 2, o anche di 1 residuo amminoacidico.

La precisa struttura chimica di un polipeptide in grado di legarsi in modo specifico a IL-33 e di mantenere l'attività desiderata dipende da una serie di fattori. Poiché nella molecola sono presenti gruppi amminici e carbossilici ionizzabili, un particolare polipeptide può essere ottenuto come un sale acido o basico, o in forma neutra. Tutte queste preparazioni che conservano la loro attività biologica quando poste in condizioni ambientali idonee sono incluse nella definizione di anticorpi anti-IL-33 come usata nel presente documento. Inoltre, la sequenza amminoacidica primaria del polipeptide può essere aumentata mediante derivatizzazione usando frazioni funzionali di zucchero (glicosilazione) o altre molecole supplementari come lipidi, fosfato, gruppi acetilici e simili. Può anche essere aumentata mediante coniugazione con i saccaridi. Determinati aspetti di tale aumento vengono compiuti attraverso sistemi di processamento post-traduzionali dell'ospite produttore; altre modificazioni simili possono essere introdotte *in vitro*. In ogni caso, tali modificazioni sono incluse nella definizione di un anticorpo anti-IL-33 usato nel presente documento fintanto che le proprietà desiderate dell'anticorpo anti-IL-33 non vengano distrutte. Si prevede che tali modificazioni possano influenzare quantitativamente o qualitativamente l'attività, aumentando o diminuendo l'attività del polipeptide, nei vari saggi. Inoltre, i singoli residui amminoacidici nella catena possono

essere modificati mediante ossidazione, riduzione o altra derivatizzazione, e il polipeptide può essere scisso per ottenere frammenti che conservano l'attività. Tali alterazioni che non distruggono le proprietà desiderate (ad esempio, specificità di legame per IL-33, affinità di legame e attività associata, ad esempio, capacità di inibire il rilascio di citochine guidato da IL-33 da mastociti, cellule endoteliali e proliferazione di cellule TF-1) non rimuovono la sequenza polipeptidica dalla definizione di anticorpi anti-IL-33 di interesse come usata nel presente documento.

L'arte fornisce indicazioni sostanziali riguardo la preparazione e l'uso di varianti di polipeptidi. Nella preparazione dell'anticorpo anti-IL-33 o delle relative varianti di frammento di legame all'antigene, un tecnico del ramo può prontamente determinare quali modificazioni alla sequenza nucleotidica o amminoacidica della proteina nativa determineranno una variante che è idonea per l'uso come un componente terapeuticamente attivo di una composizione farmaceutica usata nei metodi della presente divulgazione.

È noto che le varianti della regione Fc (ad esempio, sostituzioni e/o addizioni e/o delezioni di amminoacidi) possono potenziare o diminuire la funzione effettrice di un anticorpo e possono alterare le proprietà farmacocinetiche (ad esempio, emivita) dell'anticorpo. Per esempio, si vedano il Brevetto statunitense n° 6,737,056B1 e la Pubblicazione della domanda di brevetto statunitense n°

2004/0132101A1, che divulgano mutazioni Fc che ottimizzano il legame dell'anticorpo ai recettori Fc.

In determinati anticorpi anti-IL-33, la porzione Fc può essere mutata per diminuire la funzione effettrice usando tecniche note nell'arte. Per esempio, l'alterazione di un dominio di regione costante, ad esempio, mediante mutazioni puntiformi o di sostituzioni amminoacidiche può ridurre il legame del recettore Fc dell'anticorpo modificato circolante, riducendo in tal modo al minimo la clearance della cellula effettrice o mediata dal complemento o il danno alle cellule che esprimono o presentano il bersaglio. Per esempio, un particolare insieme di sostituzioni, la tripla mutazione L234F/L235E/P331S ("TM") provoca una profonda diminuzione dell'attività di legame delle molecole IgG1 umane a C1q, CD64, CD32A e CD16 umani. *Si veda, ad esempio, Oganessian et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 64:700-704 (2008).*

In altri casi può verificarsi che modificazioni costanti della regione coerenti con la presente divulgazione aumentino l'emivita sierica. L'emivita sierica delle proteine comprendenti regioni Fc può essere aumentata aumentando l'affinità di legame della regione Fc per FcRn. L'espressione "emivita dell'anticorpo" come usata nel presente documento significa una proprietà farmacocinetica di un anticorpo che è una misura del tempo medio di sopravvivenza delle molecole di anticorpo a seguito della loro somministrazione. L'emivita dell'anticorpo può essere espressa come il tempo richiesto per eliminare il 50

per cento di una quantità nota di immunoglobulina dal corpo del paziente (o altro mammifero) o da un relativo compartimento specifico, per esempio, come misurata nel siero, vale a dire, l'emivita circolante, o in altri tessuti. L'emivita può variare da un'immunoglobulina o classe di immunoglobuline a un'altra. In generale, un aumento dell'emivita dell'anticorpo determina un aumento del tempo medio di residenza in circolazione per l'anticorpo somministrato.

Un aumento dell'emivita consente di ridurre la quantità di farmaco erogata a un paziente oltre a ridurre la frequenza di somministrazione. Per aumentare l'emivita sierica dell'anticorpo, si può incorporare un epitopo di legame del recettore di salvataggio nell'anticorpo (nella fattispecie, un frammento di anticorpo) come noto nell'arte. Come usata nel presente documento, l'espressione "epitopo di legame del recettore di salvataggio" si riferisce a un epitopo della regione Fc di una molecola IgG (ad esempio, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) che è responsabile dell'aumento dell'emivita sierica in vivo della molecola IgG. Gli anticorpi con emivita aumentata possono anche essere generati modificando i residui amminoacidici identificati come coinvolti nell'interazione tra il recettore Fc e il recettore FcRn. Per esempio, l'introduzione della tripla mutazione M252Y/S254T/T256E ("YTE") nel dominio CH2 delle molecole di immunoglobulina umana G (IgG) provoca un aumento del loro legame al recettore Fc neonatale umano (FcRn). *Si veda* il Brevetto statunitense n° 7.083,784, il cui

contenuto è incorporato nel presente documento per riferimento nella sua interezza.

In aggiunta, in alcune forme di realizzazione, la regione Fc comprende una modificazione (ad esempio, sostituzioni amminoacidiche, inserzioni amminoacidiche, delezioni amminoacidiche) in una o più posizioni selezionate dal gruppo costituito da 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 313, 316, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 440 e 443 come numerate mediante l'indice UE come esposto in Kabat. Facoltativamente, la regione Fc può comprendere un residuo amminoacidico non presente in natura in posizioni aggiuntive e/o alternative note nell'arte.

In altre forme di realizzazione, la regione Fc comprende almeno una sostituzione selezionata dal gruppo costituito da 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241 L, 241Y, 241E, 241 R, 243W, 243L 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 251F, 252Y, 254T, 255L, 256E, 256M, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M,

267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 269G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 313F, 316D, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K, 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R, 331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 440Y e 434W come numerate mediante l'indice EU esposto in Kabat. Facoltativamente, la regione Fc può comprendere residui amminoacidici aggiuntivi e/o alternativi non presenti in natura noti nell'arte.

In ulteriori forme di realizzazione, la regione Fc comprende almeno una modificazione (ad esempio, sostituzioni amminoacidiche, inserzioni amminoacidiche, delezioni amminoacidiche) in una o più posizioni selezionate dal gruppo costituito da 234, 235 e 331. In alcune forme di realizzazione, gli amminoacidi non presenti in natura sono selezionati dal gruppo costituito da 234F, 235F, 235Y e 331S. Viene fornita nel presente documento una variante Fc, in cui la regione Fc comprende almeno un amminoacido non presente in natura in una o più posizioni selezionate dal gruppo costituito da 239, 330 e 332. In

alcune forme di realizzazione, gli amminoacidi non presenti in natura sono selezionati dal gruppo costituito da 239D, 330L e 332E.

In altre forme di realizzazione, la regione Fc comprende almeno un amminoacido non presente in natura in una o più posizioni selezionate dal gruppo costituito da 252, 254 e 256. In determinate forme di realizzazione, gli amminoacidi non presenti in natura sono selezionati dal gruppo costituito da 252Y, 254T e 256E, descritto nel Brevetto statunitense n° 7.083,784, i cui contenuti sono incorporati nel presente documento per riferimento nella sua interezza.

Ancora altre modificazioni della regione costante possono essere usate per modificare i legami disolfuro o le frazioni funzionali oligosaccaridiche che consentono una localizzazione potenziata a causa dell'aumentata specificità dell'antigene o flessibilità dell'anticorpo. Il profilo fisiologico risultante, la biodisponibilità e altri effetti biochimici delle modificazioni, come biodistribuzione ed emivita sierica, possono essere facilmente misurati e quantificati usando tecniche immunologiche ben note senza sperimentazione indebita.

Gli anticorpi anti-IL-33 della divulgazione includono anche derivati che sono modificati, ad esempio, dall'attaccamento covalente di qualsiasi tipo di molecola all'anticorpo in modo tale che l'attaccamento covalente non impedisca all'anticorpo di legarsi specificamente al suo epitopo affine. Per esempio, ma a titolo non limitativo, i derivati dell'anticorpo includono anticorpi che sono stati modificati, ad esempio, mediante glicosilazione, acetilazione, pegilazione, fosforilazione,

ammidazione, derivatizzazione da parte di gruppi protettivi/bloccanti noti, scissione proteolitica, collegamento a un ligando cellulare o ad altre proteine, eccetera. Una qualsiasi delle numerose modificazioni chimiche può essere compiuta mediante tecniche note, incluse, ma in via non limitativa, scissione chimica specifica, acetilazione, formilazione, eccetera. In aggiunta, il derivato può contenere uno o più amminoacidi non classici.

Una "sostituzione amminoacidica conservativa" è quella in cui il residuo amminoacidico viene sostituito con un residuo amminoacidico avente una catena laterale con una carica simile. Nell'arte sono state definite famiglie di residui amminoacidici aventi catene laterali con cariche simili. Queste famiglie includono amminoacidi con catene laterali basiche (ad esempio, lisina, arginina, istidina), catene laterali acide (ad esempio, acido aspartico, acido glutammico), catene laterali polari non caricate (ad esempio, glicina, asparagina, glutammina, serina, treonina, tirosina, cisteina), catene laterali non polari (ad esempio, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), catene laterali beta-ramificate (ad esempio, treonina, valina, isoleucina) e catene laterali aromatiche (ad esempio, tirosina, fenilalanina, triptofano, istidina). In alternativa, le mutazioni possono essere introdotte in modo casuale lungo tutta o parte della sequenza codificante, ad esempio mediante mutagenesi di saturazione, e i mutanti risultanti possono essere sottoposti a screening per l'attività

biologica per identificare i mutanti che mantengono l'attività (ad esempio, la capacità di legare un polipeptide anti-IL-33).

Per esempio, è possibile introdurre mutazioni solo nelle regioni di intelaiatura o solo nelle regioni CDR di una molecola anticorpale. Le mutazioni introdotte possono essere mutazioni missenso silenti o neutre, vale a dire, non hanno o hanno scarso effetto sulla capacità di un anticorpo di legare l'antigene. Questi tipi di mutazioni possono essere utili per ottimizzare l'uso dei codoni o migliorare la produzione di anticorpi di un ibridoma. In alternativa, mutazioni missenso non neutre possono alterare la capacità di un anticorpo di legare un antigene. È probabile che la posizione della maggior parte delle mutazioni missenso silenti e neutre sia nelle regioni di intelaiatura, mentre la posizione della maggior parte delle mutazioni missenso non neutre è probabile che sia nella CDR, sebbene questo non sia un requisito assoluto. Un tecnico del ramo sarebbe in grado di progettare e provare molecole mutanti con proprietà desiderate come nessuna alterazione nell'attività di legame all'antigene o alterazione nell'attività di legame (ad esempio, miglioramenti nell'attività di legame all'antigene o cambiamenti nella specificità dell'anticorpo o stabilità/omogeneità potenziate della molecola finale). A seguito di mutagenesi, la proteina codificata può essere espressa di routine e l'attività funzionale e/o biologica della proteina codificata (ad esempio, la capacità di legare in modo immunospecifico almeno un epitopo di un polipeptide IL-33) possono

essere determinate usando tecniche descritte nel presente documento o modificando di routine tecniche note nell'arte.

In determinate forme di realizzazione, gli anticorpi della divulgazione possono essere ottimizzati modificando i residui di intelaiatura situati nella regione/zona vernier o i residui proposti per supportare la struttura delle regioni CDR (si vedano, *ad esempio*, Foote, J. e G. Winter, J Mol.Biol. 224,2: 487-99 (1992); Padlan, E. A., Mol.Immunol 31.3: 169-217 (1994)). In alcune forme di realizzazione, queste modificazioni possono essere costruite usando mutagenesi sito-diretta mediata da PCR usando metodi di biologia molecolare standard. Gli anticorpi modificati possono essere provati per l'affinità di legame come divulgato nel presente documento. In un'altra forma di realizzazione, può anche essere eseguita un'ulteriore ottimizzazione, ad esempio mutazioni di ritorno o maturazione di affinità mediante l'introduzione di sostituzioni amminoacidiche nelle regioni CDR o mediante mutagenesi sito-diretta.

In determinate forme di realizzazione, gli anticorpi anti-IL-33 della divulgazione comprendono almeno una regione determinante la complementarità ottimizzata (CDR). Con "CDR ottimizzata" si intende che la CDR è stata modificata e sequenze ottimizzate selezionate in base all'affinità di legame sostenuta o migliorata e/o all'attività anti-IL-33 che viene impartita a un anticorpo anti-IL-33 comprendente la CDR ottimizzata. "Attività anti-IL-33" può includere, per esempio, un'attività che modula una o più delle seguenti attività associate a IL-33, ad

esempio, rilascio di citochine guidato da IL-33 da mastociti, cellule endoteliali e proliferazione di cellule TF-1; rilascio di mediatori (ad esempio, citochine o chemochine) da basofili, eosinofili, cellule Th2, NK, cellule NKT, macrofagi, o cellule dendritiche; modulazione dei recettori della superficie cellulare; modulazione di presentazione di antigene; o qualsiasi altra associazione di attività con IL-33. L'attività anti-IL-33 può anche essere attribuita a una diminuzione dell'incidenza o della gravità delle malattie associate all'espressione e/o al rilascio di IL-33, inclusi, ma in via non limitativa, determinati tipi di condizioni infiammatorie, ad esempio un disturbo allergico come asma o altra risposta infiammatoria nelle vie aeree di un soggetto. Le modificazioni possono implicare la sostituzione dei residui amminoacidici all'interno della CDR in modo tale che un anticorpo anti-IL-33 conservi la specificità per l'antigene IL-33 e abbia un'affinità di legame migliorata e/o un'attività anti-IL-33 migliorata.

IV. Polinucleotidi codificanti gli anticorpi anti-IL-33

La presente divulgazione fornisce anche molecole di acido nucleico codificanti anticorpi anti-IL-33 della divulgazione, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene.

In una forma di realizzazione, la presente divulgazione fornisce un polinucleotide isolato comprendente, costituito essenzialmente da, o costituito da un acido nucleico codificante un dominio variabile a catena pesante dell'immunoglobulina (dominio VH), dove almeno una delle CDR del dominio VH è codificata da una sequenza di acidi nucleici che è almeno il 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o

identica a una sequenza polinucleotidica di CDRH 1, 2 o 3 di una sequenza di codifica VH selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 5421, 531, 541, 551, 561, 571, e 581. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

In altre forme di realizzazione, la presente divulgazione fornisce un polinucleotide isolato comprendente, costituito essenzialmente da, o costituito da un acido nucleico codificante un dominio VH di immunoglobulina, in cui la sequenza di almeno una delle CDR del dominio VH è selezionata dal gruppo costituito da: (a) una sequenza CDRH1 comprendente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163, 173, 183, 193, 203, 213, 223, 233, 243, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 383, 393, 403, 413, 423, 433, 443, 453, 463, 473, 483, 493, 503, 513, 5423, 533, 543, 553, 563, 573 e 583; (b) una sequenza CDRH2 comprendente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, 204, 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394, 404, 414, 424, 434, 444, 454, 464, 474, 484, 494, 504,

514, 5424, 534, 544, 554, 564, 574; e 584, e (c) una sequenza CDRH3 comprendente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215, 225, 235, 245, 255, 265, 275, 285, 295, 305, 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375, 385, 395, 405, 415, 425, 435, 445, 455, 465, 475, 485, 495, 505, 515, 5425, 535, 545, 555, 565, 575 e 585. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

In un'ulteriore forma di realizzazione, la presente divulgazione include un polinucleotide isolato comprendente, costituito essenzialmente da, o costituito da un acido nucleico codificante un dominio VH che ha una sequenza amminoacidica che è almeno il 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% identica a una sequenza polipeptidica del dominio VH di riferimento comprendente SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 5422, 532, 542, 552, 562, 572, e 582, in cui un anticorpo anti-IL-33 comprendente il dominio VH codificato si lega specificamente o preferibilmente a IL-33. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

In una forma di realizzazione, la presente divulgazione fornisce un polinucleotide isolato comprendente, costituito essenzialmente da, o costituito da un acido nucleico codificante un dominio variabile a catena leggera dell'immunoglobulina (dominio VL), dove almeno una delle CDR del dominio VH è codificata da una sequenza di acidi nucleici che è almeno il 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o identica a una sequenza polinucleotidica di CDRL 1, 2 o 3 di una sequenza di codifica VL selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, e 586. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

In altre forme di realizzazione, la presente divulgazione fornisce un polinucleotide isolato comprendente, costituito essenzialmente da, o costituito da un acido nucleico codificante un dominio VL dell'immunoglobulina, in cui la sequenza di almeno una delle CDR del dominio VL è selezionata dal gruppo costituito da: (a) una sequenza CDRL1 comprendente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218, 228, 238, 248, 258, 268, 278, 288, 298, 308, 318, 328, 338, 348, 358, 368, 378, 388, 398, 408, 418, 428, 438, 448, 458, 468, 478, 488, 498, 508, 518, 528, 538, 548, 558, 568, 578,

e 588, (b) una sequenza CDRL2 comprendente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, 229, 239, 249, 259, 269, 279, 289, 299, 309, 319, 329, 339, 349, 359, 369, 379, 389, 399, 409, 419, 429, 439, 449, 459, 469, 479, 489, 499, 509, 519, 5429, 539, 549, 559, 569, 579, e 589, e (c) una sequenza CDRL3 comprendente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 5420, 530, 540, 550, 560, 570, 580 e 590,. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

In un'ulteriore forma di realizzazione, la presente divulgazione include un polinucleotide isolato comprendente, costituito essenzialmente da, o costituito da un acido nucleico codificante un dominio VL che ha una sequenza amminoacidica che è almeno il 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% identica a una sequenza polipeptidica del dominio VL di riferimento comprendente SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507,

517, 5427, 537, 547, 557, 567, 577, e 587, in cui un anticorpo anti-IL-33 comprendente il dominio VL codificato si lega specificamente o preferibilmente a IL-33. In determinate forme di realizzazione, l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene inibisce la produzione di citochine guidata da IL-33.

Uno qualsiasi dei polinucleotidi descritti sopra può inoltre includere acidi nucleici aggiuntivi, codificanti, *ad esempio*, un peptide segnale per dirigere la secrezione del polipeptide codificato, regioni costanti dell'anticorpo come descritto nel presente documento, o altri polipeptidi eterologhi come descritto nel presente documento. Inoltre, come descritto più dettagliatamente altrove nel presente documento, la presente divulgazione include composizioni comprendenti uno o più dei polinucleotidi descritti sopra.

In una forma di realizzazione, la divulgazione include composizioni comprendenti un primo polinucleotide e un secondo polinucleotide in cui detto primo polinucleotide codifica un dominio VH come descritto nel presente documento e in cui detto secondo polinucleotide codifica un dominio VL come descritto nel presente documento. Specificamente, una composizione che comprende, è costituita essenzialmente da, o è costituita da un polinucleotide codificante il dominio VH, come esposto in SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471,

481, 491, 501, 511, 5421, 531, 541, 551, 561, 571, o 581, e un polinucleotide codificante il dominio VL, per esempio, un polinucleotide codificante il dominio VL come esposto in SEQ ID NO: 66, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 5426, 536, 546, 556, 566, 576, o 586.

La presente divulgazione include anche frammenti dei polinucleotidi della divulgazione, come descritto altrove. In aggiunta, nella divulgazione sono contemplati anche polinucleotidi che codificano polipolipeptidi di fusione, frammenti Fab e altri derivati, come descritto nel presente documento.

I polinucleotidi possono essere prodotti o fabbricati mediante qualsiasi metodo noto nell'arte. Per esempio, se la sequenza nucleotidica dell'anticorpo è nota, un polinucleotide codificante l'anticorpo può essere assemblato da oligonucleotidi sintetizzati chimicamente (*ad esempio*, come descritto in Kutmeier et al., Bio Techniques 17:242 (1994)), che, brevemente, implica la sintesi di oligonucleotidi sovrapposti contenenti porzioni della sequenza codificante l'anticorpo, l'appaiamento e la ligazione di tali oligonucleotidi, e quindi l'amplificazione degli oligonucleotidi ligati mediante PCR.

In alternativa, un polinucleotide codificante un anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene della divulgazione, può essere generato dall'acido nucleico di una sorgente

idonea. Se un clone contenente un acido nucleico codificante un particolare anticorpo non è disponibile, ma la sequenza della molecola anticorpale è nota, un acido nucleico codificante l'anticorpo può essere sintetizzato chimicamente o ottenuto a partire da una sorgente idonea (*ad esempio*, una libreria di cDNA di anticorpo, o una libreria di cDNA generata da, o un acido nucleico, preferibilmente poli A+RNA, isolato da, qualsiasi tessuto o cellule che esprimono l'anticorpo o altro anticorpo anti-IL-33, come cellule di ibridoma selezionate per esprimere un anticorpo) mediante amplificazione PCR usando primer sintetici ibridizzabili alle estremità 3' e 5' della sequenza o mediante clonaggio usando una sonda oligonucleotidica specifica per la particolare sequenza genica per identificare, *ad esempio*, un clone di cDNA da una libreria di cDNA che codifica l'anticorpo anti-IL-33. Acidi nucleici amplificati generati mediante PCR possono quindi essere clonati in vettori di clonaggio replicabili usando qualsiasi metodo noto nell'arte.

Una volta determinata la sequenza nucleotidica e la sequenza amminoacidica corrispondente dell'anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, la sua sequenza nucleotidica può essere manipolata usando metodi ben noti nell'arte per la manipolazione di sequenze nucleotidiche, *ad esempio*, tecniche di DNA ricombinante, mutagenesi sito-diretta, PCR, eccetera (si vedano, per esempio, le tecniche descritte in Sambrook et al., (1990) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2^a edizione; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) e a cura di Ausubel et al., (1998)

Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY), per generare anticorpi aventi una diversa sequenza amminoacidica, per esempio per creare sostituzioni, delezioni, e/o inserzioni amminoacidiche.

Un polinucleotide codificante un anticorpo anti-IL, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, può essere composto da qualsiasi poliribonucleotide o polideossiribonucleotide, che può essere RNA o DNA non modificato o RNA o DNA modificato. Per esempio, un polinucleotide codificante un anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, può essere composto da DNA a singolo e a doppio filamento, DNA che è una miscela di regioni a singolo e a doppio filamento, RNA a singolo e a doppio filamento, e RNA che è una miscela di regioni a singolo e a doppio filamento, molecole ibride comprendenti DNA e RNA che possono essere a singolo filamento o, più tipicamente, a doppio filamento o una miscela di regioni a singolo e a doppio filamento. In aggiunta, un polinucleotide codificante un anticorpo anti-IL-33, o un relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene può essere composto da regioni a triplo filamento comprendenti RNA o DNA o sia RNA sia DNA. Un polinucleotide codificante un anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, può anche contenere una o più basi modificate o catene dorsali di DNA o RNA modificate per la stabilità o per altri motivi. Le basi "modificate" includono, per esempio, basi tritilate e basi non usuali come inosina. È

possibile apportare una varietà di modificazioni al DNA e all'RNA; quindi, "polinucleotide" comprende forme modificate chimicamente, enzimaticamente o metabolicamente.

Un polinucleotide isolato codificante una variante non naturale di un polipeptide derivato da un'immunoglobulina (*ad esempio*, una porzione a catena pesante o una porzione a catena leggera di immunoglobulina) può essere creato introducendo una o più sostituzioni, addizioni o delezioni nucleotidiche nella sequenza nucleotidica dell'immunoglobulina in modo tale che una o più sostituzioni, addizioni o delezioni amminoacidiche siano introdotte nella proteina codificata. Le mutazioni possono essere introdotte mediante tecniche standard, come mutagenesi sito-diretta e mutagenesi mediata da PCR. Preferibilmente, le sostituzioni amminoacidiche conservative vengono effettuate in corrispondenza di uno o più residui amminoacidici non essenziali.

V. Proteine di fusione e coniugati di anticorpi

Come esaminato più dettagliatamente altrove nel presente documento, gli anticorpi anti-IL-33 della divulgazione, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene, possono essere ulteriormente fusi in modo ricombinante a un polipeptide eterologo nell'estremità N o C o chimicamente coniugati (incluse le coniugazioni covalenti e non covalenti) a polipeptidi o altre composizioni. Per esempio, gli anticorpi anti-IL-33 possono essere fusi in modo ricombinante o coniugati a molecole utili come etichette in saggi di rilevamento e molecole effettrici come polipeptidi eterologhi, farmaci,

radionuclidi o tossine. Si vedano ad esempio, le pubblicazioni WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; il Brevetto statunitense n° 5,314,995; ed EP 396,387.

Gli anticorpi anti-IL-33 della divulgazione, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene, possono includere derivati che sono modificati, vale a dire, dall'attaccamento covalente di qualsiasi tipo di molecola all'anticorpo in modo tale che l'attaccamento covalente non impedisca all'anticorpo di legarsi specificamente al IL-33. Per esempio, ma a titolo non limitativo, i derivati dell'anticorpo includono anticorpi che sono stati modificati, ad esempio, mediante glicosilazione, acetilazione, pegilazione, fosforilazione, ammidazione, derivatizzazione da parte di gruppi protettivi/bloccanti noti, scissione proteolitica, collegamento a un ligando cellulare o ad altre proteine, eccetera. Una qualsiasi delle numerose modificazioni chimiche può essere compiuta mediante tecniche note, incluse, ma in via non limitativa, scissione chimica specifica, acetilazione, formilazione, eccetera. In aggiunta, il derivato può contenere uno o più amminoacidi non classici.

Gli anticorpi anti-IL-33 della divulgazione, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene, possono essere composti da amminoacidi uniti tra loro da legami peptidici o legami peptidici modificati, *vale a dire*, isosteri peptidici, e possono contenere amminoacidi diversi dai 20 amminoacidi codificati dal gene. Per esempio, gli anticorpi anti-IL-33 possono essere modificati da processi naturali, come l'elaborazione post-traduzionale, o da tecniche di

modificazione chimica che sono ben note nell'arte. Tali modificazioni sono ben descritte nei testi di base e in monografie più dettagliate, nonché in una voluminosa letteratura di ricerca. Le modificazioni possono verificarsi ovunque nell'anticorpo anti-IL-33, o nel relativo frammento di legame all'antigene, inclusa la catena dorsale del peptide, le catene laterali degli amminoacidi e i terminali ammino o carbossilici, o su frazioni funzionali come i carboidrati. Si apprezzerà che lo stesso tipo di modificazione può essere presente nello stesso grado o in gradi variabili in svariati siti in un dato anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento di legame all'antigene. Inoltre, un dato anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento di legame all'antigene, può contenere molti tipi di modificazioni. Le modificazioni includono acetilazione, acilazione, ribosilazione ADP, ammidazione, attaccamento covalente di flavina, attaccamento covalente di una frazione funzionale eme, attaccamento covalente di un nucleotide o derivato nucleotidico, attaccamento covalente di un lipide o derivato lipidico, attaccamento covalente di fosfotidilinositolo, reticolazione, ciclizzazione, formazione di legami disolfuro, demetilazione, formazione di legami crociati covalenti, formazione di cisteina, formazione di piroglutammato, formilazione, gamma-carbossilazione, glicosilazione, formazione di ancoraggio GPI, idrossilazione, iodinazione, metilazione, miristoilazione, ossidazione, pegilazione, processamento proteolitico, fosforilazione, prenilazione, racemizzazione, selenoilazione, solfatazione, addizione di amminoacidi mediata da trasferimento-RNA a proteine come arginilazione, e

ubiquitinazione. (Si vedano, per esempio, Proteins--Structure and Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, NY; 2^a edizione (1993); Johnson, edizione (1983) Posttranslational Covalent Modification of Proteins (Academic Press, NY), pagine 1-12; Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann. NY Acad. Sci. 663:48-62 (1992)).

La presente divulgazione fornisce anche proteine di fusione comprendenti un anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante, o derivato di legame all'antigene, e un polipeptide eterologo. Il polipeptide eterologo al quale è fuso l'anticorpo può essere utile per la funzione o è utile per bersagliare le cellule che esprimono il polipeptide anti-IL-33.

In una forma di realizzazione, una proteina di fusione della divulgazione comprende, è costituita essenzialmente da, o è costituita da un polipeptide avente la sequenza amminoacidica di uno o più dei domini VH di un anticorpo della divulgazione o la sequenza amminoacidica di uno qualsiasi o più dei domini VL di un anticorpo della divulgazione o relativi frammenti o varianti, e una sequenza polipeptidica eterologa.

In un'altra forma di realizzazione, una proteina di fusione per l'uso nei metodi diagnostici e di trattamento divulgata nel presente documento comprende, è costituita essenzialmente da, o è costituita da un polipeptide avente la sequenza amminoacidica di uno, due, tre delle CDR del dominio VH di un anticorpo anti-IL-33, o relativi frammenti, varianti o derivati, o la sequenza amminoacidica di una, due, tre delle

CDR del dominio VL di un anticorpo anti-IL-33, o relativi frammenti, varianti o derivati e una sequenza polipeptidica eterologa.

In una forma di realizzazione, una proteina di fusione comprende un polipeptide avente la sequenza amminoacidica di almeno un dominio VH di un anticorpo anti-IL-33 della divulgazione e la sequenza amminoacidica di almeno un dominio VL di un anticorpo anti-IL-33 della divulgazione o relativi frammenti, derivati o varianti, e una sequenza polipeptidica eterologa. Preferibilmente, i domini VH e VL della proteina di fusione corrispondono a un singolo anticorpo sorgente (o frammento scFv o Fab) che lega specificamente almeno un epitopo di IL-33.

In ancora un'altra forma di realizzazione, una proteina di fusione per l'uso nei metodi diagnostici e di trattamento divulgata nel presente documento comprende un polipeptide avente la sequenza amminoacidica di una qualsiasi, due, tre o più delle CDR del dominio VH di un anticorpo anti-IL-33 e la sequenza amminoacidica di una qualsiasi, due, tre o più delle CDR del dominio VL di un anticorpo anti-IL-33, o relativi frammenti o varianti, e una sequenza polipeptidica eterologa. Preferibilmente, due, tre, quattro, cinque, sei o più dell'una o più CDR del dominio VH o del dominio VL corrispondono a un singolo anticorpo sorgente (o frammento scFv o Fab) della divulgazione. Anche le molecole di acido nucleico codificanti queste proteine di fusione sono inglobate nella divulgazione.

Le proteine di fusione esemplificative segnalate in letteratura includono fusioni del recettore delle cellule T (Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. STATI UNITI 84:2936-2940 (1987)); CD4 (Capon et al., Nature 337:525-531 (1989); Traunecker et al., Nature 339:68-70 (1989); Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. STATI UNITI 9:347-353 (1990); e Byrn et al., Nature 344:667-670(1990)); L-selectina (recettore di localizzazione) (Watson et al., J. Cell. Biol. 130:2221-2229 (1990); e Watson et al., Nature 349:164-167 (1991)); CD44 (Aruffo et al., Cell 61:1303-1313 (1990)); CD28 e B7 (Linsley et al., J. Exp. Med. 173:721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley et al., J. Exp. Med. 174:561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic et al., Cell 66:1333-1344 (1991)); recettore TNF (Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. STATI UNITI 88:10535-10539 (1991); Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27:2883-2886 (1991); E Peppel et al., J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991)); e recettore di IgE a (Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. Volume 135, n° estratto 1448 (1991)).

Come esaminato altrove nel presente documento, gli anticorpi anti-IL-33 della divulgazione, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene, possono essere fusi a polipeptidi eterologhi per aumentare l'emivita *in vivo* dei polipeptidi o per l'uso in saggi immunologici usando metodi noti nell'arte. Per esempio, in una forma di realizzazione, il PEG può essere coniugato agli anticorpi anti-IL-33 della divulgazione per aumentare la loro emivita *in vivo*. Si veda, Leong et al.,

Cytokine 16: 106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002); o Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002).

Inoltre, gli anticorpi anti-IL-33 della divulgazione, o relativi frammenti varianti o derivati di legame all'antigene, possono essere fusi a sequenze di marcatore, come un peptide per facilitare la loro purificazione o rilevamento. In forme di realizzazione preferite, la sequenza amminoacidica di marcatore è un peptide di esa-istidina, come il tag fornito in un vettore pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91313), tra gli altri, molti dei quali sono disponibili in commercio. Come descritto in Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. STATI UNITI 86:821-824 (1989), per esempio, l'esa-istidina fornisce la purificazione conveniente della proteina di fusione. Altri tag peptidici utili per la purificazione includono, ma in via non limitativa, il tag "HA", che corrisponde a un epitopo derivato dalla proteina emoagglutinina influenzale (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) e il tag "etichetta".

Le proteine di fusione possono essere preparate usando metodi che sono ben noti nell'arte (si vedano per esempio i Brevetti statunitensi n° 5,136,964 e 5,225,538). Il sito preciso in cui viene effettuata la fusione può essere selezionato empiricamente per ottimizzare la secrezione o le caratteristiche di legame della proteina di fusione. Il DNA codificante per la proteina di fusione viene quindi trasfettato in una cellula ospite per l'espressione.

Gli anticorpi anti-IL-33 della presente divulgazione, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene, possono essere

usati in forma non coniugata o possono essere coniugati ad almeno una di una varietà di molecole, ad esempio, per migliorare le proprietà terapeutiche della molecola, per facilitare il rilevamento del bersaglio, o per la formazione di immagini o la terapia del paziente. Gli anticorpi anti-IL-33 della divulgazione, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene, possono essere etichettati o coniugati prima o dopo la purificazione, o quando viene eseguita la purificazione.

In particolare, gli anticorpi anti-IL-33 della divulgazione, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame dell'antigene, possono essere coniugati con agenti terapeutici, profarmaci, peptidi, proteine, enzimi, virus, lipidi, modificatori della risposta biologica, agenti farmaceutici, o PEG.

I tecnici del ramo apprezzeranno che i coniugati possono anche essere assemblati usando una varietà di tecniche a seconda dell'agente selezionato da coniugare. Per esempio, i coniugati con la biotina vengono preparati, *ad esempio*, facendo reagire un polipeptide legante con un estere attivato della biotina come l'estere della biotina N-idrossisuccinimide. Analogamente, coniugati con un marcatore fluorescente possono essere preparati in presenza di un agente di accoppiamento, ad esempio quelli elencati nel presente documento, o mediante reazione con un isotiocianato, preferibilmente fluoresceina-isotiocianato. I coniugati degli anticorpi anti-IL-33 della divulgazione, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene, vengono preparati in un modo analogo.

La presente divulgazione ingloba inoltre anticorpi anti-IL-33 della divulgazione, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene, coniugati con un agente diagnostico o terapeutico. Gli anticorpi anti-IL-33, inclusi relativi frammenti, varianti e derivati di legame all'antigene, possono essere usati in modo diagnostico, per esempio, per monitorare lo sviluppo o la progressione di una malattia come parte di una procedura di prove cliniche per, *ad esempio*, determinare l'efficacia di un dato trattamento e/o regime di prevenzione. Per esempio, il rilevamento può essere facilitato accoppiando l'anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, a una sostanza rilevabile. Esempi di sostanze rilevabili includono vari enzimi, gruppi protesici, materiali fluorescenti, materiali luminescenti, materiali bioluminescenti, materiali radioattivi, metalli che emettono positroni usando varie tomografie a emissione di positroni e ioni metallici paramagnetici non radioattivi. Si veda, per esempio, il Brevetto statunitense n° 4,741,900 per ioni metallici che possono essere coniugati ad anticorpi per l'uso come diagnostica secondo la presente divulgazione. Esempi di enzimi idonei includono perossidasi di rafano, fosfatasi alcalina, β -galattosidasi o acetilcolinesterasi; esempi di complessi di gruppi protesici idonei includono streptavidina/biotina e avidina/biotina; esempi di materiali fluorescenti idonei includono umbelliferone, fluoresceina, fluoresceina isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceina, dansil cloruro o ficoeritrina; un esempio di un materiale luminescente include

luminol; esempi di materiali bioluminescenti includono luciferasi, luciferina e aequorina; ed esempi di materiale radioattivo idonei includono ^{125}I , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , o ^{99}Tc .

Un anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, può anche essere etichettato in modo rilevabile accoppiandolo a un composto chemiluminescente. La presenza dell'anticorpo anti-IL-33 con tag chemiluminescente, o relativo frammento di legame all'antigene, viene quindi determinata rilevando la presenza di luminescenza che si manifesta nel corso di una reazione chimica. Esempi di composti di etichettatura chemiluminescente particolarmente utili sono luminolo, isoluminolo, estere di acridinio teromatico, imidazolo, sale di acridinio ed estere di ossalato.

Uno dei modi in cui un anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, può essere etichettato in modo rilevabile consiste nel collegare lo stesso a un enzima e usando il prodotto collegato in un saggio immunoenzimatico (EIA) (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md.; Diagnostic Horizons 2:1-7 (1978); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978); Butler, Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981); maggio, edizione (1980) Enzyme Immunoassay, CRC Press, a cura di Boca Raton, Fla.; Ishikawa et al., (1981) Enzyme Immunoassay (Kagaku Shoin, Tokyo). L'enzima, che è legato all'anticorpo anti-IL-33 reagirà con un substrato appropriato, preferibilmente un substrato cromogenico, in

modo tale da produrre una frazione funzionale chimica che può essere rilevata, per esempio, mediante spettrofotometria, fluorimetria o mediante mezzi visivi. Gli enzimi che possono essere usati per etichettare in modo rilevabile l'anticorpo includono, ma in via non limitativa, malato deidrogenasi, nucleasi stafilococcica, isomerasi delta-5-steroidi, lievito alcol deidrogenasi, alfa-glicerofosfato deidrogenasi, trioso fosfato isomerasi, perossidasi di rafano, fosfatasi alcalina, asparaginasi, glucosio ossidasi, beta-galattosidasi, ribonucleasi, ureasi, catalasi, glucosio-6-fosfato deidrogenasi, glucoamilasi e acetilcolinesterasi. In aggiunta, il rilevamento può essere compiuto mediante metodi colorimetrici che impiegano un substrato cromogenico per l'enzima. In aggiunta, il rilevamento può essere compiuto mediante metodi fluorescenti, per cui un metallo che emette fluorescenza come ^{152}Eu , o altri della serie di lantanidi è legato direttamente o indirettamente all'anticorpo anti-IL-33. Il rilevamento può anche essere compiuto mediante confronto visivo dell'entità della reazione enzimatica di un substrato rispetto a standard preparati in modo simile.

Il rilevamento può anche essere compiuto usando uno qualsiasi di una varietà di altri saggi immunologici. Per esempio, marcando radioattivamente l'anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, è possibile rilevare l'anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, attraverso l'uso di un saggio radioimmunologico (RIA) (si veda, per esempio, Weintraub (marzo 1986) *Principles of Radioimmunoassays*, Seventh Training Course on

Radioligand Assay Techniques (The Endocrine Society), che è incorporato nel presente documento per riferimento). L'isotopo radioattivo può essere rilevato mediante mezzi che includono, ma in via non limitativa, un contatore gamma, un contatore a scintillazione o autoradiografia.

Un anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, può anche essere etichettato in modo rilevabile usando metalli che emettono fluorescenza come ^{152}Eu , o altri della serie dei lantanidi. Questi metalli possono essere attaccati all'anticorpo, o al relativo frammento di legame all'antigene, usando gruppi chelanti di metalli come acido dietilentriamminopentacetico (DTPA) o acido etilendiamminotetraacetico (EDTA).

Le tecniche per coniugare varie frazioni funzionali a un anticorpo (*ad esempio*, un anticorpo anti-IL-33), o un relativo frammento, variante, derivato di legame all'antigene sono ben note, si veda ad esempio, Amon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pagine 243-56; Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery," in Controlled Drug Delivery, edizione Robinson et al. (2^a edizione.; Marcel Dekker, Inc.), pagine 623-53); Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, edizione Pinchera et al., pagine 475-506; "Analysis, Results, and Future Prospective of the

Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, ed. Baldwin et al., Academic Press, pagine 303-16 (1985); e Thorpe et al. (1982) "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates," Immunol. Rev. 62:139-58.

VI. Espressione di polipeptidi anticorpali

Le sequenze di DNA che codificano le catene leggere e pesanti dell'anticorpo possono essere prodotte, simultaneamente o separatamente, usando la trascrittasi inversa e la DNA polimerasi secondo metodi ben noti. La PCR può essere avviata da primer a regione costante di consenso o da primer più specifici basati sulle sequenze di DNA e amminoacidi a catena pesante e leggera pubblicate. Come esaminato sopra, la PCR può anche essere usata per isolare cloni di DNA codificanti le catene leggere e pesanti dell'anticorpo. In questo caso le librerie possono essere sottoposte a screening mediante primer di consenso o sonde omologhe più grandi, come le sonde della regione costante di topo.

Il DNA, tipicamente DNA plasmidico, può essere isolato dalle cellule usando tecniche note nell'arte, mappato con restrizione e sequenziato secondo tecniche standard ben note esposte in dettaglio, *ad esempio*, nei riferimenti precedenti relativi alle tecniche di DNA ricombinante. Ovviamente, il DNA può essere sintetico secondo la presente divulgazione in qualsiasi momento durante il processo di isolamento o la successiva analisi.

A seguito di manipolazione del materiale genetico isolato per fornire anticorpi anti-IL-33, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene, della divulgazione, i polinucleotidi codificanti gli anticorpi anti-IL-33 vengono tipicamente inseriti in un vettore di espressione per l'introduzione nelle cellule ospiti che possono essere usate per produrre la quantità desiderata di anticorpo anti-IL-33.

L'espressione ricombinante di un anticorpo, o relativo frammento, derivato o analogo, *ad esempio*, una catena pesante o leggera di un anticorpo che si lega a una molecola bersaglio descritta nel presente documento, ad esempio IL-33, richiede la costruzione di un vettore di espressione contenente un polinucleotide che codifica l'anticorpo. Una volta ottenuto un polinucleotide codificante una molecola anticorpale o una catena pesante o leggera di un anticorpo, o una relativa porzione (preferibilmente contenente il dominio variabile a catena pesante o leggera), della divulgazione, il vettore per la produzione della molecola anticorpale può essere prodotto mediante tecnologia di DNA ricombinante usando tecniche ben note nell'arte. Quindi, nel presente documento sono descritti metodi per preparare una proteina mediante espressione di un polinucleotide contenente una sequenza nucleotidica codificante l'anticorpo. Metodi che sono ben noti ai tecnici del ramo possono essere usati per costruire vettori di espressione contenenti sequenze codificanti anticorpi e segnali di controllo trascrizionali e traduzionali appropriati. Questi metodi includono, per esempio, tecniche di DNA ricombinante *in vitro*, tecniche

sintetiche e ricombinazione genetica in vivo. La divulgazione, quindi, fornisce vettori replicabili comprendenti una sequenza nucleotidica codificante una molecola anticorpale della divulgazione, o una relativa catena pesante o leggera, o un dominio variabile a catena pesante o leggera, operativamente collegati a un promotore. Tali vettori possono includere la sequenza nucleotidica codificante la regione costante della molecola anticorpale (si veda, *ad esempio* la Pubblicazione PCT WO 86/05807; la Pubblicazione PCT WO 89/01036; e il Brevetto statunitense n° 5,122,464) e il dominio variabile dell'anticorpo può essere clonato in un tale vettore per l'espressione dell'intera catena pesante o leggera.

Il termine "vettore" o l'espressione "vettore di espressione" vengono usati nel presente documento per indicare vettori usati secondo la presente divulgazione come un veicolo per introdurre ed esprimere un gene desiderato in una cellula ospite. Come noto ai tecnici del ramo, tali vettori possono essere facilmente selezionati dal gruppo costituito da plasmidi, fagi, virus e retrovirus. In generale, i vettori compatibili con la presente divulgazione comprenderanno un marcatore di selezione, siti di restrizione appropriati per facilitare il clonaggio del gene desiderato e la capacità di immettersi e/o replicarsi in cellule eucariotiche o procariotiche.

Ai fini di questa divulgazione, possono essere impiegati numerosi sistemi di vettori di espressione. Per esempio, una classe di vettori utilizza elementi di DNA che sono derivati da virus animali come

virus del papilloma bovino, polioma virus, adenovirus, vaccinia virus, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Altri implicano l'uso di sistemi policistronici con siti di legame ribosomiali interni. In aggiunta, le cellule che hanno integrato il DNA nei loro cromosomi possono essere selezionate introducendo uno o più marcatori che consentono la selezione delle cellule ospiti trasfettate. Il marcatore può fornire prototrofia a un ospite auxotrofico, resistenza ai biocidi (*ad esempio*, antibiotici) o resistenza ai metalli pesanti come il rame. Il gene marcatore selezionabile può essere direttamente legato alle sequenze di DNA da esprimere o introdotto nella stessa cellula mediante cotrasformazione. Possono essere necessari anche elementi aggiuntivi per una sintesi ottimale dell'mRNA. Questi elementi possono includere sequenze segnale, segnali di splicing, nonché promotori trascrizionali, potenziatori, e segnali di terminazione.

In alcune forme di realizzazione particolarmente preferite i geni della regione variabile clonati sono inseriti in un vettore di espressione unitamente ai geni della regione costante a catena pesante e leggera (preferibilmente, umani) sintetizzati come esaminato sopra. Ovviamente, qualsiasi vettore di espressione che sia in grado di indurre l'espressione nelle cellule eucariotiche può essere usato nella presente divulgazione. Esempi di vettori idonei includono, ma in via non limitativa, plasmidi pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF 1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, e pZeoSV2 (disponibili da Invitrogen, San Diego, Calif.), e plasmide pCI (disponibile

da Promega, Madison, Wis.). In generale, lo screening di un cospicuo numero di cellule trasformate per quelle che esprimono livelli idoneamente elevati di catene pesanti e leggere di immunoglobulina è una sperimentazione di routine che può essere compiuta, per esempio, mediante sistemi robotici.

Più in generale, una volta che il vettore o la sequenza di DNA codificante una sottounità monomerica dell'anticorpo anti-IL-33 è stato preparato, il vettore di espressione può essere introdotto in una cellula ospite appropriata. L'introduzione del plasmide nella cellula ospite può essere compiuta mediante varie tecniche ben note ai tecnici del ramo. Queste includono, ma in via non limitativa, trasfezione (inclusa elettroforesi ed elettroporazione), fusione di protoplasti, precipitazione con fosfato di calcio, fusione cellulare con DNA avvolto, microiniezione e infezione con virus intatto. Si veda Ridgway (1988) "Mammalian Expression Vectors" in *Vectors*, edizione Rodriguez e Denhardt (Butterworths, Boston, Mass.), Capitolo 24.2, pagine 470-472. Tipicamente, l'introduzione del plasmide nell'ospite avviene tramite elettroporazione. Le cellule ospiti che ospitano il costrutto di espressione vengono coltivate in condizioni appropriate per la produzione delle catene leggere e pesanti, e saggiate per la sintesi proteica delle catene pesanti e/o leggere. Tecniche di saggio esemplificative includono un saggio immunoassorbente legato a un enzima (ELISA), un saggio radioimmunologico (RIA), o analisi di

selezione cellulare attivata da fluorescenza (FACS), immunoistochimica e simili.

Il vettore di espressione viene trasferito a una cellula ospite mediante tecniche convenzionali, e le cellule trasfettate vengono quindi coltivate mediante tecniche convenzionali per produrre un anticorpo per l'uso nei metodi descritti nel presente documento. Quindi, la divulgazione include cellule ospiti contenenti un polinucleotide codificante un anticorpo della divulgazione, o una relativa catena pesante o leggera, operativamente collegate a un promotore eterologo. In forme di realizzazione preferite per l'espressione di anticorpi a doppia catena, vettori codificanti sia la catena pesante sia quella leggera possono essere co-espressi nella cellula ospite per l'espressione dell'intera molecola immunoglobulinica, come descritto in dettaglio di seguito.

Come usato nel presente documento, "cellule ospiti" si riferisce a cellule che ospitano vettori costruiti usando tecniche di DNA ricombinante e codificanti almeno un gene eterologo. Nelle descrizioni dei processi per l'isolamento di anticorpi da ospiti ricombinanti, il termine "cellula" e l'espressione "coltura cellulare" sono usati in modo intercambiabile per denotare la sorgente dell'anticorpo salvo non sia chiaramente specificato diversamente. In altre parole, il recupero del polipeptide dalle "cellule" può significare da cellule intere centrifugate, o dalla coltura cellulare contenente sia il terreno sia le cellule sospese.

Una varietà di sistemi di vettori di espressione dell'ospite può essere utilizzata per esprimere molecole anticorpali per l'uso nei metodi descritti nel presente documento. Tali sistemi di espressione dell'ospite rappresentano veicoli mediante i quali le sequenze codificanti di interesse possono essere prodotte e successivamente purificate, ma rappresentano anche cellule che possono, una volta trasformate o trasfettate con le sequenze codificanti nucleotidiche appropriate, esprimere una molecola anticorpale della divulgazione in situ. Questi includono, ma in via non limitativa, microorganismi come batteri (*ad esempio, E. coli, B. subtilis*) trasformati con vettori di espressione di DNA di batteriofago ricombinante, DNA plasmidico o DNA cosmidico contenenti sequenze codificanti l'anticorpo; lievito (*ad esempio, Saccharomyces, Pichia*) trasformato con vettori di espressione di lievito ricombinante contenenti sequenze codificanti l'anticorpo; sistemi di cellule di insetto infettati con vettori di espressione di virus ricombinante (*ad esempio, baculovirus*) contenenti sequenze codificanti l'anticorpo; sistemi di cellule vegetali infettati con vettori di espressione di virus ricombinante (*ad esempio, virus del mosaico del cavolfiore, CaMV; virus del mosaico del tabacco, TMV*) o trasformati con vettori di espressione plasmidica ricombinanti (*ad esempio, plasmide Ti*) contenenti sequenze codificanti l'anticorpo; o sistemi di cellule di mammifero (*ad esempio, cellule COS, CHO, BLK, 293, 3T3*) che ospitano costrutti di espressione ricombinanti contenenti promotori derivati dal genoma di cellule di mammifero (*ad esempio, promotore di*

metallotioneina) o da virus di mammifero (*ad esempio*, il promotore tardivo dell'adenovirus; il promotore 7.5K del vaccinia virus). Preferibilmente, le cellule batteriche come *Escherichia coli*, e più preferibilmente le cellule eucariotiche, nella fattispecie, per l'espressione dell'intera molecola anticorpale ricombinante, vengono usate per l'espressione di una molecola anticorpale ricombinante. Per esempio, cellule di mammifero, come le cellule di ovaio di criceto cinese (CHO), congiuntamente con un vettore come il principale elemento promotore del gene precoce intermedio da citomegalovirus umano, è un sistema di espressione efficace per anticorpi (Foecking et al., *Gene*, 45:101 (1986); Cockett et al., *Bio/Technology*, 8:2 (1990)).

La linea cellulare ospite usata per l'espressione della proteina è spesso di origine mammifera; ai tecnici del ramo viene attribuita la capacità di determinare preferibilmente particolari linee cellulari ospiti che sono più adatte affinché il prodotto genico desiderato venga espresso in esse. Linee cellulari ospiti esemplificative includono, ma in via non limitativa, CHO (ovaio di criceto cinese), DG44 e DUXB13 (linee di ovaio di criceto cinese, DHFR minus), HELA (carcinoma cervicale umano), CVI (linea di rene di scimmia), COS (un derivato di CVI con antigene T SV40), VERY, BHK (rene di criceto neonato), MDCK, 293, WI38, R1610 (fibroblasto di criceto cinese) BALBC/3T3 (fibroblasto di topo), HAK (linea di rene di criceto), SP2/O (mieloma di topo), P3.times.63-Ag3.653 (mieloma di topo), BFA-lclBPT (cellule endoteliali bovine), RAJI (linfocita umano) e 293 (rene umano). Le linee cellulari

ospiti sono tipicamente disponibili presso servizi commerciali, l'American Tissue Culture Collection o dalla letteratura pubblicata.

In aggiunta, può essere scelto un ceppo di cellula ospite che modula l'espressione delle sequenze inserite, oppure modifica e processa il prodotto genico nella specifica maniera desiderata. Tali modificazioni (*ad esempio*, glicosilazione) e processamento (*ad esempio*, scissione) di prodotti proteici possono essere importanti per il funzionamento della proteina. Cellule ospiti diversi hanno meccanismi caratteristici e specifici per il processamento e la modificazione post-traduzionali di proteine e prodotti genici. Linee cellulari o sistemi ospite appropriati possono essere scelti per garantire la modificazione e il processamento corretti della proteina estranea espressa. A tal fine, possono essere usate cellule ospiti eucariotiche che possiedono il meccanismo cellulare per un corretto processamento del trascritto primario, della glicosilazione, e della fosforilazione del prodotto genico.

Per la produzione a lungo termine e a resa elevata di proteine ricombinanti è preferita un'espressione stabile. Per esempio, possono essere ingegnerizzate linee cellulari che esprimono stabilmente la molecola anticorpale. Aniché usare vettori di espressione che contengono origini di replicazione virali, le cellule ospite possono essere trasformate con DNA controllato mediante elementi di controllo di espressione appropriati (*ad esempio*, un promotore, un potenziatore, sequenze, terminatori di trascrizione, siti di poliadenilazione, eccetera), e un marcatore selezionabile. Dopo l'introduzione del DNA estraneo, le

cellule ingegnerizzate possono essere lasciate crescere per 1-2 giorni in un terreno arricchito, e in seguito passate a un terreno selettivo. Il marcatore selezionabile nel plasmide ricombinante conferisce resistenza alla selezione e consente alle cellule di integrare stabilmente il plasmide nei loro cromosomi e crescere per formare foci che a loro volta possono essere clonati ed espansi in linee cellulari. Questo metodo può essere usato vantaggiosamente per ingegnerizzare linee cellulari che esprimono stabilmente la molecola anticorpale.

Possono essere usati numerosi sistemi di selezione, inclusi, ma in via non limitativa, timidina chinasi (Wigler et al., Cell, 13:223 (1977)), ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. STATI UNITI, 48:202 (1992)), e adenina fosforibosiltransferasi (Lowy et al., Cell, 22:817 (1980)) del virus herpes simplex in cellule tk, hgprt o aprt, rispettivamente. Inoltre, può essere usata la resistenza agli antimetaboliti come base di selezione per i seguenti geni: dhfr, che conferisce resistenza al metotrexato (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. STATI UNITI, 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. STATI UNITI, 78:1527 (1981)); gpt, che conferisce resistenza all'acido micofenolico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. STATI UNITI 78:2072 (1981)); neo, che conferisce resistenza all'amminoglicoside G-418 Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu e Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); e Morgan e Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); TIB TECH

13(5):155-215 (maggio, 1993)); e hygro, che conferisce resistenza all'igromicina (Santerre et al., Gene, 30:147 (1984). Metodi comunemente noti nell'arte della tecnologia del DNA ricombinante che possono essere usati sono descritti in Ausubel et al. (1993) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY); Kriegler (1990) "Gene Transfer and Expression" in A Laboratory Manual (Stockton Press, NY); Dracopoli et al. (eds) (1994) Current Protocols in Human Genetics (John Wiley & Sons, NY) Capitoli 12 e 13; Colberre-Garapin et al. (1981) J. Mol. Biol. 150:1.

I livelli di espressione di una molecola anticorpale possono essere aumentati mediante amplificazione del vettore (per una revisione, si veda Bebbington e Hentschel, (1987) "The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning" (Academic Press, NY) Volume 3. Quando un marcatore nel sistema vettore che esprime l'anticorpo è amplificabile, un aumento del livello di inibitore presente nella coltura di cellula ospite aumenterà il numero di copie del gene marcatore. Poiché la regione amplificata è associata al gene dell'anticorpo, aumenterà anche la produzione dell'anticorpo (Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)).

La produzione *in vitro* consente l'incremento su larga scala per fornire grandi quantità dei polipeptidi desiderati. Le tecniche per la coltivazione di cellule di mammifero in condizioni di coltura tissutale sono note nell'arte e includono coltura in sospensione omogenea, *ad esempio* in un reattore airlift o in un reattore ad agitatore continuo, o

coltura cellulare immobilizzata o intrappolata, ad esempio in fibre cave, microcapsule, su microsfele di agarosio o cartucce di ceramica. Se necessario e/o desiderato, le soluzioni di polipeptidi possono essere purificate mediante metodi cromatografici consueti, per esempio gel filtrazione, cromatografia a scambio ionico, cromatografia su DEAE-cellulosa o cromatografia di (immuno-)affinità, *ad esempio*, dopo biosintesi preferenziale di un polipeptide di regione cerniera sintetica o prima o dopo la fase di cromatografia HIC descritta nel presente documento.

Geni codificanti anticorpi anti-IL-33, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene della divulgazione possono anche essere espressi in cellule non mammifere come insetti, batteri o lieviti o cellule vegetali. I batteri che assorbono prontamente gli acidi nucleici includono membri degli enterobatteri, come i ceppi di *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, come *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, e *Haemophilus influenzae*. Si apprezzerà inoltre che, quando espressi nei batteri, i polipeptidi eterologhi diventano tipicamente parte dei corpi di inclusione. I polipeptidi eterologhi devono essere isolati, purificati e quindi assemblati in molecole funzionali. Laddove siano desiderate forme tetravalenti di anticorpi, le sottounità si autoassemblano in anticorpi tetravalenti (WO 02/096948A2).

In sistemi batterici, numerosi vettori di espressione possono essere vantaggiosamente selezionati a seconda dell'uso previsto per la molecola anticorpale che viene espressa. Per esempio, quando viene

prodotta una cospicua quantità di tale proteina, per la generazione di composizioni farmaceutiche di una molecola anticorpale, possono essere desiderabili vettori che dirigono l'espressione di elevati livelli di prodotti di proteine di fusione che sono prontamente purificati. Tali vettori includono, ma in via non limitativa, il vettore di espressione di *E. coli* pUR278 (Ruther et al., EMBO, 2:1791 (1983)), in cui la sequenza codificante l'anticorpo può essere ligata singolarmente nel vettore nel quadro con la regione codificante lacZ in modo che sia prodotta una proteina di fusione; vettori pIN (Inouye e Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol Chem. 24:5503-5509 (1989)); e simili. Possono anche essere usati vettori pGEX per esprimere polipeptidi estranei come proteine di fusione con glutatione-S-transferasi (GST). In generale, tali proteine di fusione sono solubili e possono essere facilmente purificate da cellule lisate mediante assorbimento e legame a sferette di matrice glutatione-agarosio, a cui segue eluizione in presenza di glutatione libero. I vettori pGEX sono progettati per includere siti di scissione proteasica di trombina o fattore Xa in modo tale che il prodotto genico bersaglio clonato possa essere rilasciato dalla frazione funzionale GST.

Oltre ai procarioti, possono essere usati anche microbi eucarioti. *Saccharomyces cerevisiae*, o lievito di birra comune, è il più comunemente usato tra i microrganismi eucarioti sebbene siano comunemente disponibili numerosi altri ceppi, *ad esempio*, *Pichia pastoris*.

Per l'espressione in *Saccharomyces*, il plasmide YRp7, per esempio, (Stinchcomb et al., Nature 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene 10:157 (1980)) è comunemente usato. Questo plasmide contiene già il gene TRP1 che fornisce un marcatore di selezione per un ceppo mutante di lievito privo della capacità di crescere in triptofano, per esempio n° ATCC 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics 85:12 (1977)). La presenza della lesione *trp1* come una caratteristica del genoma della cellula ospite di lievito fornisce quindi un ambiente efficace per rilevare la trasformazione mediante crescita in assenza di triptofano.

In un sistema di insetto, il virus della poliedrosi nucleare di *Autographa californica* (AcNPV) viene tipicamente usato come vettore per esprimere geni estranei. Il virus cresce nelle cellule di *Spodoptera frugiperda*. La sequenza codificante l'anticorpo può essere clonata singolarmente in regioni non essenziali (per esempio il gene della poliedrina) del virus e posta sotto il controllo di un promotore AcNPV (per esempio, il promotore della poliedrina).

Una volta che un anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene della divulgazione è stato espresso in modo ricombinante, esso può essere purificato mediante qualsiasi metodo noto nell'arte per la purificazione di una molecola immunoglobulinica, per esempio, mediante cromatografia (*ad esempio*, a scambio ionico, di affinità, in particolare per affinità dell'antigene specifico dopo la Proteina A, e cromatografia su colonna di dimensionamento), centrifugazione,

solubilità differenziale, o mediante qualsiasi altra tecnica standard per la purificazione delle proteine. In alternativa, un metodo preferito per aumentare l'affinità degli anticorpi della divulgazione è divulgato nella Pubblicazione di domanda di brevetto statunitense n° 2002 0123057 A1.

VII. Metodi di trattamento che usano anticorpi Anti-il-33 terapeutici

I metodi della divulgazione sono diretti all'uso di anticorpi anti-IL-33, inclusi relativi frammenti, varianti e derivati di legame all'antigene per trattare pazienti affetti da una malattia associata all'espressione di IL-33 o alle cellule che esprimono IL-33. Con "cellula che esprime IL-33" si intendono le cellule che esprimono l'antigene IL-33. I metodi per rilevare l'espressione di IL-33 nelle cellule sono ben noti nell'arte e includono, ma in via non limitativa, tecniche PCR, immunoistochimica, citometria a flusso, Western blot, ELISA e simili.

Sebbene la seguente disamina si riferisca a metodi diagnostici e al trattamento di varie malattie e disturbi con un anticorpo anti-IL-33 della divulgazione, i metodi descritti nel presente documento sono applicabili anche ai frammenti, varianti e derivati di legame all'antigene di questi anticorpi anti-IL-33 che mantengono le proprietà desiderate degli anticorpi anti-IL-33 della divulgazione, ad esempio, la capacità di legare specificamente IL-33 e neutralizzare l'attività patogena di IL-33.

In una forma di realizzazione, il trattamento include l'applicazione o la somministrazione di un anticorpo anti-IL-33 o relativo frammento di legame all'antigene, dell'attuale divulgazione a un

soggetto o paziente, o l'applicazione o la somministrazione dell'anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento di legame all'antigene, a un tessuto isolato o una linea cellulare di un soggetto o paziente, in cui il soggetto o paziente ha una malattia, un sintomo di una malattia o una predisposizione verso una malattia. In un'altra forma di realizzazione, il trattamento intende anche includere l'applicazione o la somministrazione di una composizione farmaceutica comprendente l'anticorpo anti-IL o relativo frammento di legame all'antigene, dell'attuale divulgazione a un soggetto o paziente, o l'applicazione o la somministrazione di una composizione farmaceutica comprendente l'anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento di legame all'antigene, a un tessuto isolato o una linea cellulare di un soggetto o paziente, che ha una malattia, un sintomo di una malattia o una predisposizione verso una malattia.

Gli anticorpi anti-IL-33 o relativi frammenti di legame, della presente divulgazione, sono utili per il trattamento di varie condizioni infiammatorie. Per "attività antinfiammatoria" si intende una riduzione della velocità di risposta infiammatoria in una cellula che esprime IL-33, e quindi un calo dell'infiammazione in un tessuto che si manifesta durante la terapia. Per esempio, la terapia con almeno un anticorpo anti-IL-33 provoca una risposta fisiologica, per esempio, una riduzione della risposta infiammatoria che è benefica rispetto al trattamento degli stati di malattia associati alle cellule che esprimono IL-33 in un essere umano.

In una forma di realizzazione, la divulgazione si riferisce agli anticorpi anti-IL-33 o a relativi frammenti di legame, secondo la presente divulgazione per l'uso come un medicinale, in particolare per l'uso nel trattamento o nella profilassi di una risposta infiammatoria o per l'uso nel trattamento di una condizione infiammatoria, ad esempio, asma o BPCO. In determinate forme di realizzazione, un anticorpo anti-IL-33 o relativo frammento di legame, della divulgazione, viene usato per il trattamento di un disturbo allergico. In determinate forme di realizzazione, un anticorpo anti-IL-33 o relativo frammento di legame, della divulgazione, viene usato per il trattamento di una risposta infiammatoria nelle vie aeree di un soggetto o paziente.

Secondo i metodi della presente divulgazione, almeno un anticorpo anti-IL-33 o relativo frammento di legame all'antigene, come definito altrove nel presente documento, viene usato per favorire una risposta terapeutica positiva rispetto a una risposta infiammatoria. Con "risposta terapeutica positiva" rispetto al trattamento dell'infiammazione si intende un miglioramento della malattia in associazione con l'attività antinfiammatoria di questi anticorpi o relativi frammenti, e/o un miglioramento dei sintomi associati alla malattia. Vale a dire, si può osservare un effetto antinfiammatorio, la prevenzione di ulteriori infiammazioni e/o una riduzione dell'infiammazione esistente e/o una diminuzione di uno o più sintomi associati alla malattia. Quindi, per esempio, un miglioramento della malattia può essere caratterizzato come una risposta completa. Per "risposta completa" si intende

un'assenza di malattia clinicamente rilevabile con normalizzazione di qualsiasi risultato di prova precedente. Una tale risposta deve persistere per almeno un mese a seguito di trattamento secondo le modalità della divulgazione. In alternativa, un miglioramento della malattia può essere categorizzato come una risposta parziale.

Gli anticorpi anti-IL-33 o relativi frammenti di legame all'antigene, descritti nel presente documento possono anche essere usati nel trattamento di malattie infiammatorie e carenze o disturbi del sistema immunitario che sono associati a cellule che esprimono IL-33. Le malattie infiammatorie sono caratterizzate da infiammazione e distruzione dei tessuti, o da una relativa combinazione. Per "attività antinfiammatoria" si intende una riduzione o prevenzione dell'infiammazione. "Malattia infiammatoria" include qualsiasi processo infiammatorio immuno-mediato in cui l'evento iniziale o bersaglio della risposta immunitaria implica uno o più antigeni non-self, inclusi, per esempio, alloantigeni, xenoantigeni, antigeni virali, antigeni batterici, antigeni non noti o allergeni. In una forma di realizzazione, la malattia infiammatoria è un disturbo infiammatorio delle vie aeree, ad esempio, asma o BPCO.

L'asma è considerata una comune malattia infiammatoria delle vie aeree caratterizzata, ad esempio, da sintomi variabili e ricorrenti, ostruzione reversibile del flusso aereo e broncospasmo. I sintomi dell'asma possono includere respiro sibilante, tosse, senso di costrizione toracica e mancanza di respiro. I sintomi possono essere

innescati dall'esposizione ad allergeni o irritanti. L'asma può essere classificata come atopica (estrinseca) o non atopica (intrinseca), a seconda che i sintomi siano precipitati da allergeni (atopici) o meno (non atopici). Una riacutizzazione di asma acuta viene comunemente definita "attacco d'asma". Ulteriori segni che possono verificarsi durante un attacco d'asma includono l'uso di muscoli accessori della respirazione (muscoli dello sternocleidomastoideo e scaleno del collo), può esserci un polso paradossale (un polso che è più debole durante l'inspirazione e più forte durante l'espirazione) e sovragonfiaggio del torace. Un colore blu della pelle e delle unghie può verificarsi a causa della mancanza di ossigeno.

Secondo i metodi della presente divulgazione, almeno un anticorpo anti-IL-33 o relativo frammento di legame all'antigene, come definito altrove nel presente documento, viene usato per favorire una risposta terapeutica positiva rispetto al trattamento o prevenzione di una risposta infiammatoria. Con "risposta terapeutica positiva" rispetto a una malattia infiammatoria si intende un miglioramento della malattia in associazione con l'attività antinfiammatoria, o simile, di questi anticorpi, e/o un miglioramento dei sintomi associati alla malattia. Cioè, possono essere osservati una riduzione della risposta infiammatoria includente ma non limitata a una ridotta secrezione di citochine infiammatorie, molecole di adesione, proteasi, immunoglobuline, relative combinazioni e simili, un aumento della produzione di proteine antinfiammatorie, una riduzione del numero di cellule autoreattive, un aumento della tolleranza

immunitaria, un'inibizione della sopravvivenza cellulare autoreattiva, una riduzione dell'apoptosi, una riduzione della migrazione delle cellule endoteliali, un aumento della migrazione spontanea dei monociti, una riduzione e/o diminuzione di uno o più sintomi mediati dalla stimolazione cellule di espressione di IL-33. Tali risposte terapeutiche positive non sono limitate al percorso di somministrazione.

La risposta clinica può essere valutata usando tecniche di screening come formazione di immagini per risonanza magnetica (MRI), formazione di immagini radiografiche X, scansione tomografica computerizzata (TC), citometria a flusso o analisi per classificatore di cellule attivate da fluorescenza (FACS), istologia, patologia macroscopica e chimica del sangue, inclusi ma in via non limitativa cambiamenti rilevabili mediante ELISA, RIA, cromatografia, e simili. Oltre a queste risposte terapeutiche positive, il soggetto sottoposto a terapia con l'anticorpo anti-IL-33 o relativo frammento di legame all'antigene, può sperimentare l'effetto benefico di un miglioramento dei sintomi associati alla malattia.

Gli anticorpi anti-IL-33 o relativi frammenti di legame della divulgazione possono essere usati in combinazione con qualsiasi terapia nota per malattie infiammatorie, inclusi qualsiasi agente o combinazione di agenti che sono noti per essere utili, o che sono stati usati o sono attualmente in uso, per il trattamento di malattie infiammatorie, *ad esempio*, asma o BPCO. Gli agenti usati per trattare l'asma si dividono in due classi generali: medicinali di rapido sollievo

usati per trattare sintomi acuti; e medicinali di controllo a lungo termine usati per prevenire ulteriori riacutizzazioni. I trattamenti ad azione rapida includono, *ad esempio*, agonisti beta-2 adrenocettori a breve durata d'azione (SABA) (*ad esempio*, salbutamolo); farmaci anticolinergici (*ad esempio*, ipratropio bromuro), agonisti adrenergici (*ad esempio*, epinefrina). I trattamenti di controllo a lungo termine includono, *ad esempio*, glucocorticoidi (*ad esempio*, fluticasone propionato); agonisti beta-2 adrenergici a lunga durata d'azione (LABA); antagonisti dei leucotrieni (*ad esempio*, zafirlukast); e stabilizzatori dei mastociti (*ad esempio*, cromolyn sodico). I trattamenti ad azione rapida e di controllo a lungo termine sono spesso somministrati per inalazione.

Quindi, se le terapie combinate comprendono la somministrazione di un anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento di legame all'antigene, in combinazione con la somministrazione di un altro agente terapeutico, i metodi della divulgazione inglobano la co-somministrazione, usando formulazioni separate o un'unica formulazione farmaceutica, e somministrazione consecutiva in entrambi gli ordini. In alcune forme di realizzazione della divulgazione, gli anticorpi anti-IL-33 descritti nel presente documento vengono somministrati in combinazione con farmaci antinfiammatori, in cui l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene e l'uno o più agenti terapeutici possono essere somministrati in sequenza, in qualsiasi ordine, o simultaneamente (*vale a dire*, contemporaneamente o nello stesso lasso di tempo).

Un'ulteriore forma di realizzazione della divulgazione consiste nell'uso dell'anticorpo anti-IL-33 o relativi frammenti di legame all'antigene, per il monitoraggio diagnostico dei livelli di proteine in un tessuto come parte di una procedura di prova clinica, *ad esempio*, per determinare l'efficacia di un dato regime di trattamento. Per esempio, il rilevamento può essere facilitato accoppiando l'anticorpo a una sostanza rilevabile. Esempi di sostanze rilevabili includono vari enzimi, gruppi protesici, materiali fluorescenti, materiali luminescenti, materiali bioluminescenti e materiali radioattivi. Esempi di enzimi idonei includono perossidasi di rafano, fosfatasi alcalina, β -galattosidasi o acetilcolinesterasi; esempi di complessi di gruppi protesici idonei includono streptavidina/biotina e avidina/biotina; esempi di materiali fluorescenti idonei includono umbelliferone, fluoresceina, fluoresceina isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceina, dansil cloruro o ficoeritrina; un esempio di un materiale luminescente include luminol; esempi di materiali bioluminescenti includono luciferasi, luciferina e aequorina; ed esempi di materiale radioattivo idonei includono ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , o ^3H .

VIII. Composizioni farmaceutiche e metodi di somministrazione

I metodi per preparare e somministrare l'anticorpo anti-IL-33, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene, della divulgazione a un soggetto che ne ha necessità sono ben noti o sono prontamente determinati dai tecnici del ramo. Il percorso di

somministrazione dell'anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato di legame dell'antigene, può essere, per esempio, orale, parenterale, per inalazione o topico. Il termine parenterale come usato nel presente documento include, *ad esempio*, somministrazione endovenosa, intrarteriosa, intraperitoneale, intramuscolare, sottocutanea, rettale o vaginale. Sebbene tutte queste forme di somministrazione siano chiaramente contemplate entro la portata della divulgazione, un altro esempio di una forma di somministrazione sarebbe una soluzione per iniezione, in particolare per iniezione o gocciolamento endovenoso o intrarterioso. Normalmente, una composizione farmaceutica idonea della divulgazione può comprendere un tampone (ad esempio, tampone acetato, fosfato o citrato), un tensioattivo (ad esempio un polisorbato), facoltativamente un agente stabilizzante (ad esempio albumina umana), eccetera. Tuttavia, in altri metodi compatibili con gli insegnamenti nel presente documento, gli anticorpi anti-IL-33, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame dell'antigene della divulgazione possono essere erogati direttamente sul sito della popolazione cellulare avversa aumentando in tal modo l'esposizione del tessuto malato all'agente terapeutico. In una forma di realizzazione, la somministrazione avviene direttamente nelle vie aeree, ad esempio, mediante somministrazione per inalazione o intranasale.

Come esaminato nel presente documento, gli anticorpi anti-IL-33 o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene della divulgazione possono essere somministrati in una quantità

farmaceuticamente efficace per il trattamento *in vivo* delle malattie cellulo-mediate che esprimono IL-33 come determinati tipi di malattie infiammatorie. A questo proposito, si apprezzerà che l'anticorpo divulgato, o relativo frammento di legame all'antigene, della divulgazione sarà formulato in modo da facilitare la somministrazione e favorire la stabilità dell'agente attivo. Preferibilmente, le composizioni farmaceutiche secondo la presente divulgazione comprendono un trasportatore farmaceuticamente accettabile, non tossico, sterile, come una soluzione salina fisiologica, tamponi non tossici, conservanti e simili. Ai fini della presente domanda, una quantità farmaceuticamente efficace di un anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, coniugato o non coniugato, deve essere intesa come una quantità sufficiente a conseguire un legame efficace a un bersaglio e a conseguire un vantaggio, ad esempio, migliorare i sintomi di una malattia o condizione o rilevare una sostanza o una cellula.

Le composizioni farmaceutiche usate nella divulgazione possono comprendere trasportatori farmaceuticamente accettabili, inclusi, ad esempio, acqua, scambiatori di ioni, allumina, stearato di alluminio, lecitina, proteine di siero, come albumina sierica umana, sostanze tampone come fosfati, glicina, acido sorbico, sorbato di potassio, miscele di gliceridi parziali di acidi grassi vegetali saturi, acqua, sali o elettroliti, come protamina solfato, idrogenofosfato di disodio, idrogenofosfato di potassio, cloruro di sodio, sali di zinco, silice

colloidale, trisilicato di magnesio, polivinilpirrolidone, sostanze a base di cellulosa, glicole di polietilene, carbossimetilcellulosa sodica, poliacrilati, polimeri a blocchi di polietilene-polioossipropilene, glicole di polietilene e grasso di lana.

Le preparazioni per la somministrazione includono soluzioni, sospensioni ed emulsioni acquose o non acquose sterili. Esempi di solventi non acquosi sono glicole di propilene, glicole di polietilene, oli vegetali come olio d'oliva ed esteri organici iniettabili come oleato di etile. I trasportatori acquosi includono, ad esempio, acqua, soluzioni alcoliche/acquose, emulsioni o sospensioni, inclusi terreni salini e tamponati. Nella presente divulgazione, trasportatori farmaceuticamente accettabili includono, ma in via non limitativa, tampone fosfato 0,01-0,1 M e preferibilmente 0,05 M o soluzione salina allo 0,8%. Altri comuni veicoli parenterali includono soluzioni di fosfato di sodio, destrosio di Ringer, destrosio e cloruro di sodio, Ringer lattato, o oli fissi. I veicoli per via endovenosa includono reintegratori di liquidi e nutrienti, reintegratori di elettroliti, come quelli a base di destrosio di Ringer e simili. Possono anche essere presenti conservanti e altri additivi come, per esempio, antimicrobici, antiossidanti, agenti chelanti e gas inerti e simili.

Più in particolare, le composizioni farmaceutiche idonee per l'uso iniettabile includono soluzioni acquose sterili (dove idrosolubili) o dispersioni e polveri sterili per la preparazione estemporanea di soluzioni o dispersioni iniettabili sterili. In tali casi, la composizione deve

essere sterile e dovrebbe essere fluida nella misura in cui esiste una facile immissione in siringa. Dovrebbe essere stabile nelle condizioni di fabbricazione e conservazione e sarà preferibilmente preservata dall'azione contaminante di microrganismi, come batteri e funghi. Il trasportatore può essere un solvente o un terreno di dispersione contenente, per esempio, acqua, etanolo, poliolo (ad esempio, glicerolo, glicole di propilene e glicole di polietilene liquido e simili) e relative miscele idonee. La corretta fluidità può essere mantenuta, per esempio, mediante l'uso di un rivestimento come la lecitina, mediante il mantenimento della granulometria richiesta in caso di dispersione e mediante l'uso di tensioattivi. Formulazioni idonee per l'uso nei metodi terapeutici divulgati nel presente documento sono descritte in Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16^a edizione (1980).

La prevenzione dell'azione dei microrganismi può essere conseguita mediante vari agenti antibatterici e antifungini, per esempio, parabeni, clorobutanolo, fenolo, acido ascorbico, timerosal e simili. In molti casi, sarà preferibile includere agenti isotonici, per esempio, zuccheri, polialcoli, come mannitolo, sorbitolo o cloruro di sodio nella composizione. Si può perseguire un assorbimento prolungato delle composizioni iniettabili includendo nella composizione un agente che ritarda l'assorbimento, per esempio, monostearato di alluminio e gelatina.

In ogni caso, soluzioni iniettabili sterili possono essere preparate incorporando un composto attivo (ad esempio, un anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, da solo o in combinazione con altri agenti attivi) nella quantità richiesta in un solvente appropriato con uno o una combinazione di principi enumerati nel presente documento, come richiesto, a cui segue una sterilizzazione filtrata. Generalmente, le dispersioni vengono preparate incorporando il composto attivo in un veicolo sterile, che contiene un terreno di dispersione basico e gli altri principi richiesti da quelli elencati sopra. Nel caso di polveri sterili per la preparazione di soluzioni iniettabili sterili, i metodi di preparazione preferiti sono disidratazione sottovuoto e liofilizzazione, che producono una polvere di un principio attivo più qualsiasi principio aggiuntivo desiderato da una relativa soluzione precedentemente filtrata sterile. Le preparazioni per iniezioni vengono processate, versate in contenitori come fiale, sacchetti, flaconi, siringhe o provette e sigillate in condizioni asettiche secondo metodi noti nell'arte. Inoltre, le preparazioni possono essere confezionate e vendute sotto forma di kit. Tali articoli di fabbricazione avranno preferibilmente etichette o foglietti illustrativi che indicano che le composizioni associate sono utili per trattare un soggetto affetto da, o predisposto a, una malattia o disturbo.

Le formulazioni parenterali possono essere una singola dose in bolo, un'infusione o una dose in bolo di carico seguita da una dose di mantenimento. Queste composizioni possono essere somministrate a

intervalli fissi o variabili specifici, ad esempio, una volta al giorno, o su base "secondo necessità".

Determinate composizioni farmaceutiche usate in questa divulgazione possono essere somministrate per via orale in una forma di dosaggio accettabile che include, ad esempio, capsule, compresse, sospensioni o soluzioni acquose. Determinate composizioni farmaceutiche possono anche essere somministrate mediante aerosol nasale o inalazione. Tali composizioni possono essere preparate come soluzioni in soluzione salina, impiegando alcool benzilico o altri conservanti idonei, promotori di assorbimento per potenziare la biodisponibilità, e/o altri agenti solubilizzanti o disperdenti convenzionali.

La quantità di un anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato che può essere combinata con i materiali del trasportatore per produrre una singola forma di dosaggio varierà a seconda del soggetto trattato e della particolare modalità di somministrazione. La composizione può essere somministrata come una dose singola, dosi multiple o per un periodo di tempo stabilito in un'infusione. I regimi di dosaggio possono anche essere regolati per fornire la risposta ottimale desiderata (ad esempio, una risposta terapeutica o profilattica).

In linea con la portata della presente divulgazione, gli anticorpi anti-IL-33 o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene della divulgazione possono essere somministrati a un essere umano o altro animale secondo i metodi di trattamento summenzionati in una

quantità sufficiente per produrre un effetto terapeutico. Gli anticorpi anti-IL-33, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene della divulgazione possono essere somministrati a tale essere umano o altro animale in una forma di dosaggio convenzionale preparata combinando l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene della divulgazione con un trasportatore o diluente farmaceuticamente accettabile convenzionale secondo tecniche note. Sarà riconosciuto da un tecnico del ramo che la forma e il carattere del trasportatore o diluente farmaceuticamente accettabile sono dettati dalla quantità di principio attivo con cui deve essere combinato, dal percorso di somministrazione e da altre variabili ben note. I tecnici del ramo apprezzeranno inoltre che una miscela comprendente una o più specie di anticorpi anti-IL-33, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene, della divulgazione può dimostrarsi particolarmente efficace.

Per "dose o quantità terapeuticamente efficace" o "quantità efficace" si intende una quantità di anticorpo anti-IL-33 o relativo frammento di legame all'antigene, che quando somministrata determina una risposta terapeutica positiva rispetto al trattamento di un paziente con una malattia o condizione da trattare.

La presente divulgazione fornisce anche l'uso di un anticorpo anti-IL-33 o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, nella fabbricazione di un medicinale per il trattamento di una malattia infiammatoria, incluse, ad esempio, asma o BPCO.

La divulgazione fornisce anche l'uso di un anticorpo anti-IL-33 della divulgazione, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, nella fabbricazione di un medicinale per trattare un soggetto per il trattamento di una malattia infiammatoria, in cui il medicinale viene usato in un soggetto che è stato pretrattato con almeno un'altra terapia. Con "pretrattato" o "pretrattamento" si intende che il soggetto ha ricevuto una o più altre terapie (ad esempio, è stato trattato con almeno un'altra terapia antinfiammatoria) prima di ricevere il medicinale comprendente l'anticorpo anti-IL-33 o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene. "Pretrattato" o "pretrattamento" include soggetti che sono stati trattati con almeno un'altra terapia entro 2 anni, entro 18 mesi, entro 1 anno, entro 6 mesi, entro 2 mesi, entro 6 settimane, entro 1 mese, entro 4 settimane, entro 3 settimane, entro 2 settimane, entro 1 settimana, entro 6 giorni, entro 5 giorni, entro 4 giorni, entro 3 giorni, entro 2 giorni, o anche entro 1 giorno prima dell'inizio del trattamento con il medicinale comprendente l'anticorpo IL-33 o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene. Non è necessario che il soggetto abbia risposto al pretrattamento con la terapia o le terapie precedenti. Quindi, il soggetto che riceve il medicinale comprendente l'anticorpo anti-IL-33 o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene avrebbe potuto rispondere o potrebbe non aver risposto positivamente al pretrattamento con la terapia precedente, o a una o più delle terapie precedenti in cui il pretrattamento comprendeva molteplici terapie.

IX. Diagnostica

La divulgazione fornisce inoltre un metodo diagnostico utile durante la diagnosi di malattie cellulo-mediate che esprimono IL-33 come determinati tipi di malattie infiammatorie incluse, ad esempio, l'asma, che implica misurare il livello di espressione della proteina IL-33 o del trascritto nel tessuto o in altre cellule o fluidi corporei di un individuo e confrontare il livello di espressione misurato con un livello di espressione di IL-33 standard nel tessuto normale o fluido corporeo, per cui un aumento del livello di espressione rispetto allo standard è indicativo di un disturbo.

Gli anticorpi anti-IL-33 della divulgazione e relativi frammenti, varianti e derivati di legame all'antigene possono essere usati per saggiare i livelli di proteina IL-33 in un campione biologico usando metodi immunoistologici classici noti ai tecnici del ramo (ad esempio, Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanen et al., J. Cell Biol. 105: 3087-3096 (1987)). Altri metodi basati su anticorpi utili per rilevare l'espressione della proteina IL-33 includono saggi immunologici, come il saggio di immunoassorbimento collegato a enzima (ELISA), immunoprecipitazione, o Western blotting. Saggi idonei sono descritti in maggior dettaglio altrove nel presente documento.

Con "saggiare il livello di espressione del polipeptide di IL-33" si intende misurare o stimare qualitativamente o quantitativamente il livello del polipeptide di IL-33 in un primo campione biologico direttamente (ad

esempio, determinando o stimando il livello di proteina assoluta) o relativamente (ad esempio, confrontando il livello di polipeptide associato alla malattia in un secondo campione biologico). Preferibilmente, il livello di espressione del polipeptide di IL-33 nel primo campione biologico viene misurato o stimato e confrontato con un livello di polipeptide di IL-33 standard, lo standard essendo assunto da un secondo campione biologico ottenuto da un individuo non affetto dal disturbo o essendo determinato dalla media di livelli di una popolazione di individui non affetti dal disturbo. Come si apprezzerà nell'arte, una volta che il livello di polipeptide di IL-33 "standard" è noto, può essere usato ripetutamente come uno standard per il confronto.

Con "campione biologico" si intende qualsiasi campione biologico ottenuto da un individuo, una linea cellulare, una coltura tissutale o un'altra sorgente di cellule che potenzialmente esprimono IL-33. Metodi per ottenere biopsie tissutali e fluidi corporei da mammiferi sono ben noti nell'arte.

X. Saggi immunologici

Gli anticorpi anti-IL-33, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigene della divulgazione possono essere saggiati per il legame immunospecifico mediante qualsiasi metodo noto nell'arte. I saggi di legame possono essere eseguiti come saggi di legame diretti o come saggi di legame di competizione. I saggi immunologici che possono essere usati includono ma in via non limitativa ELISA (saggio di immunoassorbimento collegato agli enzimi), western blotting,

immunocitochimica, immunoprecipitazione, cromatografia per affinità, Interferometria a strati biologici, (Octet, ForteBio) e saggi biochimici come i saggi immunologici fluorescenti con lantanidi a dissociazione potenziata (DELFI[®], Perkin Elmer), trasferimento di energia per risonanza di Forster (FRET) (ad esempio, fluorescenza omogenea a risoluzione temporale HTRF[®], Cis Biointernational), e saggi di legame del radioligando per citarne solo alcuni. Il legame può essere rilevato anche in saggi cellulari, per esempio mediante citometria a flusso e Tecnologia di analisi microvolumetrica fluorescente (FMAT[®], Applied Biosystems). In un saggio di legame diretto, un anticorpo candidato viene provato per il legame all'antigene IL-33. I saggi di legame di competizione, d'altra parte, valutano la capacità di un anticorpo candidato di competere con un anticorpo anti-IL-33 noto o un frammento o un altro composto, come ST2, che si lega a IL-33. Tali saggi sono di routine e ben noti nell'arte (si veda, ad esempio, a cura di Ausubel et al., (1994) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., NY) Volume 1). Saggi immunologici esemplificativi sono descritti brevemente di seguito (ma non sono intesi a titolo limitativo).

I protocolli di immunoprecipitazione generalmente comprendono lisare una popolazione di cellule in un tampone di lisi come il tampone RIPA (NP-40 o Triton X-100 all'1%, sodio desossicolato all'1%, SDS allo 0,1%, 0,15 M di NaCl, 0,01 M di fosfato di sodio a pH 7,2, Trasylol all'1%) integrato con proteina fosfatasi e/o

inibitori della proteasi (ad esempio, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato di sodio), aggiungere l'anticorpo di interesse al lisato cellulare, incubare per un periodo di tempo (ad esempio, 1-4 ore) a 4 °C, aggiungere biglie di sefarosio di proteina A e/o proteina G al lisato cellulare, incubare per circa un'ora o più a 4 °C, lavare le biglie in tampone di lisi e risospendere le biglie in tampone SDS/campione. La capacità dell'anticorpo di interesse di immunoprecipitare un particolare antigene può essere valutata, ad esempio, mediante analisi Western blot. Un tecnico del ramo è a conoscenza dei parametri che possono essere modificati per aumentare il legame dell'anticorpo a un antigene e diminuire lo sfondo (ad esempio, pre-cancellazione del lisato cellulare con biglie di sefarosio). Per un'ulteriore disamina sui protocolli di immunoprecipitazione si veda, ad esempio, a cura di Ausubel et al., (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Volume 1 in 10.16.1.

L'analisi Western blot comprende generalmente preparare campioni di proteine, l'elettroforesi dei campioni di proteine in un gel di poliacrilammide (ad esempio, SDS-PAGE all'8%-20% a seconda del peso molecolare dell'antigene), trasferire il campione di proteine dal gel di poliacrilammide a una membrana come nitrocellulosa, PVDF o nylon, bloccare la membrana in una soluzione bloccante (ad esempio, PBS con BSA al 3% o latte non grasso), lavare la membrana in un tampone di lavaggio (ad esempio, PBS-Tween 20), bloccare la membrana con l'anticorpo primario (l'anticorpo di interesse) diluito in tampone

bloccante, lavare la membrana in tampone di lavaggio, bloccare la membrana con un anticorpo secondario (che riconosce l'anticorpo primario, ad esempio, un anticorpo anti-umano) coniugato a un substrato enzimatico (ad esempio, perossidasi di rafano o fosfatasi alcalina) o molecola radioattiva (ad esempio, ^{32}P o ^{125}I) diluita in tampone bloccante, lavare la membrana in tampone di lavaggio e rilevare la presenza dell'antigene. Un tecnico del ramo è a conoscenza dei parametri che possono essere modificati per aumentare il segnale rilevato e per ridurre il rumore di fondo. Per un'ulteriore disamina sui protocolli Western blot si veda, *ad esempio*, a cura di Ausubel et al., (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Volume 1 al 10.8.1.

Gli ELISA comprendono preparare l'antigene, rivestire il pozzetto di una piastra per microtitolazione a 96 pozzetti con l'antigene, aggiungere l'anticorpo di interesse coniugato a un composto rilevabile come un substrato enzimatico (ad esempio, perossidasi di rafano o fosfatasi alcalina) al pozzetto e incubare per un periodo di tempo e rilevare la presenza dell'antigene. Negli ELISA l'anticorpo di interesse non deve essere coniugato a un composto rilevabile; invece, un secondo anticorpo (che riconosce l'anticorpo di interesse) coniugato a un composto rilevabile può essere aggiunto al pozzetto. Inoltre, invece di rivestire il pozzetto con l'antigene, l'anticorpo può essere rivestito sul pozzetto. In questo caso, un secondo anticorpo coniugato a un composto rilevabile può essere aggiunto a seguito dell'addizione

dell'antigene di interesse al pozzetto rivestito. Un tecnico del ramo è a conoscenza dei parametri che possono essere modificati per aumentare il segnale rilevato nonché altre variazioni di ELISA note nell'arte. Per un'ulteriore disamina riguardo gli ELISA si veda, ad esempio, a cura di Ausubel et al., (1994) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., NY) Volume 1 al 13.2.1.

Gli anticorpi anti-IL-33, o relativi frammenti, varianti o derivati di legame all'antigenedella divulgazione, in aggiunta, possono essere impiegati istologicamente, come in immunofluorescenza, microscopia immunoelettronica o saggi non immunologici, per il rilevamento in situ della proteina IL-33 o varianti conservate o relativi frammenti peptidici. Il rilevamento in situ può essere compiuto rimuovendo un esemplare istologico da un paziente e applicando a esso un anticorpo etichettato anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, preferibilmente applicato sovrapponendo l'anticorpo etichettato (o frammento) su un campione biologico. Attraverso l'uso di una tale procedura, è possibile determinare non solo la presenza della proteina IL-33, o varianti conservate o frammenti peptidici, ma anche la sua distribuzione nel tessuto esaminato. Usando la presente divulgazione, coloro di ordinaria competenza percepiranno prontamente che uno qualsiasi di un'ampia varietà di metodi istologici (come le procedure di colorazione) può essere modificato al fine di conseguire tale rilevamento in situ.

I saggi immunologici e non immunologici per i prodotti del gene IL-33 o varianti conservate o relativi frammenti peptidici comprenderanno tipicamente incubare un campione, come un fluido biologico, un estratto di tessuto, cellule appena raccolte, o lisati di cellule che sono stati incubati in una coltura cellulare, in presenza di un anticorpo etichettato in modo rilevabile in grado di legarsi a IL-33 o varianti conservate o relativi frammenti peptidici, e rilevare l'anticorpo legato mediante una qualsiasi di numerose tecniche ben note nell'arte.

Il campione biologico può essere portato a contatto con e immobilizzato su un supporto o trasportatore in fase solida come nitrocellulosa o altro supporto solido che sia in grado di immobilizzare cellule, particelle cellulari o proteine solubili. Il supporto può quindi essere lavato con tamponi idonei, seguito da trattamento con l'anticorpo anti-IL-33 etichettato in modo rilevabile, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene. Il supporto in fase solida può quindi essere lavato con il tampone una seconda volta per rimuovere l'anticorpo non legato. Facoltativamente, l'anticorpo viene successivamente etichettato. La quantità di etichetta legata su un supporto solido può quindi essere rilevata mediante mezzi convenzionali.

Con "supporto o trasportatore in fase solida" si intende qualsiasi supporto in grado di legare un antigene o un anticorpo. Supporti o trasportatori ben noti includono vetro, polistirolo, polipropilene, polietilene, destrano, nylon, amilasi, cellulose naturali e modificate,

poliacrilammidi, gabbros e magnetite. La natura del trasportatore può essere solubile in una certa misura o insolubile ai fini della presente divulgazione. Il materiale di supporto può avere praticamente qualsiasi configurazione strutturale possibile fintanto che la molecola accoppiata sia in grado di legarsi a un antigene o anticorpo. Quindi, la configurazione del supporto può essere sferica, come in una biglia, o cilindrica, come nella superficie interna di una provetta, o la superficie esterna di una bacchetta. In alternativa, la superficie può essere piatta come un foglio, una striscia reattiva, eccetera. I supporti preferiti includono biglie di polistirene. I tecnici del ramo conosceranno molti altri trasportatori idonei per legare l'anticorpo o l'antigene, o saranno in grado di accertare lo stesso usando una sperimentazione di routine.

I saggi di legame in fase di soluzione possono anche essere eseguiti usando metodi idonei noti nell'arte, a titolo esemplificativo non limitativo saggi di trasferimento di energia per risonanza di Forster (FRET) (ad esempio fluorescenza a risoluzione temporale omogenea (HTRF @, Cis Biointernational). Un saggio HTRF® è una tecnologia di saggio omogenea che utilizza il trasferimento di energia per risonanza della fluorescenza tra un fluoroforo donatore e accettore che si trovano in stretta prossimità (Mathis, G., Clin Chem 41 (9):1391-7 (1995)). Il saggio può essere usato per misurare le interazioni macromolecolari accoppiando direttamente o indirettamente una delle molecole di interesse a un fluoroforo donatore, ad esempio, criptato di europio (Eu^{3+}), e accoppiando l'altra molecola di interesse a un fluoroforo

accettore, ad esempio, XL665 (un'allofococianina reticolata stabile). L'eccitazione della molecola donatrice determina emissione di fluorescenza. L'energia di questa emissione può essere trasferita al fluoroforo accettore, quando in stretta prossimità al fluoroforo donatore, determinando l'emissione di una fluorescenza specifica di lunga durata.

L'attività di legame di un dato lotto di anticorpo anti-IL-33, o relativo frammento, variante o derivato di legame all'antigene, può essere determinata secondo metodi ben noti. I tecnici del ramo saranno in grado di determinare le condizioni operative e ottimali del saggio per ciascuna determinazione impiegando la sperimentazione di routine.

Sono disponibili diversi metodi per misurare l'affinità di un'interazione anticorpo-antigene, ma relativamente pochi per determinare le costanti di velocità. La maggior parte dei metodi si avvale dell'etichettatura dell'anticorpo o dell'antigene, che inevitabilmente complica le misurazioni di routine e introduce incertezze nelle quantità misurate.

L'affinità di legame di un anticorpo a un antigene e la costante di dissociazione di un'interazione anticorpo-antigene possono essere determinate mediante saggi di legame di competizione. Un esempio di un saggio di legame di competizione è un saggio radioimmunologico comprendente l'incubazione dell'antigene etichettato (*ad esempio*, ^3H o ^{125}I) con l'anticorpo di interesse in presenza di quantità crescenti di antigene non etichettato, e il rilevamento dell'anticorpo legato all'antigene etichettato. L'affinità dell'anticorpo di interesse per un

particolare antigene e le costanti di dissociazione di legame possono essere determinate dai dati mediante analisi dell'equazione di Scatchard. La competizione con un secondo anticorpo può anche essere determinata usando saggi radioimmunologici. In questo caso, l'antigene che è incubato con l'anticorpo di interesse è coniugato a un composto etichettato (*ad esempio*, ^3H o ^{125}I) in presenza di quantità crescenti di un secondo anticorpo non etichettato.

La risonanza plasmonica di superficie (SPR) come eseguita su BIACORE® offre una serie di vantaggi rispetto ai metodi convenzionali di misurazione dell'affinità delle interazioni anticorpo-antigene: (i) nessun obbligo di etichettare né l'anticorpo né l'antigene; (ii) gli anticorpi non devono essere purificati in anticipo, il surnatante di coltura cellulare può essere usato direttamente; (iii) le misurazioni in tempo reale, che consentono un rapido confronto semi-quantitativo di interazioni di diversi anticorpi monoclonali, sono abilitate e sono sufficienti per molti scopi di valutazione; (iv) la superficie biospecifica può essere rigenerata in modo che una serie di diversi anticorpi monoclonali possa essere facilmente confrontata in condizioni identiche; (v) le procedure analitiche sono completamente automatizzate, e possono essere eseguite ampie serie di misurazioni senza l'intervento dell'utente. BIAApplications Handbook, versione AB (ristampata nel 1998), codice BIACORE® n. BR-1001-86; BIATEchnology Handbook, versione AB (ristampato nel 1998), codice BIACORE® n. BR-1001-84. Gli studi di legame basati su SPR richiedono che un membro di una coppia di

legame sia immobilizzato su una superficie del sensore. Al partner di legame immobilizzato viene fatto riferimento come il ligando. Al partner di legame in soluzione viene fatto riferimento come l'analita. In alcuni casi, il ligando è attaccato indirettamente alla superficie attraverso il legame a un'altra molecola immobilizzata, a cui viene fatto riferimento come la molecola di cattura. La risposta SPR riflette un cambiamento nella concentrazione di massa sulla superficie del rilevatore quando gli analiti si legano o si dissociano.

Sulla base di SPR, le misurazioni BIACORE® in tempo reale monitorano le interazioni direttamente mentre si verificano. La tecnica è ben adatta alla determinazione dei parametri cinetici. La classificazione comparativa per affinità è semplice da eseguire e sia le costanti cinetiche sia quelle di affinità possono essere derivate dai dati del sensorgramma.

Quando un analita viene iniettato in un impulso discreto attraverso una superficie del ligando, il sensorgramma risultante può essere suddiviso in tre fasi essenziali: (i) Associazione dell'analita con il ligando durante l'iniezione del campione; (ii) Equilibrio o stato stazionario durante l'iniezione del campione, dove la velocità di legame dell'analita è bilanciata dalla dissociazione dal complesso; (iii) Dissociazione dell'analita dalla superficie durante il flusso del tampone.

Le fasi di associazione e dissociazione forniscono informazioni sulla cinetica di interazione analita-ligando (k_a e k_d , le velocità di formazione e dissociazione del complesso, $k_d/k_a = K_D$). La fase di

equilibrio fornisce informazioni sull'affinità dell'interazione analita-ligando (K_D).

Il software BIAevaluation fornisce funzionalità complete per l'adattamento della curva usando sia integrazione numerica sia algoritmi di adattamento globale. Con un'analisi idonea dei dati, è possibile ottenere costanti di velocità e affinità separate per l'interazione da semplici indagini BIACORE®. La gamma di affinità misurabili con questa tecnica è molto ampia e varia da mM a pM.

Un altro esempio di un tale metodo include misurare la costante di dissociazione " K_D " di equilibrio usando un Saggio di esclusione cinetica, che può essere effettuato, per esempio, usando uno strumento KinExa (Sapidyne Instruments). In breve, la costante di dissociazione K_D di equilibrio della fase di soluzione degli anticorpi anti-IL33 può essere determinata premiscelando concentrazioni variabili dell'anticorpo con IL-33 fino a raggiungere l'equilibrio. La quantità di anticorpo libero viene quindi misurata usando KinExa catturando l'anticorpo libero usando biglie rivestite di IL-33, lavando via il materiale non legato e rilevando l'anticorpo legato usando un anticorpo specifico della specie etichettato in modo fluorescente. La quantità di anticorpo libero rilevata a ciascuna concentrazione di IL-33 viene tracciata in rapporto alla concentrazione di IL-33 e il software KinExa viene usato per calcolare la costante di dissociazione (K_D) di equilibrio.

Metodi e reagenti idonei per la determinazione delle caratteristiche di legame di un anticorpo isolato o relativo frammento di

legame all'antigene presentato, o di un relativo derivato alterato/mutante (esaminato di seguito), sono noti nell'arte e/o sono disponibili in commercio. Sono disponibili in commercio apparecchiature e software progettati per tali analisi cinetiche (*ad esempio*, BIAcore, software di valutazione BIA, GE Healthcare; KinExa Software, Sapidyne Instruments).

La specificità per l'epitopo è una caratteristica importante di un anticorpo monoclonale. La mappatura degli epitopi con BIACORE®, a differenza delle tecniche convenzionali che usano il saggio radioimmunologico, ELISA o altri metodi di adsorbimento superficiale, non richiede etichettatura o anticorpi purificati, e consente prove di specificità multi-sito usando una sequenza di diversi anticorpi monoclonali. In aggiunta, è possibile processare automaticamente un cospicuo numero di analisi.

Gli esperimenti di legame a coppie provano la capacità di due MAb di legarsi contemporaneamente allo stesso antigene. I MAb diretti contro epitopi separati si legheranno in modo indipendente, mentre i MAb diretti contro epitopi identici o strettamente correlati interferiranno con il legame dell'altro. Questi esperimenti di legame con BIACORE® sono semplici da effettuare.

Per esempio, si può usare una molecola di cattura per legare il primo Mab, seguita da addizione di antigene e secondo MAb in sequenza. I sensorgrammi riveleranno: (1) quanto dell'antigene si lega al primo Mab, 2. in che misura il secondo MAb si lega all'antigene

attaccato alla superficie, 3. se il secondo MAb non si lega, se invertire l'ordine della prova a coppie altera i risultati.

L'inibizione peptidica è un'altra tecnica usata per la mappatura degli epitopi. Questo metodo può integrare studi di legame di anticorpi a coppie e può mettere in relazione epitopi funzionali a caratteristiche strutturali quando è nota la sequenza primaria dell'antigene. I peptidi o i frammenti antigenici vengono provati per l'inibizione di legame di diversi MAb all'antigene immobilizzato. Si ipotizza che i peptidi che interferiscono con il legame di un dato MAb siano strutturalmente correlati all'epitopo definito da tale MAb.

La pratica della presente divulgazione impiegherà, salvo diversamente indicato, tecniche convenzionali di biologia cellulare, coltura cellulare, biologia molecolare, biologia transgenica, microbiologia, DNA ricombinante, e immunologia, che rientrano entro le competenze dell'arte. Tali tecniche sono spiegate completamente nella letteratura.

I seguenti esempi sono offerti a titolo illustrativo e non limitativo.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1 Mostra un saggio HTRF per il legame IL33-ST2 umani in presenza di preparazioni periplasmatiche scFv non purificate. Viene evidenziato un pozzetto contenente l'anticorpo IL330004.

Figura 2 Mostra la neutralizzazione di IL33 umana e di cynomolgus mediante preparazioni di scFv purificate in un saggio HTRF IL33-ST2.

Figura 3 Mostra la neutralizzazione di IL33 umana e di cynomolgus mediante preparazioni di IgG purificate in un saggio IL33-ST2 HTRF.

Figura 4 Mostra la neutralizzazione di IL33 umana mediante preparazioni di IgG purificate nei saggi di segnalazione NFkB.

Figura 5 Mostra il rilevamento di IL-33 endogena in cellule muscolari lisce bronchiali mediante colorazione di immunofluorescenza con l'anticorpo di IL-33 IL330004 (riquadro di destra) rispetto al controllo negativo CAT-002 (riquadro di sinistra).

Figura 6 Mostra i dati di legame di una singola piastra sottoposta a screening rispetto a IL-33 umana, IL-33 di cynomolgus e insulina. Un legante di IL-33 umana/cynomolgus reattivo in modo crociato specifico è mostrato nel pozzetto C4, e i pozzetti A12 e B12 contengono il clone di legame a IL-33 di controllo.

Figura 7A Mostra l'attività neutralizzante degli anticorpi in un saggio di proliferazione TF-1.

Figura 7B Mostra l'attività neutralizzante degli anticorpi in un saggio di produzione di IL-6 di HUVEC.

Figura 8 Mostra l'attività neutralizzante degli anticorpi in un saggio di produzione di citochine mastocitarie.

Figura 9 Mostra il legame degli anticorpi IL-33 (IL330065, IL330101, IL330107 e IL330149) a IL-33 umana a lunghezza intera mediante Western blot.

Figure 10 Mostrano l'attività neutralizzante degli anticorpi anti-IL-33 IL330065 e IL330101 sulla produzione mastocitaria di IL-6 e IL-13 stimolata dai lisati cellulari di IL-33 a lunghezza intera.

Figura 11A Mostra un saggio di competizione di recettore-ligando HTRF® in presenza degli anticorpi IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180.

Figure 11B Mostrano il saggio di traslocazione Huvec NFkB (p65/RelA) in presenza degli anticorpi IL330065, IL330099, IL330101, IL330107 e IL330149.

Figure 12A Mostra il legame competitivo di preparazioni scFv purificate con mAb IL330101 per il legame a IL-33 umana biotinilata.

Figure 12B Mostra il legame competitivo di preparazioni scFv purificate con mAb IL330180 per il legame a IL-33 umana biotinilata.

Figure 13 Mostra il legame competitivo di scFv di IL330259 con mAb IL330101 per il legame a IL-33 umana biotinilata.

Figure 14A Mostra il legame competitivo di IgG di IL330259 con mAb IL330101 per il legame a IL-33 umana biotinilata.

Figure 14B Mostra il legame competitivo degli anticorpi con mAb H338L293 per il legame a IL-33 umana biotinilata.

Figure 15 Mostra l'attività neutralizzante degli anticorpi in saggi di produzione di IL-6 di HUVEC o di mastociti.

Figure 16 Mostra un'analisi di Schild di IL330388 e H338L293 in un saggio di produzione di IL-6 di mastociti.

Figura 17 Mostra l'attività di IL-33 umana, di IL-33 biotinilata con cisteina o di IL-33 pretrattata su terreni di coltura cellulare, misurata in saggi di segnalazione HUVEC (30 minuti) e nel saggio di produzione di IL-6 (18-24 ore).

Figura 18 Mostra SDS-PAGE di IL-33 umana, umana biotinilata o di topo in condizioni riducenti o non riducenti, prima o dopo il trattamento con Terreno Iscove modificato di Dulbecco (IMDM).

Figura 19 Mostra la purificazione di IL-33 umana trattata con terreni di coltura cellulare mediante SEC.

Figura 20 Mostra la massa intatta di PBS rispetto a IL-33 trattata con terreni determinati mediante LC-MS. IL-33 trattata con IMDM ha mostrato una perdita di 4 Da rispetto a quella trattata con PBS compatibile con la formazione di due legami disolfuro.

Figura 21 Mostra la mappatura disolfuro di IL-33 umana trattata con terreni. I dati erano coerenti con la formazione di due ponti disolfuro.

Figura 22A Mostra l'analisi SDS-PAGE di redIL-33 ad alta concentrazione e IL-33 DSB per l'analisi NMR

Figura 22B Mostra l'analisi della coerenza quantistica multipla eteronucleare NMR (HMQC) con sovrapposizione degli spettri HMQC ^1H - ^{15}N per IL-33 umana etichettata ^{15}N per redIL-33 e IL-33 DSB.

Figura 22C Spettro di dicroismo circolare (CD) vicino a UV

Figura 22D Mostra le caratteristiche chiave di IL-33 (Trp193, cisteine e sito di legame ST2) indicate all'interno della struttura di IL-33 risolta.

Figura 22E Mostra lo Spettro del dicroismo circolare (CD) lontano da UV

Figura 23 Mostra l'analisi dello scambio idrogeno-deuterio di redIL-33 e IL-33 DSB. Le differenze nell'incorporazione del deuterio sono mappate sulla struttura IL-33 pubblicata.

Figura 24 Mostra il legame di redIL-33 o IL-33 DSB a ST2.

Figura 25 Mostra l'analisi di tre saggi ELISA IL-33 commerciali per il rilevamento delle forme redIL-33 e IL-33 DSB.

Figura 26 Mostra i saggi ELISA che sono specifici per il rilevamento di redIL-33.

Figura 27 Mostra un decorso di IL-33 umana incubata in terreni di coltura cellulare (IMDM) o siero umano. Le forme redIL-33 o IL-33 DSB vengono misurate mediante ELISA o Western blot.

Figura 28 Mostra le analisi di BALF da topi IL-33 umanizzati raccolte in vari punti temporali in seguito alla stimolazione intranasale con *Alternaria*, usando una combinazione molteplice saggi ELISA. Saggi **(A)** Millipore, **(B)** R&D systems e **(C)** IL330425/sST2-biotinilati sono stati usati per misurare IL-33 in presenza o assenza di sST2 (grafici a sinistra). I segnali in presenza di sST2 (segnale dalla frazione ridotta di IL-33 eliminata) sono stati confrontati con uno standard IL-33 legata con disolfuro per quantificare i livelli di IL-33 legata con disolfuro. Il segnale di IL-33 ridotta è stato calcolato come la differenza di segnale tra le misurazioni di IL-33 in presenza e in assenza di ST2, quantificato

rispetto a uno standard di IL-33 ridotta. Le stime per IL-33 ridotta sono mostrate nei grafici a destra.

Figura 29 Mostra le analisi di BALF da topi BALB/c di tipo selvatico raccolte in vari punti temporali in seguito alla stimolazione intranasale con *Alternaria*. ELISA di IL-33 di topo (R&D systems) è stato usato per misurare IL-33 in presenza o assenza di sST2 (IL-33 di topo trattata con terreni usati come curva standard). I segnali in presenza di sST2 (segnale dalla frazione di IL-33 ridotta eliminata) sono stati confrontati con uno standard IL-33 di topo trattata con terreni per quantificare i livelli di IL-33 ossidata. Il segnale di IL-33 ridotta è stato calcolato come la differenza di segnale tra le misurazioni di IL-33 in presenza e in assenza di ST2, quantificato rispetto a uno standard di IL-33 di topo ridotta.

Figura 30A Mostra le unità di fluorescenza relative a 100 minuti in seguito a incubazione di 5 uM di anticorpo con 20 uM di IL33 a 25 °C in presenza di colorante arancione 8xSYPRO. In presenza di IL-33 H338L293, ma non IL330004 o del mAb di controllo, l'aumento del segnale fluorescente è indicativo del dispiegamento delle proteine.

Figura 30B Mostra le unità di fluorescenza relative nel tempo in seguito a incubazione di concentrazioni variabili di H338L293 con 20 uM di IL33 a 25 °C in presenza di colorante arancione 8xSYPRO. Il segnale fluorescente aumenta all'aumentare della concentrazione di anticorpo

Figura 30C Mostra l'analisi SDS-PAGE di IL-33. La preincubazione di IL-33 con H338L293, ma senza mAb di controllo o senza mAb, ha aumentato la presenza della forma di IL-33 con legante disolfuro a migrazione più rapida in condizioni non riducenti.

Figura 31 Mostra un decorso di neutralizzazione della segnalazione NFkB stimolata da IL-33 nelle HUVEC con mAb H338L293.

Figura 32 Mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotto dal legame di IL-33 umana a ST2 umano con concentrazioni crescenti di H338L293 in condizioni direttamente competitive o in seguito a preincubazione con IL-33.

Figura 33 Mostra la mappatura dell'epitopo di H338L293. Il riquadro superiore mostra l'analisi SEC di complessi IL33:IgG con H338L293 prima e dopo la digestione con tripsina. Il riquadro inferiore mostra il peptide troncato che è stato determinato per legarsi fortemente a H338L293 di colore nero all'interno della struttura di IL-33 descritta da Lingel et al 2009.

Figura 34 Mostra l'attività di segnalazione NFkB di IL-33 (IL33-01) di tipo selvatico e cisteina IL-33 in mutanti di serina prima e dopo il trattamento per 18 ore con terreni di coltura cellulare IMDM.

Figura 35 Mostra che IL33-11 ha una potenza maggiore di IL33-01 (WT) in vitro e in vivo.

Figura 36 Mostra la sovrapposizione degli spettri HMQC ^1H - ^{15}N per 0,1 mM di IL33-01 e IL33-11 etichettati con ^{15}N tracciati

rispettivamente in nero e rosso. Sono indicate le assegnazioni per i residui pertinenti. I dati mostrano spostamenti di picco intorno a C208 e C259 come previsto. Tuttavia, ci sono più spostamenti di picco del previsto da T185 a A196 che potrebbero indicare un cambiamento di conformazione.

Figura 37 Mostra un decorso di attività neutralizzante di IL-33 di scFv di 33v20064 in un saggio di legame HTRF di IL33-ST2.

Figura 38 Mostra un decorso di attività neutralizzante di IL-33 di IgG di 33v20064 in un saggio di legame HTRF di IL33-ST2.

Figura 39 Mostra la neutralizzazione dell'anticorpo della produzione di IL-6 in HUVEC stimulate da IL-33 di tipo selvatico o mutante.

Figura 40 Mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotto dal legame di IL-33-01 umana biotinilata a 33v20064 etichettato DyLight, con concentrazioni crescenti di proteinedi prova. L'inibizione del segnale corrisponde all'affinità di legame relativa di 33v20064 alla proteina di prova.

Figura 41 Mostra un decorso di attività neutralizzante di IL-33 in un saggio di legame HTRF di IL33-ST2 della variante germinale 33_640001 rispetto a scFv di 33v20064 genitore.

Figura 42 Mostra la neutralizzazione dell'anticorpo della produzione di IL-8 in HUVEC stimulate da IL-33 troncata (112-270) o a lunghezza intera (1-270).

Figura 43 Mostra l'effetto delle proteine leganti IL-33 sulla conversione da redIL-33 a IL-33 DSB.

Figura 44 Mostra l'inibizione del segnale FRET in diversi punti temporali, prodotta dal legame di IL-33 umana biotinilata o di cynomolgus a mAb 33_640117, con concentrazioni crescenti delle proteine di prova. L'inibizione del segnale corrisponde all'affinità di legame relativa di 33v20064 alla proteina di prova.

Figura 45 Mostra la neutralizzazione dell'anticorpo della produzione di IL-8 in HUVEC stimulate da IL-33 troncata (112-270) o a lunghezza intera (1-270).

Figura 46 Mostra che H338L293 inibisce in modo dose-dipendente IL-5 di BAL indotta da *Alternaria* (ALT) e l'eosinofilia nei topi BALB/c di tipo selvatico. Le sostanze di prova sono state dosate per via nasale (10, 30 o 100 mg/kg come indicato tra parentesi) a -2 ore prima della stimolazione con 25 ug di ALT. BALF è stato raccolto 24 ore dopo stimolazione con ALT e analizzato per la presenza di IL-5 (**Figura 46A**) ed eosinofili (**Figura 46B**). L'effetto significativo delle sostanze di prova è stato determinato usando ANOVA unidirezionale con la prova di confronto multiplo di Bonferroni. *** $p < 0,001$, □□ $p < 0,01$ rispetto a mAb di controllo (n = 4-8). Una trappola di IL-33 di topo è stata usata come controllo positivo.

Figura 47 Mostra che H338L293 (30 mg/kg) e la trappola di IL-33 di topo (10 mg/kg), ma non IL330004 (30 mg/kg), inibiscono IL-5 di BAL indotta da ALT in topi IL-33 umanizzati. Le sostanze di prova sono

state dosate per via intranasale a -2 ore prima della stimolazione con 25 ug di ALT. BALF è stato raccolto 24 ore dopo la stimolazione con ALT e analizzato per la presenza di IL-5. L'effetto significativo delle sostanze di prova è stato determinato usando ANOVA unidirezionale con la prova di confronto multiplo di Bonferroni. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ (n=4).

Figura 48 Mostra che la dose di 33_640050 inibisce in modo indipendente *Alternaria*-indotta da IL-5 BAL nei topi IL-33 umanizzati. Le sostanze in esame sono state dosate per via intraperitoneale (0,3, 3 o 30 mg/kg come indicato tra parentesi) a -24 ore prima della stimolazione con 25 ug di *Alternaria*. BALF è stato raccolto 24 ore dopo la stimolazione con ALT e analizzato per la presenza di IL-5. L'effetto significativo delle sostanze di prova è stato determinato usando ANOVA unidirezionale con la prova di confronto multiplo di Bonferroni. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ (n=4-5).

Figura 49A Mostra l'effetto degli anticorpi in un saggio di legame FRET di IL33-ST2.

Figura 49B Mostra l'effetto degli anticorpi sul rilascio di IL-8 stimolato da IL-33 da Huvec.

Figura 50 Mostra la specificità di mAb per IL-33 da varie specie o altri membri della famiglia IL-1 usando un saggio FRET basato su **(A)** IL33 / 33_640087-7B o **(B)** 33_640237-2B.

Figura 51 Mostra l'effetto degli anticorpi sul rilascio di IL-8 da Huvec stimulate dal lisato polmonare umano.

Figura 52 Mostra che 33_640087-7B inibisce in modo dose-dipendente IL-5 di BAL indotta da *Alternaria* nei topi IL-33 umanizzati.

Figura 53A Progettazione sperimentale di uno studio pilota in vivo per indagare il potenziale di attività IL-33 indipendente da ST2.

Figura 53B Analisi dell'esposizione a IL-33 umana nel fluido di BAL in seguito a somministrazione ripetuta di IL-33 umana a topi BALB/c.

Figura 53C Analisi dell'esposizione a IL-33 nel plasma in seguito a una singola somministrazione intraperitoneale di IL-33 umana (10 ug).

Figura 53D Analisi dell'esposizione a IL-33 nel plasma in seguito a una somministrazione ripetuta di IL-33 umana a topi BALB/c.

Figura 54 Mostra sezioni rappresentative di paraffina colorata con H&E di tessuto polmonare di topi a cui è stato somministrato **(A)** PBS o **(B)** IL-33 per via intranasale per 6 settimane.

Figura 55 Mostra attività di traslocazione nucleare di **(A)** p-p38 MAPK o **(B)** p-STAT5 in Huvec in risposta a IL-33 ridotta o IL-33 DSB.

Figura 55C Analisi Western blot di p-p38 MAPK, p-JAK2 e p-STAT5 in Huvec stimulate per 15 minuti con IL-33 ridotta o IL-33 DSB.

Figura 56A Mostra il legame di RAGE-Fc a IL-33 ridotta o DSB mediante ELISA.

Figura 56B Mostra l'inibizione della risposta pSTAT5 di Huvec a IL-33 DSB con RAGE-Fc o mAb anti-RAGE.

Figura 56C Mostra l'inibizione della risposta pSTAT5 di Huvec a IL-33 DSB con mAb anti-RAGE.

Figura 57 Mostra l'effetto di anti-IL-33 rispetto ad anti-ST2 sulla risposta pSTAT5 in Huvec.

Figura 58 Mostra l'effetto dei mAb anti-IL-33, anti-ST2 o anti-RAGE sull'inibizione indotta da IL-33 della migrazione cellulare A549 rispetto a (A) IL-33 ridotta (B) IL-33 DSB.

Sommario delle sequenze

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
1	IL330002	DNA VH
2	IL330002	PRT VH
3	IL330002	PRT CRD1 VH
4	IL330002	PRT CRD2 VH
5	IL330002	PRT CRD3 VH
6	IL330002	DNA VL
7	IL330002	PRT VL
8	IL330002	PRT CDR1 VL
9	IL330002	PRT CDR2 VL
10	IL330002	PRT CDR3 VL
11	IL330004	DNA VH
12	IL330004	PRT VH
13	IL330004	PRT CRD1 VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
14	IL330004	PRT CRD2 VH
15	IL330004	PRT CRD3 VH
16	IL330004	DNA VL
17	IL330004	PRT VL
18	IL330004	PRT CDR1 VL
19	IL330004	PRT CDR2 VL
20	IL330004	PRT CDR3 VL
21	IL330020	DNA VH
22	IL330020	PRT VH
23	IL330020	PRT CRD1 VH
24	IL330020	PRT CRD2 VH
25	IL330020	PRT CRD3 VH
26	IL330020	DNA VL
27	IL330020	PRT VL
28	IL330020	PRT CDR1 VL
29	IL330020	PRT CDR2 VL
30	IL330020	PRT CDR3 VL
31	IL330071	DNA VH
32	IL330071	PRT VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
33	IL330071	PRT CRD1 VH
34	IL330071	PRT CRD2 VH
35	IL330071	PRT CRD3 VH
36	IL330071	DNA VL
37	IL330071	PRT VL
38	IL330071	PRT CDR1 VL
39	IL330071	PRT CDR2 VL
40	IL330071	PRT CDR3 VL
41	IL330125	DNA VH
42	IL330125	PRT VH
43	IL330125	PRT CRD1 VH
44	IL330125	PRT CRD2 VH
45	IL330125	PRT CRD3 VH
46	IL330125	DNA VL
47	IL330125	PRT VL
48	IL330125	PRT CDR1 VL
49	IL330125	PRT CDR2 VL
50	IL330125	PRT CDR3 VL
51	IL330126	DNA VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
52	IL330126	PRT VH
53	IL330126	PRT CRD1 VH
54	IL330126	PRT CRD2 VH
55	IL330126	PRT CRD3 VH
56	IL330126	DNA VL
57	IL330126	PRT VL
58	IL330126	PRT CDR1 VL
59	IL330126	PRT CDR2 VL
60	IL330126	PRT CDR3 VL
61	IL330425	DNA VH
62	IL330425	PRT VH
63	IL330425	PRT CRD1 VH
64	IL330425	PRT CRD2 VH
65	IL330425	PRT CRD3 VH
66	IL330425	DNA VL
67	IL330425	PRT VL
68	IL330425	PRT CDR1 VL
69	IL330425	PRT CDR2 VL
70	IL330425	PRT CDR3 VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
71	IL330428	DNA VH
72	IL330428	PRT VH
73	IL330428	PRT CRD1 VH
74	IL330428	PRT CRD2 VH
75	IL330428	PRT CRD3 VH
76	IL330428	DNA VL
77	IL330428	PRT VL
78	IL330428	PRT CDR1 VL
79	IL330428	PRT CDR2 VL
80	IL330428	PRT CDR3 VL
81	IL330065	DNA VH
82	IL330065	PRT VH
83	IL330065	PRT CRD1 VH
84	IL330065	PRT CRD2 VH
85	IL330065	PRT CRD3 VH
86	IL330065	DNA VL
87	IL330065	PRT VL
88	IL330065	PRT CDR1 VL
89	IL330065	PRT CDR2 VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
90	IL330065	PRT CDR3 VL
91	IL330099	DNA VH
92	IL330099	PRT VH
93	IL330099	PRT CRD1 VH
94	IL330099	PRT CRD2 VH
95	IL330099	PRT CRD3 VH
96	IL330099	DNA VL
97	IL330099	PRT VL
98	IL330099	PRT CDR1 VL
99	IL330099	PRT CDR2 VL
100	IL330099	PRT CDR3 VL
101	IL330101	DNA VH
102	IL330101	PRT VH
103	IL330101	PRT CRD1 VH
104	IL330101	PRT CRD2 VH
105	IL330101	PRT CRD3 VH
106	IL330101	DNA VL
107	IL330101	PRT VL
108	IL330101	PRT CDR1 VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
109	IL330101	PRT CDR2 VL
110	IL330101	PRT CDR3 VL
111	IL330101_fgl	DNA VH
112	IL330101_fgl	PRT VH
113	IL330101_fgl	PRT CRD1 VH
114	IL330101_fgl	PRT CRD2 VH
115	IL330101_fgl	PRT CRD3 VH
116	IL330101_fgl	DNA VL
117	IL330101_fgl	PRT VL
118	IL330101_fgl	PRT CDR1 VL
119	IL330101_fgl	PRT CDR2 VL
120	IL330101_fgl	PRT CDR3 VL
121	IL330107	DNA VH
122	IL330107	PRT VH
123	IL330107	PRT CRD1 VH
124	IL330107	PRT CRD2 VH
125	IL330107	PRT CRD3 VH
126	IL330107	DNA VL
127	IL330107	PRT VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
128	IL330107	PRT CDR1 VL
129	IL330107	PRT CDR2 VL
130	IL330107	PRT CDR3 VL
131	IL330149	DNA VH
132	IL330149	PRT VH
133	IL330149	PRT CRD1 VH
134	IL330149	PRT CRD2 VH
135	IL330149	PRT CRD3 VH
136	IL330149	DNA VL
137	IL330149	PRT VL
138	IL330149	PRT CDR1 VL
139	IL330149	PRT CDR2 VL
140	IL330149	PRT CDR3 VL
141	IL330180	DNA VH
142	IL330180	PRT VH
143	IL330180	PRT CRD1 VH
144	IL330180	PRT CRD2 VH
145	IL330180	PRT CRD3 VH
146	IL330180	DNA VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
147	IL330180	PRT VL
148	IL330180	PRT CDR1 VL
149	IL330180	PRT CDR2 VL
150	IL330180	PRT CDR3 VL
151	IL330259	DNA VH
152	IL330259	PRT VH
153	IL330259	PRT CRD1 VH
154	IL330259	PRT CRD2 VH
155	IL330259	PRT CRD3 VH
156	IL330259	DNA VL
157	IL330259	PRT VL
158	IL330259	PRT CDR1 VL
159	IL330259	PRT CDR2 VL
160	IL330259	PRT CDR3 VL
161	IL330259_fgl	DNA VH
162	IL330259_fgl	PRT VH
163	IL330259_fgl	PRT CRD1 VH
164	IL330259_fgl	PRT CRD2 VH
165	IL330259_fgl	PRT CRD3 VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
166	IL330259_fgl	DNA VL
167	IL330259_fgl	PRT VL
168	IL330259_fgl	PRT CDR1 VL
169	IL330259_fgl	PRT CDR2 VL
170	IL330259_fgl	PRT CDR3 VL
171	H338L293	DNA VH
172	H338L293	PRT VH
173	H338L293	PRT CRD1 VH
174	H338L293	PRT CRD2 VH
175	H338L293	PRT CRD3 VH
176	H338L293	DNA VL
177	H338L293	PRT VL
178	H338L293	PRT CDR1 VL
179	H338L293	PRT CDR2 VL
180	H338L293	PRT CDR3 VL
181	H338L293_fgl	DNA VH
182	H338L293_fgl	PRT VH
183	H338L293_fgl	PRT CRD1 VH
184	H338L293_fgl	PRT CRD2 VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
185	H338L293_fgl	PRT CRD3 VH
186	H338L293_fgl	DNA VL
187	H338L293_fgl	PRT VL
188	H338L293_fgl	PRT CDR1 VL
189	H338L293_fgl	PRT CDR2 VL
190	H338L293_fgl	PRT CDR3 VL
191	IL330377	DNA VH
192	IL330377	PRT VH
193	IL330377	PRT CRD1 VH
194	IL330377	PRT CRD2 VH
195	IL330377	PRT CRD3 VH
196	IL330377	DNA VL
197	IL330377	PRT VL
198	IL330377	PRT CDR1 VL
199	IL330377	PRT CDR2 VL
200	IL330377	PRT CDR3 VL
201	IL330377_fgl	DNA VH
202	IL330377_fgl	PRT VH
203	IL330377_fgl	PRT CRD1 VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
204	IL330377_fgl	PRT CRD2 VH
205	IL330377_fgl	PRT CRD3 VH
206	IL330377_fgl	DNA VL
207	IL330377_fgl	PRT VL
208	IL330377_fgl	PRT CDR1 VL
209	IL330377_fgl	PRT CDR2 VL
210	IL330377_fgl	PRT CDR3 VL
211	IL330388	DNA VH
212	IL330388	PRT VH
213	IL330388	PRT CRD1 VH
214	IL330388	PRT CRD2 VH
215	IL330388	PRT CRD3 VH
216	IL330388	DNA VL
217	IL330388	PRT VL
218	IL330388	PRT CDR1 VL
219	IL330388	PRT CDR2 VL
220	IL330388	PRT CDR3 VL
221	IL330388 fgl	DNA VH
222	IL330388_fgl	PRT VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
223	IL330388_fgl	PRT CRD1 VH
224	IL330388_fgl	PRT CRD2 VH
225	IL330388_fgl	PRT CRD3 VH
226	IL330388_fgl	DNA VL
227	IL330388_fgl	PRT VL
228	IL330388_fgl	PRT CDR1 VL
229	IL330388_fgl	PRT CDR2 VL
230	IL330388_fgl	PRT CDR3 VL
231	IL330396	DNA VH
232	IL330396	PRT VH
233	IL330396	PRT CRD1 VH
234	IL330396	PRT CRD2 VH
235	IL330396	PRT CRD3 VH
236	IL330396	DNA VL
237	IL330396	PRT VL
238	IL330396	PRT CDR1 VL
239	IL330396	PRT CDR2 VL
240	IL330396	PRT CDR3 VL
241	IL330396_fgl	DNA VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
242	IL330396_fgl	PRT VH
243	IL330396_fgl	PRT CRD1 VH
244	IL330396_fgl	PRT CRD2 VH
245	IL330396_fgl	PRT CRD3 VH
246	IL330396_fgl	DNA VL
247	IL330396_fgl	PRT VL
248	IL330396_fgl	PRT CDR1 VL
249	IL330396_fgl	PRT CDR2 VL
250	IL330396_fgl	PRT CDR3 VL
251	IL330398	DNA VH
252	IL330398	PRT VH
253	IL330398	PRT CRD1 VH
254	IL330398	PRT CRD2 VH
255	IL330398	PRT CRD3 VH
256	IL330398	DNA VL
257	IL330398	PRT VL
258	IL330398	PRT CDR1 VL
259	IL330398	PRT CDR2 VL
260	IL330398	PRT CDR3 VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
261	IL330398_fgl	DNA VH
262	IL330398_fgl	PRT VH
263	IL330398_fgl	PRT CRD1 VH
264	IL330398_fgl	PRT CRD2 VH
265	IL330398_fgl	PRT CRD3 VH
266	IL330398_fgl	DNA VL
267	IL330398_fgl	PRT VL
268	IL330398_fgl	PRT CDR1 VL
269	IL330398_fgl	PRT CDR2 VL
270	IL330398_fgl	PRT CDR3 VL
271	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	DNA VH
272	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	PRT VH
273	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	PRT CRD1 VH
274	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	PRT CRD2 VH
275	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	PRT CRD3 VH
276	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	DNA VL
277	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	PRT VL
278	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	PRT CDR1 VL
279	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	PRT CDR2 VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
280	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	PRT CDR3 VL
281	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	DNA VH
282	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	PRT VH
283	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	PRT CRD1 VH
284	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	PRT CRD2 VH
285	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	PRT CRD3 VH
286	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	DNA VL
287	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	PRT VL
288	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	PRT CDR1 VL
289	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	PRT CDR2 VL
290	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	PRT CDR3 VL
291	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	DNA VH
292	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	PRT VH
293	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	PRT CRD1 VH
294	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	PRT CRD2 VH
295	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	PRT CRD3 VH
296	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	DNA VL
297	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	PRT VL
298	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	PRT CDR1 VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
299	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	PRT CDR2 VL
300	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	PRT CDR3 VL
301	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	DNA VH
302	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	PRT VH
303	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	PRT CRD1 VH
304	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	PRT CRD2 VH
305	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	PRT CRD3 VH
306	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	DNA VL
307	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	PRT VL
308	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	PRT CDR1 VL
309	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	PRT CDR2 VL
310	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	PRT CDR3 VL
311	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	DNA VH
312	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	PRT VH
313	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	PRT CRD1 VH
314	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	PRT CRD2 VH
315	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	PRT CRD3 VH
316	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	DNA VL
317	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	PRT VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
318	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	PRT CDR1 VL
319	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	PRT CDR2 VL
320	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	PRT CDR3 VL
321	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	DNA VH
322	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	PRT VH
323	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	PRT CRD1 VH
324	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	PRT CRD2 VH
325	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	PRT CRD3 VH
326	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	DNA VL
327	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	PRT VL
328	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	PRT CDR1 VL
329	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	PRT CDR2 VL
330	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	PRT CDR3 VL
331	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	DNA VH
332	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	PRT VH
333	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	PRT CRD1 VH
334	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	PRT CRD2 VH
335	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	PRT CRD3 VH
336	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	DNA VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
337	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	PRT VL
338	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	PRT CDR1 VL
339	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	PRT CDR2 VL
340	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	PRT CDR3 VL
341	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	DNA VH
342	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	PRT VH
343	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	PRT CRD1 VH
344	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	PRT CRD2 VH
345	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	PRT CRD3 VH
346	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	DNA VL
347	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	PRT VL
348	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	PRT CDR1 VL
349	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	PRT CDR2 VL
350	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	PRT CDR3 VL
351	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	DNA VH
352	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	PRT VH
353	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	PRT CRD1 VH
354	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	PRT CRD2 VH
355	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	PRT CRD3 VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
356	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	DNA VL
357	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	PRT VL
358	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	PRT CDR1 VL
359	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	PRT CDR2 VL
360	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	PRT CDR3 VL
361	33_640117	DNA VH
362	33_640117	PRT VH
363	33_640117	PRT CRD1 VH
364	33_640117	PRT CRD2 VH
365	33_640117	PRT CRD3 VH
366	33_640117	DNA VL
367	33_640117	PRT VL
368	33_640117	PRT CDR1 VL
369	33_640117	PRT CDR2 VL
370	33_640117	PRT CDR3 VL
371	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	DNA VH
372	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	PRT VH
373	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	PRT CRD1 VH
374	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	PRT CRD2 VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
375	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	PRT CRD3 VH
376	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	DNA VL
377	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	PRT VL
378	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	PRT CDR1 VL
379	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	PRT CDR2 VL
380	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	PRT CDR3 VL
381	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	DNA VH
382	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	PRT VH
383	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	PRT CRD1 VH
384	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	PRT CRD2 VH
385	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	PRT CRD3 VH
386	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	DNA VL
387	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	PRT VL
388	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	PRT CDR1 VL
389	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	PRT CDR2 VL
390	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	PRT CDR3 VL
391	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	DNA VH
392	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	PRT VH
393	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	PRT CRD1 VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
394	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	PRT CRD2 VH
395	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	PRT CRD3 VH
396	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	DNA VL
397	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	PRT VL
398	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	PRT CDR1 VL
399	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	PRT CDR2 VL
400	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	PRT CDR3 VL
401	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	DNA VH
402	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	PRT VH
403	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	PRT CRD1 VH
404	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	PRT CRD2 VH
405	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	PRT CRD3 VH
406	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	DNA VL
407	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	PRT VL
408	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	PRT CDR1 VL
409	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	PRT CDR2 VL
410	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	PRT CDR3 VL
411	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	DNA VH
412	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	PRT VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
413	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	PRT CRD1 VH
414	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	PRT CRD2 VH
415	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	PRT CRD3 VH
416	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	DNA VL
417	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	PRT VL
418	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	PRT CDR1 VL
419	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	PRT CDR2 VL
420	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	PRT CDR3 VL
421	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	DNA VH
422	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	PRT VH
423	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	PRT CRD1 VH
424	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	PRT CRD2 VH
425	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	PRT CRD3 VH
426	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	DNA VL
427	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	PRT VL
428	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	PRT CDR1 VL
429	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	PRT CDR2 VL
430	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	PRT CDR3 VL
431	33_640076_1	DNA VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
432	33 640076 1	PRT VH
433	33 640076 1	PRT CRD1 VH
434	33 640076 1	PRT CRD2 VH
435	33 640076 1	PRT CRD3 VH
436	33 640076 1	DNA VL
437	33 640076 1	PRT VL
438	33_640076_1	PRT CDR1 VL
439	33_640076_1	PRT CDR2 VL
440	33_640076_1	PRT CDR3 VL
441	33_640081_A	DNA VH
442	33 640081 A	PRT VH
443	33 640081 A	PRT CRD1 VH
444	33 640081 A	PRT CRD2 VH
445	33 640081 A	PRT CRD3 VH
446	33_640081_A	DNA VL
447	33 640081 A	PRT VL
448	33_640081_A	PRT CDR1 VL
449	33_640081_A	PRT CDR2 VL
450	33_640081_A	PRT CDR3 VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
451	33_640082_2	DNA VH
452	33 640082 2	PRT VH
453	33 640082 2	PRT CRD1 VH
454	33 640082 2	PRT CRD2 VH
455	33 640082 2	PRT CRD3 VH
456	33_640082_2	DNA VL
457	33 640082 2	PRT VL
458	33_640082_2	PRT CDR1 VL
459	33_640082_2	PRT CDR2 VL
460	33_640082_2	PRT CDR3 VL
461	33 640084 2	DNA VH
462	33 640084 2	PRT VH
463	33 640084 2	PRT CRD1 VH
464	33 640084 2	PRT CRD2 VH
465	33 640084 2	PRT CRD3 VH
466	33_640084_2	DNA VL
467	33 640084 2	PRT VL
468	33_640084_2	PRT CDR1 VL
469	33_640084_2	PRT CDR2 VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
470	33_640084_2	PRT CDR3 VL
471	33_640086_2	DNA VH
472	33 640086 2	PRT VH
473	33 640086 2	PRT CRD1 VH
474	33 640086 2	PRT CRD2 VH
475	33 640086 2	PRT CRD3 VH
476	33_640086_2	DNA VL
477	33 640086 2	PRT VL
478	33_640086_2	PRT CDR1 VL
479	33 640086 2	PRT CDR2 VL
480	33_640086_2	PRT CDR3 VL
481	33 640087 2	DNA VH
482	33 640087 2	PRT VH
483	33 640087 2	PRT CRD1 VH
484	33 640087 2	PRT CRD2 VH
485	33 640087 2	PRT CRD3 VH
486	33 640087 2	DNA VL
487	33 640087 2	PRT VL
488	33 640087 2	PRT CDR1 VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
489	33 640087 2	PRT CDR2 VL
490	33 640087 2	PRT CDR3 VL
491	33 640076 4	DNA VH
492	33 640076 4	PRT VH
493	33 640076 4	PRT CRD1 VH
494	33 640076 4	PRT CRD2 VH
495	33 640076 4	PRT CRD3 VH
496	33 640076 4	DNA VL
497	33 640076 4	PRT VL
498	33 640076 4	PRT CDR1 VL
499	33 640076 4	PRT CDR2 VL
500	33 640076 4	PRT CDR3 VL
501	33 640082 4	DNA VH
502	33 640082 4	PRT VH
503	33 640082 4	PRT CRD1 VH
504	33 640082 4	PRT CRD2 VH
505	33 640082 4	PRT CRD3 VH
506	33 640082 4	DNA VL
507	33 640082 4	PRT VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
508	33 640082 4	PRT CDR1 VL
509	33 640082 4	PRT CDR2 VL
510	33 640082 4	PRT CDR3 VL
511	33 640082 6	DNA VH
512	33 640082 6	PRT VH
513	33 640082 6	PRT CRD1 VH
514	33 640082 6	PRT CRD2 VH
515	33 640082 6	PRT CRD3 VH
516	33 640082 6	DNA VL
517	33 640082 6	PRT VL
518	33 640082 6	PRT CDR1 VL
519	33 640082 6	PRT CDR2 VL
520	33 640082 6	PRT CDR3 VL
521	33 640082 7	DNA VH
522	33 640082 7	PRT VH
523	33 640082 7	PRT CRD1 VH
524	33 640082 7	PRT CRD2 VH
525	33 640082 7	PRT CRD3 VH
526	33_640082_7	DNA VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
527	33 640082 7	PRT VL
528	33_640082_7	PRT CDR1 VL
529	33 640082 7	PRT CDR2 VL
530	33_640082_7	PRT CDR3 VL
531	33_640086_6	DNA VH
532	33 640086 6	PRT VH
533	33 640086 6	PRT CRD1 VH
534	33 640086 6	PRT CRD2 VH
535	33 640086 6	PRT CRD3 VH
536	33_640086_6	DNA VL
537	33_640086_6	PRT VL
538	33_640086_6	PRT CDR1 VL
539	33_640086_6	PRT CDR2 VL
540	33_640086_6	PRT CDR3 VL
541	33_640087_7	DNA VH
542	33_640087_7	PRT VH
543	33_640087_7	PRT CRD1 VH
544	33_640087_7	PRT CRD2 VH
545	33_640087_7	PRT CRD3 VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
546	33_640087_7	DNA VL
547	33_640087_7	PRT VL
548	33_640087_7	PRT CDR1 VL
549	33_640087_7	PRT CDR2 VL
550	33_640087_7	PRT CDR3 VL
551	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	DNA VH
552	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	PRT VH
553	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	PRT CRD1 VH
554	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	PRT CRD2 VH
555	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	PRT CRD3 VH
556	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	DNA VL
557	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	PRT VL
558	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	PRT CDR1 VL
559	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	PRT CDR2 VL
560	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	PRT CDR3 VL
561	ZZ1M37-E06 (33_640237)	DNA VH
562	ZZ1M37-E06 (33_640237)	PRT VH
563	ZZ1M37-E06 (33_640237)	PRT CRD1 VH
564	ZZ1M37-E06 (33_640237)	PRT CRD2 VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
565	ZZ1M37-E06 (33_640237)	PRT CRD3 VH
566	ZZ1M37-E06 (33_640237)	DNA VL
567	ZZ1M37-E06 (33_640237)	PRT VL
568	ZZ1M37-E06 (33_640237)	PRT CDR1 VL
569	ZZ1M37-E06 (33_640237)	PRT CDR2 VL
570	ZZ1M37-E06 (33_640237)	PRT CDR3 VL
571	33_640201_2	DNA VH
572	33_640201_2	PRT VH
573	33_640201_2	PRT CRD1 VH
574	33_640201_2	PRT CRD2 VH
575	33_640201_2	PRT CRD3 VH
576	33_640201_2	DNA VL
577	33_640201_2	PRT VL
578	33_640201_2	PRT CDR1 VL
579	33_640201_2	PRT CDR2 VL
580	33_640201_2	PRT CDR3 VL
581	33_640237_2	DNA VH
582	33_640237_2	PRT VH
583	33_640237_2	PRT CRD1 VH

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
584	33_640237_2	PRT CRD2 VH
585	33_640237_2	PRT CRD3 VH
586	33_640237_2	DNA VL
587	33_640237_2	PRT VL
588	33_640237_2	PRT CDR1 VL
589	33_640237_2	PRT CDR2 VL
590	33_640237_2	PRT CDR3 VL
591	33_640076_4B	DNA VH
592	33_640076_4B	PRT VH
593	33_640076_4B	DNA VL
594	33_640076_4B	PRT VL
595	33_640081_AB	DNA VH
596	33_640081_AB	PRT VH
597	33_640081_AB	DNA VL
598	33_640081_AB	PRT VL
599	33_640082_6B	DNA VH
600	33_640082_6B	PRT VH
601	33_640082_6B	DNA VL
602	33_640082_6B	PRT VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
603	33_640082_7B	DNA VH
604	33 640082 7B	PRT VH
605	33_640082_7B	DNA VL
606	33_640082 7B	PRT VL
607	33_640084_2B	DNA VH
608	33 640084 2B	PRT VH
609	33_640084_2B	DNA VL
610	33_640084_2B	PRT VL
611	33_640086_6B	DNA VH
612	33_640086_6B	PRT VH
613	33_640086_6B	DNA VL
614	33_640086_6B	PRT VL
615	33_640087_7B	DNA VH
616	33_640087_7B	PRT VH
617	33_640087_7B	DNA VL
618	33_640087_7B	PRT VL
619	33_640201_2B	DNA VH
620	33 640201 2B	PRT VH
621	33_640201_2B	DNA VL

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
622	33_ 640201 2B	PRT VL
623	33_640237_2B	DNA VH
624	33 640237 2B	PRT VH
625	33_640237_2B	DNA VL
626	33_640237_2B	PRT VL
627	IL-33_FH umana matura	a.a. PRT 112-270
628	IL-33_FH di topo matura	a.a. PRT 109-266
629	IL-33 di cynomolugus matura	a.a. PRT 112-270
630	ECD-Fc/his6 ST2 umano	a.a. PRT 1-328
631	ECD-Fc/His6 ST2 di topo	a.a. PRT 1-332
632	IL33-01	a.a. PRT 112-270
633	IL-33 matura TEV 6His umana	a.a. PRT 112-270
634	IL33-02	a.a. PRT 112-270
635	IL33-03	a.a. PRT 112-270
636	IL33-04	a.a. PRT 112-270
637	IL33-05	a.a. PRT 112-270
638	IL33-06	a.a. PRT 112-270
639	IL33-07	a.a. PRT 112-270
640	IL33-08	a.a. PRT 112-270

SEQ ID NO:	Riferimento/Nome anticorpo	Descrizione
641	IL33-09	a.a. PRT 112-270
642	IL33-10	a.a. PRT 112-270
643	IL33-11	a.a. PRT 112-270
644	IL33-12	a.a. PRT 112-270
645	IL33-13	a.a. PRT 112-270
646	IL33-14	a.a. PRT 112-270
647	IL33-15	a.a. PRT 112-270
648	IL33-16	a.a. PRT 112-270
649	IL-33 Avitag 10His di cynomolgus	a.a. PRT 112-270
650	ECD-Flag-his10 ST2 umano	a.a. PRT 1-328

ESEMPI

Esempio 1 Isolamento di anticorpi rispetto a IL-33

Clonaggio, espressione e purificazione di IL-33 matura da un essere umano, topo e scimmia cynomolgus

Le sequenze proteiche per IL-1RAcP e ST2 sono state ottenute da Swiss Prot. L'isolamento e l'identificazione di molecole di cDNA di anticorpi di scFv anti-IL-33 codificanti per il componente maturo di IL-33 sono state sintetizzate mediante PCR di estensione del primer e clonate in pJexpress404 (DNA 2.0). I numeri di accesso corrispondenti alle informazioni di sequenza del database per IL-33 umana e di topo sono

mostrati nella **Tabella 2**. Non erano disponibili sequenze di scimmia *Cynomolgus*, quindi, sulla base dell'elevata omologia tra scimmia *Cynomolgus* e scimmia Rhesus, la sequenza di scimmia Rhesus (n° di accesso ENSMMUT00000030043) è stata usata per progettare primer in grado di amplificare la sequenza codificante del gene di IL-33 nella scimmia *Cynomolgus*. La sequenza del gene Rhesus è stata allineata alla sequenza del cDNA di IL-33 umana (n° di accesso NM_033439), ciò ha dimostrato che la sequenza Rhesus era assemblata in modo errato e mancava l'esone 1. È stata eseguita una ricerca BLAST rispetto alla sequenza genomica Rhesus usando l'esone umano 1 ed è stata identificata la sequenza Rhesus che corrisponde all'esone 1. Primer aggiuntivi sono stati progettati per amplificare l'esone 1.

La sequenza codificante IL-33 matura è stata modificata per contenere un tag di epitopo FLAG® 10xhis (DYKDDDDKAAHHHHHHHHHH; SEQ ID NO. 627) nel terminale C della proteina. I SEQ ID NO corrispondenti a IL-33 umana, di *cynomolgus* e di topo matura con tag Flag®His sono mostrati nella **Tabella 2**.

Tabella 2. Sequenze di IL-33 matura umana, di topo e di scimmia *cynomolgus*

Specie	Aminoacidi	N° di accesso (Swiss-Prot)	Sequenze IL-33 con tag Flag®His
Umana	112-270	O95760	SEQ ID NO. 627
Topo	109-266	Q8BVZ5	SEQ ID NO. 628

Specie	Amminoacidi	N° di accesso (Swiss-Prot)	Sequenze IL-33 con tag Flag®His
Cynomolgus	112-270	Non disponibile	SEQ ID NO. 629

I vettori sono stati trasformati in cellule competenti BL21 (DE3) (Merck Biosciences, 69450) e l'espressione è stata indotta con 1 mM di IPTG. Le cellule raccolte sono state lisate con Bugbuster (Merck Biosciences, 70584) e la proteina espressa è stata purificata usando la cromatografia per affinità Ni-NTA (colonna HP Histrap: GE Healthcare, 17-5248-02) seguita da Cromatografia a esclusione dimensionale (colonna Superdex 75: GE Healthcare, 17-1068-01).

Modificazioni di proteine

Le IgG e le proteine recettoriali modificate usate nel presente documento sono state biotinilate tramite ammine libere usando il collegamento EZ Sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo/Pierce, 21335). Il reagente di biotina è stato dissolto in dimetilformammide anidra e le soluzioni proteiche a base di PBS sono state regolate a pH 8 con 1 M di NaHCO₃ in D-PBS (soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco). Le proteine IL-33 usate nel presente documento sono state biotinilate tramite cisteine libere usando il collegamento EZ Biotin-BMCC (Perbio/Pierce, prodotto n° 21900). Il reagente della biotina è stato dissolto in dimetilformammide anidra e soluzioni di proteine PBS miste. Le incorporazioni di etichetta sono state valutate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF in tutti i casi e i reagenti non reagiti

sono stati eliminati mediante scambio di tamponi usando colonne Sephadex G25 monouso equilibrate con PBS. Per la biotinilazione, le concentrazioni finali di proteine sono state determinate mediante un'assorbanza di 280 nm usando coefficienti di estinzione calcolati dalle sequenze di amminoacidi.

Selezioni

Per le selezioni è stata usata una grande libreria di anticorpi umani Fv (scFv) a catena singola, basata su geni variabili (V) isolati da cellule B umane da donatori adulti naïve e clonati in un vettore fagemide basato sul fago filamentoso M13 (Hutchings, C., "Generation of Naïve Human Antibody Libraries" in Antibody Engineering, Dubel. Berlino, Springer Laboratory Manuals: pagina 93 (2001); Lloyd et al., Protein Eng. Des. Sel. 22(3):159-68 (2009)). Gli anticorpi scFv specifici per IL-33 sono stati isolati dalla libreria di visualizzazione dei fagi in una serie di cicli di selezione ripetuti su IL-33 umana e/o di topo ricombinante essenzialmente come descritto in Vaughan et al. (Nat. Biotechnol. 14 (3):309-14 (1996)). Un elenco dei reagenti di IL-33 usato nel presente documento è mostrato nella **Tabella 3**.

Tabella 3: Reagenti di saggio di legame ELISA

Reagente	Fornitore	Numero catalogo/progettazione	di Saggio ELISA
IL-33 umana	Axxora / Adipogen	AG-40B-0038	Fago / IgG
IL-33 umana	Axxora	/ ALX-522-098	Fago

Reagente	Fornitore	Numero catalogo/progettazione	di Saggio ELISA
	Alexis		
IL-33 Flag®His umana	Di laboratorio	PS-295	Fago / IgG
IL-33 umana	Peptotech	200-33	Fago
IL-33 di topo	Peptotech	210-33	Fago
IL-33 di topo	Axxora / Alexis	ALX-522-101	Fago
IL-33 Flag®His di topo	Di laboratorio	PS-296	Fago / IgG
IL-33 Flag®His di Cynomolgus	Di laboratorio	PS-368	Fago / IgG
IL-4Rα Flag®His	Di laboratorio	020629080	Fago / IgG
Insulina bovina - biotina	Sigma	12258	Fago / IgG

In breve, le particelle del fago scFv sono state incubate con IL-33 ricombinante biotinilata in soluzione (biotinilata tramite cisteine libere usando il collegamento EZ Biotin-BMCC (Perbio/Pierce, prodotto n° 21900)). Le particelle sono state incubate con 100 nM di IL-33

ricombinante biotinilata per 2 ore. Gli ScFv legati all'antigene sono stati quindi catturati su biglie paramagnetiche rivestite di streptavidina (Dynabeads®, M-280) seguendo le raccomandazioni del fabbricatore. Il fago non legato è stato lavato via in una serie di cicli di lavaggio usando PBS-Tween. Le particelle fagiche trattenute sull'antigene sono state eluite, infettate in batteri e salvate per il successivo turno di selezione. Tipicamente, sono stati eseguiti in questo modo due o tre turni di selezione.

Identificazione di leganti specifici a IL-33 mediante ELISA fagico

Un numero rappresentativo di singoli cloni derivanti dagli esiti della selezione dopo due o tre turni di selezione descritti sopra è stato coltivato in piastre a 96 pozzetti. I frammenti Fv a catena singola sono stati visualizzati su particelle fagiche e provati in un saggio di legame per determinare la reattività crociata e la specificità per un panel di antigeni di IL-33 umana, di topo e di cynomolgus ricombinante. I campioni di surnatante di scFv visualizzati dai fagi sono stati generati in piastre a pozzetti profondi da 96 pozzetti come segue. 5 µl di coltura da ciascun pozzetto di una piastra master a 96 pozzetti sono stati trasferiti in una piastra di coltura a pozzetti profondi Greiner contenente 500 µl di terreno 2TYAG (2TY + 100 µg/ml di ampicillina + glucosio al 2%) e incubati per 5 ore a 37 °C, 280 giri/minuto. Il fago helper M13 K07 (diluito a $1,5 \times 10^{11}$ pfu/ml in 2TYAG) è stato quindi aggiunto a 100 µl/pozzetto e la piastra è stata incubata a 37 °C, a 150 giri/minuto per

consentire l'infezione. La piastra è stata centrifugata a 3200 giri/minuto per 10 minuti e il surnatante è stato rimosso. I pellet batterici sono stati risospesi in 500 µl/pozzetto di 2TYAK (2TY + 100 µg/ml di ampicillina + 50 µg/ml di kanamicina) e la piastra incubata per una notte a 25 °C, a 280 giri/minuto. Al mattino, 500 µl di latte scremato in polvere al 6% (p/v) in 2x PBS sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e la piastra è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente. La piastra è stata quindi centrifugata a 3200 giri/minuto per 10 minuti e i surnatanti di scFv visualizzati dai fagi bloccati sono stati usati direttamente negli esperimenti ELISA.

Per le determinazioni di EC₅₀, le IgG tipicamente purificate sono state diluite 3 volte nel latte disidratato in polvere al 3% (p/v) in PBS (PBS-M), per dare 11 punti di concentrazione. Per la preparazione della diluizione sono state usate piastre in polipropilene Greiner a 96 pozzetti (Greiner, 650201). Generalmente, ciascuna diluizione è stata preparata in duplicato. Le diluizioni di IgG sono state lasciate bloccarsi in PBS-M per 1 ora a temperatura ambiente prima di essere usate direttamente negli esperimenti ELISA.

I saggi di legame a IL-33 erano ELISA su piastra eseguiti essenzialmente come segue. La **Tabella 3** di cui sopra mostra gli antigeni usati per questi esperimenti. Non tutti gli antigeni sono stati usati in ogni esperimento, ma in tutti i casi è stato provato un antigene di IL-33 umana, di topo e di cynomolgus. Anche gli antigeni di controllo rilevanti (insulina bovina più IL-4Rα FLAG®His, se appropriato) sono

stati usati per provare il legame aspecifico. Con l'eccezione dell'insulina bovina, tutti gli antigeni sono stati biotinilati (si veda la sottosezione 1.1. sopra) e tutti sono stati generati usando l'espressione batterica. Il metodo per la generazione di IL-4R α FLAG®His, che è stato usato come un antigene di controllo, è descritto in WO/2010/070346.

Le piastre di streptavidina (Thermo Scientific, AB-1226) sono state rivestite con antigene biotinilato a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ in PBS e incubate per una notte a 4 °C. Le piastre sono state lavate 3 volte con PBS e bloccate con 300 μl /pozzetto di tampone bloccante (PBS-M) per 1 ora. Le piastre sono state lavate 1 volta con PBS e sono stati aggiunti campioni bloccati, 50 μl /pozzetto per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate 3 volte con PBS-T (PBS + Tween-20 all'1% (v/v)) e reagenti di rilevamento [IgG anti-umana HRP (Sigma, A0170) o anticorpo anti-M13-HRP (Amersham, 27-9421- 01) per il rilevamento di IgG o scFv visualizzato da fagi, rispettivamente] sono stati aggiunti a 1:5000 diluizioni a 50 μl /pozzetto in PBS-M per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate 3 volte con PBS-T e sviluppate con TMB, 50 μl /pozzetto (Sigma, T0440). La reazione è stata spenta con 50 μl /pozzetto di 0,1 M di H₂SO₄ prima della lettura su un lettore di piastre EnVision™, o un'apparecchiatura simile, a 450 nm.

Le curve di risposta alla dose sono state tracciate per le titolazioni di IgG usando il software di adattamento della curva Prism (Graphpad). Si è ritenuto che gli scFv visualizzati dai fagi legassero

l'antigene di IL-33 se l'assorbanza di 450 nm era $> 0,5$ e $< 0,2$ per lo stesso campione sui controlli (insulina e IL-4R α Flag®His).

Clonaggio, espressione e purificazione di ECD ST2 di essere umano e topo

Le molecole di cDNA codificanti i domini extracellulari (ECD) di ST2 dell'uomo e del topo sono state sintetizzate mediante clonaggio PCR di estensione del primer e clonate in pDONR221 (Invitrogen, 12536-017). Sono state usate sequenze di database per ST2 umano e di topo (si veda la **Tabella 4**). I cloni di cDNA ECD ST2 in pDONR221 sono stati trasferiti al vettore di espressione dei mammiferi pDEST12.2 usando l'enzima LR Gateway Clonase II secondo le istruzioni del fabbricatore. Il vettore pDEST12.2 è stato modificato per contenere la regione codificante Fc IgG1 umana, il tag di poliistidina (His6) nel quadro con il gene di interesse inserito, e anche mediante l'inserzione dell'origine oriP della replicazione dal vettore pCEP4 consentendo la replicazione plasmidica episomale alla trasfezione in linee cellulari che esprimono il prodotto del gene EBNA-1 (come le cellule HEK293-EBNA).

Tabella 4. Amminoacidi e numeri di accesso per dominio extracellulare ST2 umano e di topo

Specie	Amminoacidi	Numero di accesso (Swiss-Prot)	Sequenze EDC-Fc-His6
Umana	1-328	Q01638	SEQ ID NO: 630
Topo	1-332	P14719	SEQ ID NO: 631

Le proteine ST2.Fc espresse nei surnatanti HEK293-EBNA sono state purificate usando la cromatografia per affinità della proteina A (colonna HiTrap Proteina A (GE Healthcare, 17-0402-01)) seguita dalla Cromatografia di esclusione dimensionale (colonna Superdex 200 (GE Healthcare, 17-1069-01)).

Inibizione di legame di IL-33 a ST2 mediante scFv non purificato

Un numero rappresentativo di singoli cloni derivanti dagli esiti della selezione dopo due o tre turni di selezione descritti sopra è stato coltivato in piastre a 96 pozzetti. ScFv sono stati espressi nel periplasma batterico (Kipriyanov, et al. J Immunol Methods 200 (1-2): 69-77 (1997)) e sottoposti a screening per la loro attività inibitoria in un saggio di legame basato su IL-33:ST2 FRET omogeneo (trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza) HTRF® (Fluorescenza omogenea a risoluzione temporale, Cisbio International). In questo saggio, i campioni erano in competizione con ST2.Fc umano o di topo per il legame a IL-33 umana, di cynomolgus o di topo con tag FLAG®His.

Un saggio HTRF® è una tecnologia di saggio omogenea che utilizza il trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza tra un fluoroforo donatore e uno accettore che si trovano in stretta prossimità (Mathis, et al.. Clin Chem 41(9):1391-7 (1995)). Questo saggio può essere usato per misurare le interazioni macromolecolari accoppiando

direttamente o indirettamente una delle molecole di interesse a un fluoroforo donatore, criptato di europio (Eu³⁺) e accoppiando l'altra molecola di interesse a un fluoroforo accettore, XL665 (un'allofococianina reticolata stabile). L'eccitazione della molecola di criptato (a 337 nm) ha determinato l'emissione di fluorescenza a 620 nm. L'energia di questa emissione è stata trasferita a XL665 in stretta prossimità del criptato, determinando l'emissione di una fluorescenza specifica a lunga durata (a 665 nm) dall'XL665. Sono stati misurati i segnali specifici sia del donatore (a 620 nm) sia dell'accettore (a 665 nm), consentendo il calcolo di un rapporto di 665/620 nm che compensa la presenza di composti colorati nel saggio.

Campioni di scFv di anti-IL-33 non purificati sono stati provati per l'inibizione del legame di IL-33 con tag FLAG®-His a ST2-Fc aggiungendo 10 microlitri di ciascuna diluizione del campione di prova di anticorpo a una piastra di saggio a basso volume da 384 pozzetti (Costar, 3676). Successivamente, è stata preparata una soluzione contenente 2 nM di ST2-Fc umano o di topo e 3 nM di rilevamento di criptato Fc anti-umano (Cisbio International, 61HFCKLB) e 5 microlitri della miscela sono stati aggiunti alla piastra di saggio. A ciò è seguita l'addizione di 5 microlitri di una soluzione contenente 1,2 nM di IL-33 umana, di cynomolgus o di topo con tag FLAG®-His combinata con 20 nM di rilevamento di XL665 anti-FLAG® (Cisbio International, 61FG2XLB). Tutte le diluizioni sono state eseguite in un tampone di saggio contenente 0,8 M di fluoruro di potassio (BDH 103444T) e

albumina sierica bovina allo 0,1% (BSA, Sigma A9576) in PBS di Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Le piastre di saggio sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente seguita da 16 ore a 4 °C prima della lettura di fluorescenza a risoluzione temporale a lunghezze d'onda di emissione di 620 nm e 665 nm usando un lettore di piastre EnVision (Perkin Elmer).

I dati sono stati analizzati calcolando il rapporto di 665/620 nm seguito dai valori Delta F in % per ciascun campione. Il rapporto di 665/620 nm è stato usato per correggere l'interferenza del campione usando l'Equazione 1:

$$\text{665/620 nm ratio} = \left(\frac{665 \text{ nm signal}}{620 \text{ nm signal}} \right) \times 10,000$$

"665/620 nm ratio" = rapporto di 665/620 nm

" nm signal" = *segnale nm*

Il Delta F in % per ciascun campione è stato quindi calcolato usando l'Equazione 2:

$$\text{Delta F (\%)} = \left(\frac{\text{sample 665/620 nm ratio} - \text{negative control 665/620 nm ratio}}{\text{negative control 665/620 nm ratio}} \right) \times 100$$

"Delta F" = Delta F

"sample 665/620 nm ratio" = rapporto di campione di 665/620 nm

"negative control 665/620 nm ratio" = rapporto di controllo negativo di 665/620 nm

Il controllo negativo (legame aspecifico) è stato definito sostituendo il campione di prova con 150 nM di IL-33 umana o di topo (Axxora, ALX522-098 umano, ALX-522-101 di topo) priva di tag

preparata in un tampone di diluizione composto da PBS di Dulbecco (Invitrogen, 14190185) contenente albumina di siero bovino allo 0,1% (BSA, Sigma A9576).

I valori Delta F in % sono stati successivamente usati per calcolare il legame specifico in % come descritto nell'Equazione 3:

$$\% \text{ specific binding} = \left(\frac{(\text{Sample DeltaF\%} - \text{NSB DeltaF\%})}{(\text{Total binding DeltaF\%} - \text{NSB DeltaF\%})} \right) \times 100$$

"% specific binding" = specificità di legame in %

"Sample DeltaF%" = Delta F% di campione

"NSB DeltaF%" = Delta F% di NSB

"Total binding DeltaF%" = Delta F% di legame totale

Valori di IC₅₀ sono stati determinati usando il software GraphPad Prism mediante adattamento della curva usando un'equazione logistica a quattro parametri (Equazione 4).

Equation 4:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

"Bottom" = Inferiore

"Top" = Superiore

"HillSlope" = Pendenza di Hill

X è il logaritmo di concentrazione.

Y è un legame specifico

Y inizia in basso e va in alto con una forma sigmoidea.

La **Figura 1** mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotta dal legame di IL-33 umana a ST2 umano, mediante estratti periplasmici di scFv non purificati in uno schermo a punto singolo. La concentrazione finale dell'estratto periplasmatico era del 50% v/v. Il pozzetto B04 (scFv

di IL330004 non purificato) mostra un "hit" esemplificativo e la colonna 12 contiene pozzetti di controllo come indicato.

Inibizione di legame di IL-33 a ST2 mediante scFv purificato

I cloni Fv a catena singola che hanno mostrato un effetto inibitorio sull'interazione IL-33:ST2 come estratti periplasmici non purificati o hanno dimostrato una reattività crociata e un profilo di specificità delle specie desiderabili mediante gli esperimenti di legame fagici di cui sopra, sono stati sottoposti a sequenziamento del DNA (Osborn, et al. Immunotechnology 2(3):181-96 (1996); Vaughan, et al. Nat Biotechnol 14(3):309-14 (1996).). Gli scFv unici sono stati espressi di nuovo nei batteri e purificati mediante cromatografia per affinità (come descritto in WO01/66754). Le potenze di questi campioni sono state determinate mediante competizione con una serie di diluizioni della preparazione purificata contro ST2.Fc umano o di topo per il legame a IL-33 umana, di cynomolgus o di topo con tag FLAG®His come descritto sopra. Preparazioni di scFv purificato che erano in grado di inibire l'interazione IL-33:ST2 in misura maggiore rispetto al controllo negativo sono state selezionate per la conversione in formato IgG (ad esempio, anticorpi di scFv IL330002, IL330004, IL330020 e IL330071

Figura 2A: mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotta dal legame di IL-33 umana a ST2 umano con concentrazioni crescenti di anticorpi scFv di IL-33 IL330002, IL330004, IL330020 e IL330071, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è il legame specifico percentuale.

La **Figura 2B**: mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotta dal legame di IL-33 di scimmia cynomolgus a ST2 umano con concentrazioni crescenti di anticorpi scFv di IL-33 IL330002, IL330004, IL330020 e IL330071, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è il legame specifico percentuale.

Identificazione di anticorpi partner per IL330004

Gli estratti periplasmici di scFv di quei cloni che hanno dimostrato un legame positivo a IL-33 umana mediante ELISA fagico sono stati sottoposti a screening mediante saggio Octet (sistema Octet RED 384) per identificare un anticorpo che legava IL-33 contemporaneamente a IL330004. Sono stati catturati campioni puliti periprep su un biosensore NTA di nichel ed è stato eseguito il legame sequenziale di IL-33 (200 nM) seguito da IL330004 (200 nM). I biosensori sono stati rigenerati per ridurre al minimo l'uso. I sensori vengono rigenerati in glicina (10 mM, pH 1,7), neutralizzati in tampone (PBS + 1 mg/ml di BSA (0,1%) + Tween20 allo 0,02%) e ricaricati con NiSO₄ (10 mM) per reintegrare il nichel sulla superficie del biosensore. IL330425 e IL330428 sono stati identificati e convertiti in un formato di anticorpo di immunoglobulina intera G1 (IgG1).

Riformattazione di scFv in IgG1

I cloni Fv a catena singola con proprietà desiderabili dai saggi di legame IL-33:ST2, più un panel di scFv visualizzato dai fagi con specificità desiderabili mediante esperimenti di legame sono stati convertiti in un formato di anticorpo di immunoglobulina intera G1 (IgG1)

essenzialmente come descritto da Persic et al. (Gene 187 (1):9-18 (1997)) con le seguenti modificazioni. Un frammento OriP è stato incluso nei vettori di espressione per facilitare l'uso con cellule transienti CHO e per consentire la replicazione episomale. Il dominio pesante variabile (VH) è stato clonato in un vettore (pEU1.3) contenente i domini costanti a catena pesante umana e gli elementi regolatori per esprimere la catena pesante intera di IgG1 nelle cellule di mammifero. Analogamente, il dominio leggero variabile (VL) è stato clonato in un vettore (pEU4.4) per l'espressione dei domini costanti a catena leggera umana (λ) e degli elementi regolatori per esprimere la catena leggera intera di IgG nelle cellule di mammifero. Per ottenere le IgG, i vettori che esprimono IgG a catena pesante e leggera sono stati trasfettati in cellule di mammifero transienti CHO (Daramola et al. Biotechnol Prog 30(1):132-41 (2014)). Le IgG sono state espresse e secrete nel terreno. I raccolti sono stati filtrati prima della purificazione, quindi le IgG sono state purificate usando la cromatografia della Proteina A. I surnatanti di coltura sono stati caricati su una colonna di dimensioni appropriate di Proteina ceramica A (BioSeptra) e lavati con 50 mM di Tris-HCl pH 8,0, 250 mM di NaCl. Le IgG legate sono state eluite dalla colonna usando 0,1 M di Citrato di sodio (pH 3,0) e neutralizzate mediante l'addizione di Tris-HCl (pH 9,0). Il materiale eluito è stato scambiato con tampone in PBS usando colonne Nap10 (Amersham, # 17-0854-02) e la concentrazione di IgG è stata determinata in modo spettrofotometrico usando un coefficiente di

estinzione basato sulla sequenza amminoacidica dell'IgG (Mach et al., Anal. Biochem. 200(1):74-80 (1992)). Le IgG purificate sono state analizzate per purezza di aggregazione e degradazione usando SEC-HPLC e SDS-PAGE. SEQ ID NO corrispondenti alle varie regioni degli anticorpi IL330002, IL330004, IL330020, IL330071, IL330125 e IL330126 sono mostrati nella **Tabella 5**.

Tabella 5. Sequenze di anticorpo Anti-IL-33

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
IL330002	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 8
			SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 9
			SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 10
IL330004	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 18
			SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 19
			SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 20
IL330020	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 28
			SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 29

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
			SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 30
IL330071	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 38
			SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 39
			SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 40
IL330125	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 48
			SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 49
			SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50
IL330126	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 58
			SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 59
			SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 60
IL330425	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
	62	67	63	68
			SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 69
			SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 70
IL330428	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 78
			SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 79
			SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 80

Inibizione di legame di IL-33 a ST2 mediante IgG purificata

La capacità degli anticorpi anti-IL-33 di inibire il legame di IL-33 con tag FLAG®-His al recettore ST2 è stata valutata in un saggio di competizione biochimico HTRF® (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International), i cui principi sono descritti sopra.

L'attività delle preparazioni di IgG purificata è stata determinata facendo competere una serie di diluizioni delle IgG purificate contro ST2.Fc umano o di tipo biotinilato per il legame a IL-33 con tag FLAG®His umana, di cynomolgus o di topo.

Campioni di anticorpi anti-IL-33 purificati o non purificati sono stati provati per l'inibizione del legame di IL-33 con tag FLAG®-His a ST2-Fc aggiungendo 10 microlitri di ciascuna diluizione del campione di prova di anticorpo a una piastra di saggio a basso volume da 384 pozzetti (Costar 3676). Successivamente, è stata preparata una soluzione contenente 4 nM di ST2-Fc umano o di topo biotinilato e 20 nM di rilevamento XL665 di streptavidina (Cisbio International, 611SAXLB) e 5 microlitri della miscela sono stati aggiunti alla piastra di saggio. A ciò è seguita l'addizione di 5 microlitri di una soluzione contenente 1,2 nM di IL-33 con tag FLAG®-His umana, di cynomolgus o di topo combinata con 1,72 nM di rilevamento del criptato anti-FLAG® (Cisbio International, 61FG2KLB). Tutte le diluizioni sono state eseguite in un tampone di saggio composto da PBS di Dulbecco (Invitrogen, 14190185) contenente 0,8 M di fluoruro di potassio (BDH 103444T) e BSA allo 0,1% (Sigma A9576). Le piastre di saggio sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente seguita da 16 ore a 4 °C prima della lettura di fluorescenza a risoluzione temporale a lunghezze d'onda di emissione di 620 nm e 665 nm usando un lettore di piastre EnVision (Perkin Elmer).

I dati sono stati analizzati come descritto sopra usando le Equazioni da 1 a 3.

Il controllo negativo (legame aspecifico) è stato definito sostituendo il campione di prova con 100 nM di ST2 non biotinilato preparato in un tampone di diluizione composto da PBS di Dulbecco

(Invitrogen, 14190185) contenente albumina di siero bovino allo 0,1% (BSA, Sigma A9576).

Le potenze rappresentative (IC_{50}) per gli anticorpi di IgG purificata IL330002, IL330004, IL330020, IL330071, IL330125 e IL330126 sono mostrate nella **Tabella 6**.

Tabella 6: Risultati di IC_{50} nel saggio di competizione IL-33

FLAG®-His/ST2-Fc

IgG	IL-33 FLAG® umana + ST2-Fc umano	IL-33 FLAG® di Cynomolgus + ST2-Fc umano
IL330002	27nM	42nM
IL330004	9nM	170nM
IL330020	40nM	Nessuna inibizione
IL330071	59nM	375nM
IL330125	210nM	Nessuna inibizione
IL330126	226nM	Nessuna inibizione

È stato dimostrato che tutte le preparazioni di IgG purificata (vale a dire, IL330002, IL330004, IL330020, IL330071, IL330125 e IL330126) inibiscono l'interazione IL-33 umana:ST2 umano. La **Figura 3A**: mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotta dal legame di IL-33 umana a ST2 umano con concentrazioni crescenti di anticorpi IgG1 di IL-33 IL330002, IL330004, IL330020, IL330071, IL330125 e IL330126,

in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è il legame specifico percentuale.

È stato inoltre mostrato che le preparazioni di IgG IL330002, IL330004 e IL330071 inibiscono l'interazione di IL-33 di cynomolgus:ST2 umano. La **Figura 3B**: mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotta dal legame di IL-33 di scimmia cynomolgus a ST2 umano con concentrazioni crescenti di IgG di anticorpi IL-33 IL330002, IL330004, IL330020 e IL330071, IL330125 e IL330126, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è un legame specifico percentuale. Nessuna inibizione è stata rilevata nel saggio di competizione IL-33 FLAG®-His + ST2-Fc di topo da parte di nessuno degli anticorpi provati sopra.

Inibizione della segnalazione di NFκB nelle cellule reporter Hela-ST2 da parte di IgG

Un saggio reporter è stato usato per valutare l'inibizione della segnalazione di NFκB indotta da IL-33 da parte di anticorpi anti-IL-33 IL330002, IL330004, IL330020, IL330071, IL330125 e IL330126, usando cellule Hela co-trasfettate con ST2 e un costrutto reporter di luciferasi reattivo a NFκB. Le cellule sono state esposte a IL-33 in presenza o in assenza di anticorpi di prova e la segnalazione di NFκB è stata rilevata misurando l'attività della luciferasi prodotta successivamente. Le cellule Hela contenenti il costrutto reporter della luciferasi sono state ottenute da Panomics. La sequenza di ST2 umano è stata clonata in un vettore lentivirale di System Biosciences. Particelle

lentivirali sono state generate in cellule Ad293 (Stratagene) e usate per trasdurre le cellule reporter Hela-luciferasi.

Nel saggio reporter, la stimolazione del recettore ST2 con IL-33 ha determinato l'attivazione della via di segnalazione di NFκB e, attraverso il promotore NFκB, ha avviato l'espressione dell'enzima luciferasi. A seguito di lisi delle cellule, è stato aggiunto un substrato di luciferasi, che ha subito una reazione chimica in presenza di luciferasi per produrre un prodotto luminescente. La quantità di luce rilevata dal lisato cellulare è stata quantificata usando un lettore di piastre Envision (PerkinElmer) e usata come una misura diretta della segnalazione di NFκB mediata da IL-33.

Le cellule trasfettate Hela sono state mantenute in terreni contenenti igromicina B per mantenere stabile l'espressione del recettore. Le cellule sono state esposte a IL-33 in presenza o assenza di anticorpi di prova e la segnalazione di NFκB è stata rilevata misurando l'attività della luciferasi prodotta successivamente.

Le cellule Hela trasfettate sono state seminate a 1×10^4 cellule/pozzetto (50 microlitri per pozzetto) in terreno di coltura DMEM (Invitrogen, 41966) contenente Siero bovino fetale al 10% v/v (inattivato al calore) e 100 microgrammi per mL di Igromicina B (Invitrogen 10687-010) in piastre rivestite di Poli-D-lisina con pareti nere da 384 pozzetti (Greiner, 781946). Le piastre sono state incubate a 37 gradi Celsius, con CO₂ al 5% per 18-24 ore, e quindi il terreno cellulare è stato

aspirato delicatamente dai pozzetti prima dell'addizione dei campioni di prova.

Le diluizioni seriali dei campioni sono state preparate mediante diluizione in terreno di coltura DMEM (Invitrogen 41966) contenente FBS al 10% v/v (inattivato al calore) e 100 microgrammi per mL di Igromicina B (Invitrogen, 10687-010). Quindici microlitri di campione di prova sono stati aggiunti alle cellule in duplicato. IL-33 FLAG®-His è stata diluita in 0,6 nM in terreno di coltura DMEM (Invitrogen, 41966) contenente FBS al 10% v/v (inattivato al calore) e 100 microgrammi per mL di Igromicina B (Invitrogen 10687-010) e 15 microlitri aggiunti alle cellule e ai campioni di prova. Questa concentrazione rappresentava il valore EC₅₀ della risposta della cellula reporter a IL-33 FLAG®-His (0,32 nM di Geomean, intervalli di confidenza al 95% 0,25-0,40 nM, n = 5). La risposta di fondo è stata definita mediante l'addizione di 30 microlitri di terreno di coltura DMEM (Invitrogen, 41966) contenente FBS al 10% v/v (inattivato al calore) e 100 microgrammi per mL di Igromicina B (Invitrogen, 10687-010). Le piastre sono state incubate a 37 gradi Celsius, con CO₂ al 5% per 4 ore e a temperatura ambiente per 1 ora.

Per misurare la produzione di luciferasi in risposta alla segnalazione di NFκB, 30 microlitri di tampone di lisi Bright Glo® combinato con substrato di luciferasi (Promega, E2620) sono stati aggiunti alla piastra e incubati a temperatura ambiente per 5 minuti. La luminescenza prodotta come risultato dell'ossidazione del substrato

mediante luciferasi viene letta usando un lettore di piastre EnVision (PerkinElmer).

I valori dell'unità relativa della luce (RLU) sono stati successivamente usati per calcolare la risposta specifica in % come descritto nell'equazione 5:

$$\% \text{ specific response} = \left(\frac{(\text{Sample RLU} - \text{BackgroundRLU})}{(\text{Total RLU} - \text{BackgroundRLU})} \right) \times 100$$

"% specific response" = risposta specifica in %

"Sample RLU" = RLU campione

"BackgroundRLU" = RLU di sfondo

"Total RLU" = RLU totale

I valori IC₅₀ sono stati determinati usando il software GraphPad Prism mediante adattamento della curva usando un'equazione logistica a quattro parametri (Equazione 4):

È stato mostrato che le preparazioni di IgG purificata di anticorpi IL330002, IL330004, IL330020, IL330071, IL330125 e IL330126 inibiscono l'attività della luciferasi guidata da NFκB con potenze rappresentative (IC₅₀) mostrate nella **Tabella 7**.

Tabella 7: Risultati di IC₅₀ nel saggio reporter di NFκB con HeLa trasfettate da ST2 umano

IgG	IL-33 FLAG®-His umana
IL330002	226nM
IL330004	23nM
IL330020	147nM

IgG	IL-33 FLAG®-His umana
IL330125	332nM
IL330126	245nM
IL330071	226nM

La **Figure 4A** mostra l'inibizione dell'attività di NFκB nel saggio reporter della luciferasi di NFκB da parte degli anticorpi IL-33 IL330002, IL330004 IL330020, IL330071, IL330125 e IL330126 rispetto a un'IgG di controllo negativo.

Inibizione della segnalazione di NFκB in Huvec da parte di IgG

La segnalazione di NFκB nelle Cellule endoteliali della vena ombelicale umana (Huvec) in risposta a IL-33 è stata valutata mediante traslocazione nucleare della sottounità di NFκB p65/RelA rilevata mediante colorazione di immunofluorescenza. La formazione di immagini e la quantificazione dell'intensità di colorazione nucleare sono state eseguite su ArrayScan VTi HCS Reader (Cellomics).

Le Huvec sono state ottenute da Cambrex e mantenute in un terreno EBM-2 completo (Lonza) secondo il protocollo raccomandato. Le Huvec sono state raccolte da beute con accutasi (PAA, # L11-007) e seminate a 1×10^4 /100 µl/pozzetto in terreni di coltura [EBM-2 (Lonza, # CC-3156) con Kit Suppl. EGM-2 SingleQuot e fattori di crescita (Lonza, # CC-4176)] in piastre rivestite di Collagene I a fondo piatto trasparente

con pareti nere da 96 pozzetti (Greiner) e incubate a 37 °C, con CO₂ al 5% per 18-24 ore. Trascorso questo tempo, il terreno è stato aspirato, lasciando intatto il monostrato cellulare, e sostituito con campioni di saggio come preparati di seguito.

Campioni di prova di IgG purificata (in duplicato) sono stati diluiti alla concentrazione desiderata in terreni di coltura completi in piastre di polipropilene con fondo a U da 96 pozzetti (Greiner, 650201). IL-33 (Adipogen) è stata preparata in un terreno di coltura completo miscelato con un anticorpo di prova appropriato per dare una concentrazione finale di IL-33 di 1 ng/mL in un volume totale di 120 µl/pozzetto. Tutti i campioni sono stati incubati per 30 minuti a 37 °C, prima del trasferimento di 100 µl di miscela IL-33/anticorpo alla piastra di saggio. In seguito a 30 minuti di incubazione a 37 °C, i terreni sono stati aspirati, lasciando intatto il monostrato cellulare e le cellule sono state fissate per 15 minuti con una soluzione di formaldeide al 3,7% che era stata preriscaldata a 37 °C. Il fissativo è stato aspirato e le cellule sono state lavate due volte con 100 µl/pozzetto di PBS.

Le cellule sono state colorate per NFκB usando un kit di saggio di NFκB Cellomics (Thermo Scientific, # 8400492) secondo le istruzioni del fabbricatore. In breve, le cellule sono state permeabilizzate per 15 minuti a temperatura ambiente, bloccate per 15 minuti e colorate per 1 ora con una soluzione di anticorpo primario in un volume di 50 µl. Le piastre sono state lavate 2 volte in tampone bloccante e colorate per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione di anticorpo secondario,

che includeva la colorazione nucleare di Hoechst nonché l'anticorpo secondario. Le piastre sono state lavate 2 volte in PBS. Le cellule sono state conservate in un volume finale di 150 µl/pozzetto di PBS e coperte con un sigillo nero bloccante la luce (Perkin Elmer, # 6005189) prima della lettura su ArrayScan VTi HCS Reader. L'intensità della colorazione nucleare è stata calcolata usando un algoritmo idoneo. I dati sono stati analizzati usando il software Graphpad Prism. I valori IC₅₀ sono stati determinati mediante adattamento della curva usando un'equazione logistica a quattro parametri (Equazione 4).

La **Figura 4B** mostra l'inibizione dell'attività di NFκB nel saggio di traslocazione di NFκB di Huvec da parte dell'anticorpo IL-33 IL330004 rispetto all'anticorpo di controllo negativo di IgG1 Anti-NIP, NIP228. La traslocazione nucleare di p65/RelA NFκB è stata inibita dall'anticorpo IL330004. Quando provata come IgG purificata, l'IC₅₀ per l'anticorpo IL330004 è stata calcolata come pari a 12 nM.

Calcolo dell'affinità di legame per gli anticorpi IL-33 usando BIAcore

L'affinità di legame di campioni di IgG purificata di membri di legame esemplificativi a IL-33 umana e di cynomolgus è stata determinata mediante risonanza plasmonica di superficie usando il biosensore BIAcore 2000 (BIAcore AB) essenzialmente come descritto da Karlsson et al., J Immunol Methods 145(1-2):229-40 (1991). In breve, la proteina G' (Sigma Aldrich, P4689) è stata accoppiata in modo covalente alla superficie di un chip sensore CM5 usando reagenti di

accoppiamento amminico standard secondo le istruzioni del fabbricatore (BIAcore). La superficie della proteina G' è stata usata per catturare anticorpi anti-IL-33 purificati tramite il dominio Fc per fornire una densità di superficie di approssimativamente 290 RU per ciclo. Sulla superficie del chip del sensore è stata fatta passare IL-33 umana o di cynomolgus preparata in tampone HBS-EP (BIAcore AB), in un intervallo di concentrazioni, tra 600 nM e 18,75 nM. La superficie è stata rigenerata usando due lavaggi di Glicina da 10 mM con pH 1,7 e pH 1,5 tra ciascuna iniezione di anticorpo. I sensorgrammi risultanti sono stati valutati usando il software di valutazione 3.1 BIA e adattati a un modello di legame Langmuir 1:1, per fornire dati di legame relativi. I risultati di legame (K_D , K_a e K_d) per il legame degli anticorpi IL330002 e IL330004 a IL-33 umana o di cynomolgus sono mostrati nella **Tabella 8**.

Tabella 8: Affinità di legame BIAcore di membri di associazione esemplificativi

Anticorpo	Antigene	K_D (nM)	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)
IL330002	IL-33 FLAG®-His umana	35	6,16E+04	2,18E-03
IL330002	IL-33 FLAG®-His di Cynomolgus	189	2,34E+04	4,42E-03
IL330004	IL-33 FLAG®-His umana	6	1,96E+05	1,10E-03

Anticorpo	Antigene	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
IL330004	IL-33 FLAG®-His Cynomolgus	di 365	1,25E+04	4,58E-03

Legame di anticorpi IL-33 a IL-33 intracellulare

Gli studi di selezione e attività descritti sopra hanno usato fonti ricombinanti o commerciali di IL-33 matura (amminoacidi 112-270). Gli studi suggeriscono che anche IL-33 a lunghezza intera può essere attiva (Cayrol et al., Proc Natl Acad Sci STATI UNITI 106(22):9021-6 (2009); Hayakawa et al., Biochem Biophys Res Commun 387(1):218-22 (2009); Talabot-Ayer et al., J Biol Chem. 284(29):19420-6 (2009)). Il legame degli anticorpi a IL-33 a lunghezza intera ("nativa") è stato determinato mediante colorazione con immunofluorescenza delle cellule muscolari lisce bronchiali primarie (BSMC).

Le BSMC sono state ottenute da Cambrex e mantenute in terreni di crescita muscolari lisci completi (SmBM®, Lonza) secondo le istruzioni del fabbricatore. Le cellule sono state raccolte da beute con accutasi (PAA # L11-007) e seminate a 2×10^4 /100 µl/pozzetto in terreni di coltura [SMBM (Lonza # CC-3181) con Kit Suppl. SMGM SingleQuot e fattori di crescita (Lonza # CC-4149)] in piastre rivestite di Collagene I a fondo piatto trasparente con pareti nere da 96 pozzetti (Greiner) e incubate a 37 °C, con CO₂ al 5% per 18-24 ore. Trascorso questo tempo, i terreni sono stati aspirati, lasciando intatto il monostrato

cellulare e le cellule sono state fissate per 15 minuti con una soluzione di formaldeide al 3,7% che era stata preriscaldata a 37 °C. Il fissativo è stato aspirato e le cellule sono state lavate due volte con 100 µl/pozzetto di PBS. Le cellule sono state permeabilizzate per 15 minuti a temperatura ambiente usando il tampone di permeabilizzazione (Thermo Scientific, # 8400492), lavate 2 volte in PBS e bloccate con 100 µL/pozzetto di PBS/BSA all'1% (Sigma, # A9576) per 30-60 minuti a temperatura ambiente. Il tampone bloccante è stato espulso e sostituito con una titolazione di anticorpi anti-IL-33 o di controllo isotipo idonei, che erano stati diluiti in tampone bloccante, per 1 ora a temperatura ambiente.

Le piastre sono state lavate 2 volte in PBS e colorate per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione di anticorpo secondario, che includeva il colorante Hoechst (10 mg/mL; Thermo Scientific) diluito 1:10000 nonché l'anticorpo secondario (IgG Anti-umana (H+L), 2 mg/mL di coniugato Alexa Fluor® 488; Invitrogen, # A11013) diluito 1:1000. Le piastre sono state lavate tre volte in PBS. Le cellule sono state conservate in un volume finale di 150 µl/pozzetto di PBS e coperte con un sigillo nero bloccante la luce (Perkin Elmer, # 6005189) prima della formazione di immagini su ArrayScan VTi HCS Reader.

L'espressione di IL-33 mediante BSMC in coltura è stata confermata con un anticorpo policlonale commerciale (R&D Systems, # AF3625), rilevato con IgG anti-capra (H+L), 2 mg/mL di coniugato Alexa Fluor® 488; Invitrogen, # A11055). La **Figura 5** mostra il rilevamento di

IL-33 endogena in cellule muscolari lisce bronchiali mediante colorazione di immunofluorescenza con l'anticorpo IL-33 IL330004 (riquadro di destra) rispetto al controllo negativo CAT-002 (riquadro di sinistra). L'anticorpo IL330004 ha mostrato una chiara colorazione nucleare di BSMC, corrispondente alla localizzazione prevista di IL-33 a lunghezza intera, e quella rilevata con il pAb commerciale.

Esempio 2 Isolamento e identificazione di anticorpi di scFv anti-IL-33

Identificazione di leganti specifici a IL-33 mediante ELISA fagico

I reagenti e le selezioni erano come descritti nell'Esempio 1. I frammenti Fv a catena singola sono stati visualizzati su particelle fagiche e provati come preparazioni non purificate in uno schermo ELISA a punto singolo. Si è ritenuto che gli scFv visualizzati dai fagi legassero l'antigene IL-33 se l'assorbanza di 450 nm era $> 0,5$ e $< 0,1-0,2$ per lo stesso campione sui controlli (insulina e IL-4R α Flag®His).

La **Figura 6** mostra i dati di una singola piastra sottoposta a screening contro IL-33 umana, IL-33 di cynomolgus e insulina. Un legante di IL-33 umana/cynomolgus reattivo in modo crociato specifico è mostrato nel pozzetto C4, e i pozzetti A12 e B12 contengono il clone di legame a IL-33 di controllo.

Identificazione di leganti IL-33 mediante competizione di IL33305B Axxora

Il Saggio di competizione di IL33305B Axxora è un saggio omogeneo che utilizza la Tecnologia di saggio microvolumetrico di fluorescenza (FMAT). Il saggio ha valutato l'inibizione di legame di mAb IL33305B Axxora (Axxora/Adipogen, # AG-20A-0041-C050) a IL-33 Flag®His umana biotinilata ricombinante in presenza di campioni di surnatante scFv grezzo o scFv purificato e IgG in un formato da 384 pozzetti.

Gli ScFv sono stati espressi nel periplasma batterico e sottoposti a screening per la loro attività inibitoria in un saggio di competizione di epitopo FMAT contro un mAb IL33305B biologicamente attivo noto. IL-33 biotinilata è stata immobilizzata su biglie rivestite di streptavidina (Spherotec, # SVP-60-5) e l'interazione con Ab IL33305B Axxora è stata rilevata usando un anticorpo etichettato Alexafluor®-647 di capra anti-topo (Molecular Probes A21236). Il sistema FMAT è un dispositivo di formazione di immagini macroscopiche confocale, che misura la fluorescenza rossa associata alle biglie.

Le piastre sono state lette sul lettore del sistema di rilevamento cellulare 8200 di Applied Biosystems. Il laser di eccitazione al neon di elio si concentra entro una profondità di 100 µm dal fondo del pozzetto scansionando un'area di 1 mm². Le biglie si depositano sul fondo del pozzetto e all'eccitazione laser a 633 nm quelle biglie con fluoroforo legato (dove la concentrazione locale di fluoroforo è relativamente alta rispetto al fluoroforo non legato) emettono un segnale a 650-685 nm che viene misurato usando PMT1. Il fluoroforo non legato in soluzione è

al di fuori della profondità di eccitazione o a una concentrazione locale relativamente bassa e quindi non emette un segnale significativo. I campioni di ScFv o IgG che bloccano efficacemente il legame di IL33305B a IL-33 provocheranno pertanto una riduzione della quantità di biglie:IL-33:IL33305B:complessi di anticorpi etichettati Alexafluor®-647 anti-topo sul fondo del pozzetto che determina una riduzione della fluorescenza misurata.

Per l'impostazione del saggio, sono stati preparati i seguenti:

(1) miscela di IL33305B e anti-topo AF647, IL33305B è stata diluita in 2,25 nM in tampone di saggio [PBS (Gibco, 14190-094) contenente BSA allo 0,1% (Sigma, # A9576) e Tween-20 allo 0,1% (Sigma, P2287)] e miscelata con anti-topo AF647 diluito in 2µ/ml (400 ng/ml finali) in tampone di saggio.

(2) miscela di IL-33 e biglie, 2,5 nM di IL-33 FLAG®His umana biotinilata sono stati aggiunti a biglie di streptavidina allo 0,0095% p/v in un tampone di saggio e incubati con rotazione a temperatura ambiente per 1 ora, prima dell'uso queste particelle sono state centrifugate a 2000 giri/minuto per 15 minuti e risospese nel tampone di saggio del volume originale.

(3) Preparazione del campione, campioni di surnatante di scFv grezzo sono stati generati in piastre da 96 pozzetti profondi. 5 µl di coltura da ciascun pozzetto di una piastra master da 96 pozzetti sono stati trasferiti in una piastra di coltura a pozzetti profondi Greiner contenente 900 µl di 2TY + 100 µg/ml di ampicillina + glucosio allo 0,1%

e incubati per 5 ore a 37 °C, a 280 giri/minuto. 10 mM di IPTG in TY sono stati quindi aggiunti a 100 µl/pozzetto e la piastra incubata per una notte a 30 °C, a 280 giri/minuto. La mattina successiva, la piastra è stata centrifugata a 3200 giri/minuto per 15 minuti. Per lo screening ad alta produttività, surnatanti di scFv dalla piastra a pozzetti profondi sono stati trasferiti direttamente alla piastra di saggio per conseguire una concentrazione finale del 20%.

Per le determinazioni di IC₅₀, scFv o IgG tipicamente purificati sono stati diluiti 3 volte nel tampone di saggio, in duplicato, per dare 11 punti di concentrazione. Per la preparazione della diluizione vengono usate piastre Greiner in polipropilene (Greiner, 650201) da 96 pozzetti.

Nelle colonne 1-22 di una piastra nera di superficie non legante con fondo trasparente da 384 pozzetti (Costar, # 3655), sono stati aggiunti i seguenti: 10 µl di campione, 20 µl di miscela IL33305B/anti-topo AF647 e 20 µl di miscela IL-33/biglie. In tutti i casi, il volume totale del pozzetto era di 40 µl. I controlli tipicamente usati in questi esperimenti includevano: la miscela IL-33/biglie più è stato aggiunto AF647 anti-topo (legame aspecifico); miscela IL33305B/anti-topo AF647 più miscela IL-33/biglie (legame totale). Le piastre sono state sigillate e incubate per quattro ore a temperatura ambiente al buio e quindi lette sul lettore del sistema di Rilevamento cellulare 8200 di Applied Biosystems. I dati sono stati analizzati con l'algoritmo Velocity, con gating impostato come rapporto di colore <0,4, dimensione <15 e conteggio minuti 20. I riscontri ottenuti dai campioni grezzi di surnatante

di scFv sono stati definiti come un'inibizione di segnale del 50% o superiore rispetto ai pozzetti di controllo di legame totale. Le curve di risposta alla dose sono state tracciate per le titolazioni di scFv e IgG purificate usando il software di adattamento della curva Prism (Graphpad).

Riformattazione di scFv in IgG1

Gli scFv che mostravano una reattività crociata della specie desiderabile e un profilo di specificità come determinato mediante esperimenti di legame di scFv visualizzati dai fagi o mostravano un effetto inibitorio nel saggio di competizione di epitopo contro IL33305B Axxora (come descritto sopra), sono stati sottoposti a sequenziamento del DNA (Osbourn et al., Immunotechnology 2(3):181-96 (1996); Vaughan et al., Nat. Biotechnol. 14(3):309-14 (1996)). In primo luogo, scFv con proprietà desiderabili sono stati convertiti in immunoglobulina intera G1 (IgG1), o un isotipo con effetto-nullo TM IgG1 (sequenza Fc IgG1 che incorpora mutazioni L234F, L235E e P331S), in formato anticorpo come descritto nell'Esempio 1. SEQ ID NO corrispondenti alle varie regioni degli anticorpi IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180 sono mostrati nella **Tabella 9**.

Tabella 9. Sequenze di anticorpo Anti-IL-33

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
IL330065	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 88

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
			SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 89
			SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 90
IL330099	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 98
			SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 99
			SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 100
IL330101	SEQ ID NO: 102	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 103	SEQ ID NO: 108
			SEQ ID NO: 104	SEQ ID NO: 109
			SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 110
IL330107	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 123	SEQ ID NO: 128
			SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 129

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
			SEQ ID NO: 125	SEQ ID NO: 130
IL330149	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 133	SEQ ID NO: 138
			SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 139
			SEQ ID NO: 135	SEQ ID NO: 140
IL330180	SEQ ID NO: 142	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 143	SEQ ID NO: 148
			SEQ ID NO: 144	SEQ ID NO: 149
			SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 150

Saggio di legame per IgG

La reattività crociata delle specie degli anticorpi anti-IL-33 è stata determinata usando un ELISA basato su piastra. Le piastre di streptavidina (Thermo Scientific, AB-1226) sono state rivestite con antigene biotinilato a 0,5 µg/ml in PBS. Il legame delle preparazioni di

IgG purificata è stato rilevato con HRP anti-IgG umana (Sigma, A0170).

I dati EC50 per le curve di legame sono mostrati nella **Tabella 10**.

Tabella 10: Legame di anticorpi IL-33 a IL-33 con tag Flag®His umana, di cynomolgus o di topo

Anticorpo	EC50 (nM)		
	IL-33 Flag®His umana	IL-33 Flag®His di Cynomolgus	IL-33 Flag®His di topo
IL330065	0,65	0,66	Assenza di legame
IL330099	0,40	0,35	0,38
IL330101	1,19	1,20	0,85
IL330107	0,86	1,09	0,83
IL330149	0,23	0,35	0,17
IL330180	Non determinato*	Non determinato*	Non determinato*
È stato determinato che IL330180 si legava a IL-33 umana, ma non a IL-33 di Cynomolgus o di topo in formato scFv visualizzato da fagi.			

Inibizione delle risposte funzionali di IL-33 da parte degli anticorpi anti-IL-33

Inibizione della proliferazione cellulare TF-1 da parte di IgG

Un saggio di vitalità cellulare è stato usato per valutare l'inibizione della proliferazione/sopravvivenza indotta da IL-33 da cellule

TF-1 da parte di anticorpi anti-IL-33. Il Saggio di vitalità cellulare luminescente CellTiter-Glo® (Promega) è un metodo omogeneo per determinare il numero di cellule vitali in coltura basato sulla quantificazione dell'ATP presente, che segnala la presenza di cellule metabolicamente attive. Le cellule sono state esposte a IL-33 in presenza o in assenza di anticorpo di prova. La vitalità cellulare è stata misurata mediante CellTiter-Glo in seguito a 72 ore di stimolazione con IL-33.

In particolare, il saggio di proliferazione è stato usato per valutare l'inibizione della proliferazione indotta da IL-33 da cellule TF-1 da parte di anticorpi anti-IL-33. Le cellule TF-1 erano una donazione di R&D Systems e mantenute secondo le istruzioni del fabbricatore. Il terreno del saggio comprendeva RPMI-1640 con GLUTAMAX I (Invitrogen, 61870) contenente siero bovino fetale al 5% (inattivato al calore, gamma-irradiato), piruvato di sodio all'1% (Sigma, S8636), Penicillina/streptomicina all'1-2% (Invitrogen, 15140-122). Prima di ciascun saggio, le cellule TF-1 sono state pellettizzate mediante centrifugazione a 300xg per 5 minuti, i terreni sono stati rimossi mediante aspirazione e le cellule sono state quindi risospese in terreni di saggio. Questo processo è stato ripetuto due volte con le cellule risospese a una concentrazione finale di 2×10^5 cellule/ml nei terreni di saggio. Le soluzioni di prova di IgG (in duplicato) sono state titolate all'intervallo di concentrazione desiderato nei terreni di saggio in piastre di polipropilene con fondo a U da 96 pozzetti (Greiner, 650201) e 50 µl

trasferiti in piastre trattate con coltura tissutale a fondo piatto da 96 pozzetti (Costar, #3598). IL-33 umana ricombinante (Alexis, ALX-522-098-3010) è stata aggiunta alle titolazioni anticorpali di prova appropriate per dare un volume totale di 100 µl/pozzetto. 100 µl di sospensione cellulare sono stati quindi aggiunti a 100 µl di IL-33 o miscela di IL-33 e anticorpo per dare un volume di saggio totale di 200 µl/pozzetto e un numero totale di cellule pari a 20.000 per pozzetto. Nel saggio è stata usata una concentrazione di saggio finale di 100 ng/mL di IL-33, che è stata selezionata come la dose che ha dato approssimativamente l'80% della risposta proliferativa massima. Le piastre sono state incubate per 72 ore a 37 °C e con CO₂ al 5%. 100 µl di surnatante sono stati accuratamente rimossi dalle piastre di saggio. Per pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di CellTiter-Glo (Promega, G7571), ricostituito secondo le istruzioni del fabbricatore. Le piastre sono state agitate su un agitatore per piastre a 500 giri/minuto per 5 minuti e la luminescenza è stata letta sul lettore di piastre EnVision (PerkinElmer). I dati sono stati analizzati usando il software Graphpad Prism. I valori IC₅₀ sono stati determinati mediante adattamento della curva usando un'equazione logistica a tre o quattro parametri.

Per tali anticorpi che hanno conseguito curve di inibizione complete, sono stati calcolati i valori di IC₅₀ e riepilogati nella **Tabella 11** di seguito. Le preparazioni di IgG purificata erano in grado di inibire la proliferazione di TF-1 in risposta a IL-33. La **Figura 7A** mostra l'inibizione percentuale per IL330065 e IL330101 (rispetto a mAb di

controllo e hST2/Fc) per il saggio di proliferazione TF-1, in cui l'asse x è la concentrazione dell'anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è una percentuale della risposta massima.

Inibizione del rilascio di IL-6 di Huvec da parte degli anticorpi IL-33

Un saggio di rilascio di citochine è stato usato per valutare l'inibizione della produzione di IL-6 indotta da IL-33 di cellule endoteliali della vena ombelicale umana (Huvec) da parte di anticorpi anti-IL-33. Le cellule sono state esposte a IL-33 in presenza o in assenza di anticorpo di prova.

Le Huvec sono state ottenute da Cambrex e mantenute in un terreno EBM-2 completo (Lonza) secondo il protocollo del fabbricatore. Le cellule sono state raccolte da beute con accutasi (PAA, # L11-007) e seminate a 1×10^4 /100 μ l/pozzetto in terreni di coltura [EBM-2 (Lonza, # CC-3156) con Kit Suppl. EGM-2 SingleQuot e fattori di crescita (Lonza, # CC-4176)] in piastre trattate con coltura tissutale a fondo piatto da 96 pozzetti (Costar, #3598) e incubate a 37 °C, con CO₂ al 5% per 18-24 ore. Trascorso questo tempo, il terreno è stato aspirato, lasciando intatto il monostrato cellulare, e sostituito con campioni di prova di saggio come esaminato di seguito.

Soluzioni di prova di IgG purificata (in duplicato) sono state diluite alla concentrazione desiderata in terreni di coltura completi in piastre di polipropilene con fondo a U da 96 pozzetti (Greiner, 650201). IL-33 (Adipogen) è stata preparata in un terreno di coltura completo

miscelato con un anticorpo di prova appropriato per dare una concentrazione finale di IL-33 di 30 ng/mL. Tutti i campioni sono stati incubati per 30 minuti a temperatura ambiente, prima di trasferire 120 µl di miscela IL-33/anticorpo alla piastra di saggio. In seguito a 18-24 ore di incubazione, IL-6 è stata misurata nei surnatanti cellulari mediante ELISA (R&D Systems, DY206) adattato per la lettura dell'eurobio. Le piastre nere Fluro-Nunc Maxisorp (VWR, # 437111) sono state rivestite con 50 µl di anticorpo di cattura, lavate tre volte con PBS-Tween (0,01%) usando un lavatore automatico per piastre (Biotek) e bloccate con 250 µl/pozzetto di PBS/BSA all'1% (Sigma, # A9576) per 1-2 ore a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate come sopra e incubate con 50 µl di surnatanti del saggio di mastociti per 1-2 ore a temperatura ambiente. In seguito a lavaggio effettuato 3 volte con PBS-Tween, le piastre sono state incubate con anticorpo di rilevamento (50 µl/pozzetto) secondo le istruzioni del fabbricante. Le piastre ELISA sono state lavate tre volte in PBS-Tween, e Streptavidina-Eurobio (PerkinElmer, 1244-360) sono stati diluiti 1:1000 in tampone di saggio DELFIA® (PerkinElmer, 4002-0010) e aggiunti a 50 µl/pozzetto per 45-60 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state quindi lavate 7 volte nel tampone di lavaggio DELFIA prima dell'addizione di 50 µl/pozzetto di soluzione di potenziamento (PerkinElmer, 4001-0010) e analizzate usando la fluorimetria a risoluzione temporale (Eccitazione 340 nM, Emissione 615 nM). I dati sono stati analizzati usando il software Graphpad Prism. I valori IC50 sono stati determinati mediante

adattamento della curva usando un'equazione logistica a tre o quattro parametri. Per tali anticorpi che hanno conseguito curve di inibizione complete, sono stati calcolati i valori di IC50 e riepilogati nella **Tabella 11** di seguito. Le preparazioni di IgG purificata (IgG1 o IgG1-TM) di anticorpi IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL330149 e IL330180 hanno inibito la produzione di IL-6 rispetto agli anticorpi di controllo. La potenza degli elementi di legame esemplificativi era essenzialmente inalterata dalla presenza di mutazioni della sequenza IgG1-TM Fc (L234F, L235E e P331S), e i dati come mostrato combinano le informazioni per entrambi i formati. La **Figura 7B** mostra la percentuale di rilascio massima di IL-6 per IL330065 e IL330101 (rispetto a ST2-Fc umano, anti-IL33 pAb AF3625 (R&D Systems) e mAb di controllo), in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è una percentuale della risposta massima.

Inibizione del rilascio di citochine di mastociti umani

Un saggio di rilascio di citochine è stato usato per valutare l'inibizione della produzione di IL-6 indotta da IL-33 da parte di anticorpi anti-IL-33 di mastociti umani. Oltre a IL-6, sono state misurate altre citochine (IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, GM-CSF e TNF α) in surnatanti cellulari usando ELISA duoset alternativi o analisi multiplex Mesoscale Discovery.

I mastociti umani sono stati prodotti mediante differenziazione *in vitro* di CD133 di sangue cordonale + cellule progenitrici (Lonza, #

2C-108) essenzialmente come descritto in Andersen et al. (J Immunol Methods 336:166-174 (2008)). Le cellule progenitrici sono state scongelate secondo le istruzioni del fabbricatore e coltivate *in vitro* in Terreni di espansione privi di siero (StemSpan, # 09650) integrati con Penicillina/streptomicina all'1% (Invitrogen, 15140-122) e fattori di crescita: 100 ng/mL di Fattore di cellule staminali (Peprotech, # AF-300-07) e 50 ng/mL di IL-6 (Peprotech, # AF-200-6) per 8 settimane. In aggiunta, 1 ng/mL di IL-3 (R&D Systems, # 203-IL) è stato incluso nei terreni di coltura durante le prime tre settimane. Le cellule sono state mantenute per tutto il tempo a $<5 \times 10^5$ /mL.

I mastociti sono stati coltivati per una notte in terreni di saggio (StemSpan, # 09650; Penicillina/streptomicina all'1% (Invitrogen, 15140-122) e 100 ng/mL di fattore di cellule staminali (Peprotech, # AF-300-07)), prima dell'esposizione a IL -33 in presenza o assenza di anticorpo di prova.

Per i saggi di rilascio di citochine, le cellule sono state rimosse, pellettizzate (150 g per 10 minuti) e risospese in terreni di saggio (StemSpan, # 09650, Penicillina/streptomicina all'1% (Invitrogen, 15140-122) e 100 ng/mL di Fattore di cellule staminali (Peprotech, # AF-300-07)). Le cellule sono state riportate in una beuta e coltivate per 18-24 ore prima dell'impostazione del saggio. Per la valutazione del campione, le soluzioni di prova di IgG (in duplicato) sono state titolate nell'intervallo di concentrazione desiderato nei terreni di saggio in piastre di polipropilene con fondo a U da 96 pozzetti (Greiner, 650201)

e 50 µL di soluzioni di prova trasferiti su piastre trattate con coltura tissutale a fondo piatto da 96 pozzetti (Costar, # 3598). 50 µl di IL-33 umana ricombinante (Adipogen, # 522-098-3010), diluiti in un terreno di saggio a 90 ng/mL, sono stati aggiunti alle titolazioni anticorpali appropriate per dare un volume totale di 100 µl/pozzetto. 50 µl di sospensione cellulare ($1,5 \times 10^5$) sono stati quindi aggiunti a 100 µl di IL-33 o miscela di IL-33 e anticorpo per dare un volume di saggio totale di 150 µl/pozzetto e un numero totale di cellule di 5×10^4 per pozzetto. Nel saggio è stata usata una concentrazione di saggio finale di 30 ng/mL di IL-33, selezionata come la dose che ha dato approssimativamente il 50-80% della risposta massima di citochine. Le piastre sono state incubate per 18-24 ore a 37 °C e con CO₂ al 5%.

IL-6 è stata misurata nei surnatanti cellulari mediante ELISA (R&D Systems, DY206) adattato per la lettura dell'eurobio. Le piastre nere Fluro-Nunc Maxisorp (VWR, # 437111) sono state rivestite con 50 µl di anticorpo di cattura, lavate tre volte con PBS-Tween (0,01%) usando un lavatore automatico per piastre (Biotek) e bloccate con 250 µl/pozzetto di PBS/BSA all'1% (Sigma, # A9576) per 1-2 ore a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate come sopra e incubate con 50 µL di surnatanti del saggio di mastociti per 1-2 ore a temperatura ambiente. In seguito a lavaggio effettuato 3 volte con PBS-Tween, le piastre sono state incubate con anticorpo di rilevamento (50 µL/pozzetto) secondo le istruzioni del fabbricatore. Le piastre ELISA sono state lavate tre volte in PBS-Tween, e Streptavidina-Eurobio

(PerkinElmer, 1244-360) sono stati diluiti 1:1000 in tampone di saggio DELFIA (PerkinElmer, 4002-0010) e aggiunti a 50 µl/pozzetto per 45-60 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state quindi lavate 7 volte nel tampone di lavaggio DELFIA prima dell'addizione di 50 µl/pozzetto di soluzione di potenziamento (PerkinElmer, 4001-0010) e analizzate usando la fluorometria a risoluzione temporale (Eccitazione 340 nM, Emissione 615 nM). I dati sono stati analizzati usando il software Graphpad Prism. I valori IC50 sono stati determinati mediante adattamento della curva usando un'equazione logistica a tre o quattro parametri.

La **Figura 8A** mostra la riduzione della produzione di IL-6 aumentando le concentrazioni di anticorpi IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpi in concentrazione molare e l'asse y è la % di risposta massima. Le preparazioni di IgG purificata di anticorpi di prova erano in grado di inibire l'attività di IL-6 rispetto agli anticorpi di controllo. La potenza degli elementi di legame esemplificativi era essenzialmente inalterata dalla presenza di mutazioni della sequenza IgG1-TM Fc (L234F, L235E e P331S) e i dati combinano le informazioni per entrambi i formati. I risultati di IC50 per il saggio di proliferazione TF-1, la produzione di IL-6 di HUVEC, e la produzione di IL-6 di mastociti sono mostrati nella **Tabella 11**.

Tabella 11. Potenze esemplificative di cloni identificati da librerie di visualizzazione di fagi di ScFv umano naive

Anticorpo	IgG1 Geomean (CI al 95%) IC50 (nM)		
	Proliferazione di TF-1	Produzione di IL-6 di Huvec	Produzione di IL-6 di mastociti
IL330065	81 (19-345)	87 (60-129)	12 (4-40)
IL330099	Curva incompleta	Curva incompleta	1221 (n=1)
IL330101	149 (n=1)	497 (167-1474)	49 (31-75)
IL330107	94 (n=1)	Curva incompleta	283 (154-522)
IL330149	Curva incompleta	Curva incompleta	298 (n=2)
IL330180	Non determinato	Non determinato	22 (n=1)

Ulteriori citochine (IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 e GM-CSF) nei surnatanti cellulari sono state rilevate usando il saggio di citochine umane Meso-Scale Diagnostics Demonstration 10-plex (# K15002B-1) secondo le istruzioni del fabbricatore. Le citochine sono state misurate nei surnatanti cellulari mediante ELISA adattato per la lettura dell'eurobio usando un protocollo simile all'ELISA IL-6 descritto sopra.

È stato mostrato che i mastociti producono una gamma di citochine a seguito di stimolazione con IL-33 (saggio di citochine umane Meso-Scale Diagnostics Demonstration 10-plex # K15002B-1; R&D Systems, # DY213). Le **Figure 8B-F** mostrano l'inibizione della produzione guidata da IL-33 di GM-CSF, IL10, IL-8, IL-13 e IL-5, rispettivamente. Questi risultati mostrano che gli anticorpi IL330065,

IL330101, IL330107 e IL330149 erano in grado di inibire la produzione guidata da IL-33 di tutte le citochine misurate.

Legame e neutralizzazione di IL-33 nativa a lunghezza intera

Gli studi di selezione e attività descritti sopra hanno usato fonti interne o commerciali ricombinanti di IL-33 matura (amminoacidi 112-270). Anche IL-33 a lunghezza intera può essere attiva (Cayrol et al., Proc Natl Acad Sci STATI UNITI 106(22):9021-6 (2009); Hayakawa et al., Biochem Biophys Res Commun 387(1):218-22 (2009); Talabot-Ayer et al., J Biol Chem. 284(29):19420-6 (2009)). Per valutare il legame degli anticorpi a IL-33 a lunghezza intera, IL-33 a lunghezza intera è stata clonata ed espressa nelle cellule HEK293-EBNA. Come descritto di seguito, è stato mostrato che gli anticorpi selezionati si legano a IL-33 a lunghezza intera come determinato mediante Western blot.

Clonaggio ed espressione di IL-33 umana a lunghezza intera

La molecola di cDNA codificante per IL-33 a lunghezza intera (FL) da un essere umano (numero di accesso Swiss Prot O95760 amminoacidi 1-270) è stata sintetizzata mediante clonaggio PCR di estensione del primer e clonata in pDONR221 (Invitrogen, 12536-017) ed è stata trasferita al vettore di espressione di mammifero pDEST12.2 (Invitrogen) usando l'enzima LR Gateway Clonase II secondo le istruzioni del fabbricatore (Invitrogen, 12538-120). Il vettore pDEST12.2 è stato modificato per contenere l'origine di replicazione oriP dal vettore

pCEP4 (Invitrogen) consentendo la replicazione episomale del plasmide dopo la trasfezione in linee cellulari che esprimono il prodotto del gene EBNA-1 (come le cellule HEK293-EBNA). Le cellule di HEK293-EBNA sono state trasfettate con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, 11668-019). Le cellule che esprimono HuIL-33 FL (e i controlli simulati trasfettati) sono state lisate usando la sonicazione in presenza di inibitori delle proteasi (Roche, 05892791001).

Analisi Western blot di lisati cellulari che esprimono IL-33 umana a lunghezza intera

Le proteine dei lisati cellulari sono state denaturate e ridotte con tampone campione SDS e DTT prima della separazione mediante elettroforesi SDS-PAGE e trasferimento su membrane di Nitrocellulosa. Le membrane sono state bloccate con latte disidratato non grasso al 5% in PBS-T per 1 ora, incubate con l'anticorpo primario (0,5 µg per ml) per 1 ora, lavate tre volte in PBS-T, quindi incubate per 1 ora con l'anticorpo secondario coniugato con HRP (diluizione 1 su 10.000 di IgG anti-umana di capra (Sigma, A0170)) e lavate tre volte in PBS-T. HRP è stata rilevata con ECL Amersham più reagente di rilevamento (GE healthcare, RPN2132). Le dimensioni sono state stimate confrontando la migrazione con quella di Magic Mark XP (Invitrogen, LC5602). La **Figura 9** mostra il legame degli anticorpi IL-33 (IL330065, IL330101, IL330107 e IL330149) a IL-33 umana a lunghezza intera mediante Western blot.

Neutralizzazione delle risposte delle citochine dei mastociti al lisato cellulare di IL-33 a lunghezza intera

Le cellule di HEK293-EBNA che esprimono HuIL-33 a lunghezza intera (FL) (e controlli simulati trasfettati) sono state raccolte 24 ore in seguito a trasfezione con accutasi (PAA, # L11-007). Le cellule sono state diluite a 5×10^7 /mL con PBS e omogeneizzate per 30 secondi usando un omogeneizzatore di tessuti. I detriti cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione. I mastociti sono stati stimolati con lisati cellulari a concentrazioni variabili. La stimolazione della produzione di citochine è stata osservata solo con lisato cellulare trasfettato con IL-33 a lunghezza intera e senza lisato cellulare trasfettato simulato. Una concentrazione di lisato che stimolava un rilascio sub-massimale di citochine (EC50 approssimativa) è stata selezionata per gli studi di neutralizzazione di anticorpi.

Per i saggi di rilascio di citochine, i mastociti sono stati coltivati per una notte in terreni di saggio (StemSpan, # 09650; Penicillina/streptomycin all'1% (Invitrogen, 15140-122) e 100 ng/mL di Fattore di cellule staminali (PeproTech, # AF-300-07)), prima dell'esposizione a HuIL-33 FL in presenza o assenza di anticorpo di prova. La produzione di IL-6 e IL-13 è stata rilevata mediante ELISA dei surnatanti di saggio dopo 18-24 ore. Una descrizione dettagliata del protocollo è stata fornita sopra (Esempio 2-0007).

Le **Figure 10** mostrano l'effetto degli anticorpi anti-IL-33 IL330065 e IL330101 sulla produzione di IL-6 e IL-13 di mastociti

stimolata dai lisati cellulari di cellule trasfettate con IL-33 a lunghezza intera. Le preparazioni di IgG purificata erano in grado di inibire la produzione di IL-6 (**Figura 10A**) e IL-13 (**Figura 10B**) indotta dai lisati cellulari di IL-33 a lunghezza intera.

Modalità di azione non competitiva di anticorpi IL-33

Inibizione di legame di IL-33 a ST2 mediante IgG purificata

La capacità degli anticorpi anti-IL-33 di inibire il legame di IL-33 con tag Flag®-His al recettore ST2 è stata valutata in un saggio di competizione biochimico HTRF® (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International) i cui metodi completi sono descritti nell'Esempio 1.

La **Figura 11A** mostra i risultati di legame specifico per il saggio di competizione di recettore-ligando HTRF® con concentrazioni crescenti degli anticorpi IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180. Questi risultati mostrano che gli anticorpi IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180 non sono inibitori competitivi dell'interazione IL-33:ST2.

Inibizione della segnalazione di NFκB in Huvec da parte di IgG

La segnalazione di NFκB in Huvec in risposta a IL-33 è stata valutata mediante traslocazione nucleare della sottounità di NFκB p65/RelA, rilevata mediante colorazione di immunofluorescenza come descritto nell'Esempio 1.

Le **Figure 11B** mostrano la traslocazione di NFkB di Huvec con concentrazioni crescenti degli anticorpi IL330065, IL330099, IL330101, IL330107 e IL330149. Questi risultati mostrano che IL330065, IL330099, IL330101, IL330107 e IL330149 non hanno inibito la traslocazione nucleare di NFkB di p65/RelA in Huvec stimulate con IL-33 30 minuti dopo la stimolazione. I risultati sono coerenti con l'impossibilità degli anticorpi IL330065, IL330099, IL330101, IL330107, IL33149 e IL330180 di inibire il legame di IL-33 a ST2.

Legame di epitopo di anticorpi IL-33 nei saggi di competizione di epitopo HTRF®

La capacità degli anticorpi di competere con mAb IL330101 o mAb IL330180 per il legame a IL-33 umana biotinilata è stata valutata in un saggio di competizione biochimico di epitopo HTRF® (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International).

I saggi di competizione di epitopo HTRF®, descritti di seguito, sono stati usati per misurare il legame di un anticorpo principale in formato IgG a IL-33 biotinilata. I campioni di scFv di prova che riconoscono un epitopo simile all'anticorpo principale competeranno con l'anticorpo principale per il legame a IL-33, determinando una riduzione del segnale di saggio.

Campioni di anticorpo di scFv anti-IL-33 purificati sono stati provati per l'inibizione di legame di IL-33 umana biotinilata all'anticorpo principale aggiungendo 5 microlitri di ciascuna diluizione del campione di prova di anticorpo a una piastra di saggio a basso volume da 384

pozzetti (Costar, 3673). Successivamente, è stata preparata una soluzione contenente 8 nM di IgG1 di IL330180 o 12 nM di IgG1 di IL330101 e 40 nM di rilevamento Fc antiumano (Cisbio International, 61HFXLB) e 2,5 microlitri sono stati aggiunti alla piastra di saggio. A ciò è seguita l'addizione di 2,5 microlitri di una soluzione contenente 4 nM (per il saggio di competizione di epitopo di IL330180) o 18 nM (per il saggio di competizione di epitopo di IL330101) di IL-33 umana biotinilata (Axxora, AG-40B-0038; biotinilata) e 4,65 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB). Tutte le diluizioni sono state eseguite in un tampone di saggio composto da PBS di Dulbecco (Invitrogen, 14190185) contenente 0,8 M di fluoruro di potassio (BDH, 103444T) e albumina di siero bovino allo 0,1% (BSA, Sigma A9576). Le piastre di saggio sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente seguita da 16 ore a 4 °C prima della lettura di fluorescenza a risoluzione temporale a lunghezze d'onda di emissione di 620 nm e 665 nm usando un lettore di piastre EnVision (Perkin Elmer). I dati sono stati analizzati usando le Equazioni da 1 a 3 come descritto in precedenza. Il controllo negativo (legame aspecifico) viene definito sostituendo la combinazione di IL-33 biotinilata/criptato di streptavidina con il solo rilevamento di criptato di streptavidina.

I risultati per il saggio di competizione di epitopo di IL330101 e IL330180 sono mostrati nelle Figure 8A e 8B, rispettivamente. La **Figura 12A** mostra il legame competitivo di scFv di IL330101, scFv di IL330107, scFv di IL330149, scFv di IL330065, scFv irrilevante e scFv

di IL330180 con mAb IL330101 per il legame a IL-33 umana biotinilata. Questi risultati mostrano che scFv di IL330101, scFv di IL330107, scFv di IL330149 hanno inibito in modo competitivo il legame di IL330101 a IL-33 umana biotinilata.

La **Figura 12B** mostra il legame competitivo di IL330180, IL330101, IL330149, IL330065 e scFv irrilevante con mAb IL330180 per il legame a IL-33 umana biotinilata valutata in un HTRF® biochimico. Questi risultati mostrano che IL330101, IL330149 e IL330065 non inibiscono in modo competitivo il legame di IL330180 a IL-33 umana biotinilata.

Il legame di epitopo usando questo metodo mostra tre panel di anticorpi comprendenti IL330101, IL330107 e IL330149 nel riquadro 1, IL330065 nel riquadro 2 e IL330180 nel riquadro 3, come dettagliato nella **Tabella 12**.

Tabella 12. Riquadri di legame di epitopi

	Inibizione nel saggio di competizione di epitopo in IL330101	Inibizione nel saggio di competizione di epitopo in IL330180
IL330101	√	X
IL330107	√	X
IL330149	√	X
IL330065	X	X
IL330180	X	√

Esempio 3 Ottimizzazione di IL330101 anti-IL-33 Ab

Maturazione di affinità

IL330101 è stato ottimizzato usando un approccio bersagliato di mutagenesi e selezioni di visualizzazione dei fagi basate sull'affinità. Grandi librerie di fagi di scFv derivate dal clone di principale sono state create mediante mutagenesi diretta da oligonucleotidi delle regioni 2 e 3 determinanti la complementarità (CDR2 e CDR3) a catena variabile pesante (VH) e della CDR3 leggera (VL) usando tecniche di biologia molecolare standard come descritto (Clackson, T. e Lowman, H.B. Phage Display - A Practical Approach, 2004. Oxford University Press). Le librerie sono state sottoposte a selezioni di visualizzazione dei fagi basate sull'affinità al fine di selezionare varianti con maggiore affinità per IL-33 umana e di topo. Le selezioni sono state eseguite essenzialmente come descritto in precedenza (Thompson, J et al. J Mol Biol, 1996. 256: pagine 77-88) usando reagenti come descritto negli Esempi 1 e 2. In breve, le particelle di fago di scFv sono state incubate con IL-33 umana ricombinante biotinilata in soluzione (Adipogen; biotinilata come descritto in Modificazioni delle proteine nell'Esempio 1). I fagi di ScFv legati all'antigene sono stati quindi catturati su biglie paramagnetiche rivestite di streptavidina (Dynabeads® M-280) seguendo le raccomandazioni del fabbricatore. Le particelle di fagi di scFv selezionate sono state quindi salvate come descritto in precedenza (Osborn, J.K., et al. Immunotechnology, 1996. 2(3):

pagine 181-96), e il processo di selezione è stato ripetuto in presenza di concentrazioni alternate e decrescenti di IL-33 biotinilata umana o di topo, tipicamente da 500 nM a 500 pM in quattro turni di selezione.

Inibizione di legame di IL-33 a mAb mediante scFv non purificato

Un numero rappresentativo di singoli cloni provenienti dagli esiti della selezione è stato coltivato in piastre da 96 pozzetti. ScFv sono stati espressi nel periplasma batterico (Kipriyanov, et al. J Immunol Methods 200 (1-2): 69-77 (1997)) e sottoposti a screening per la loro attività inibitoria in un saggio di legame IL-33:mAb basato su FRET (trasferimento di energia di fluorescenza per risonanza) HTRF® (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International). In questo saggio, i campioni erano in competizione con IgG di IL330101 per il legame a IL-33 umana biotinilata o IL-33 FLAG®His di topo. Tali saggi di competizione di epitopo si basano sul principio che un campione di anticorpo di prova, che riconosce un epitopo simile all'IgG anti-IL-33, competerà con l'IgG per il legame a IL-33 biotinilata determinando una riduzione del segnale di saggio.

Campioni di scFv anti-IL-33 non purificati sono stati provati per l'inibizione del legame di IL-33 FLAG®His umana o di topo biotinilata a IL330101 aggiungendo 5 microlitri di campione a una piastra di saggio a basso volume da 384 pozzetti (Costar, 3673). Successivamente, una soluzione contenente 12 nM di IL330101 combinata con 40 nM di rilevamento di Fc anti umano XL665 (Cisbio International, 61HFCXLB)

è stata preparata per il saggio di IL-33 umana e una soluzione di 2 nM di IL330101 combinato con 40 nM di rilevamento di Fc anti umano XL665 (Cisbio International, 61HFCXLB) è stata preparata per il saggio sui topi. Sono stati aggiunti 2,5 microlitri alle piastre di saggio. A ciò è seguita l'addizione di 2,5 microlitri di una soluzione contenente 18 nM di IL-33 umana biotinilata (Adipogen, AG-40B-0038) combinata con 4,6 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB) per il saggio umano o una soluzione contenente 2 nM di IL-33 FLAG®His biotinilata di topo combinata con 4,6 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB) per il saggio di cynomolgus. Tutte le diluizioni sono state eseguite in un tampone di saggio contenente 0,8 M di fluoruro di potassio (VWR, 26820.236) e albumina di siero bovino allo 0,1% (BSA, PAA, K05-013) in PBS di Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Le piastre di saggio sono state incubate per 4 ore a temperatura ambiente seguita da 16 ore a 4 gradi Celsius e la fluorescenza a risoluzione temporale è stata letta a lunghezze d'onda di emissione di 620 nm e 665 nm usando un lettore di piastre EnVision (Perkin Elmer). I dati sono stati analizzati calcolando il rapporto di 665/620 nm seguito dai valori Delta F in % per ciascun campione. Il rapporto di 665/620 nm è stato usato per correggere l'interferenza di campione usando l'Equazione 1. Il Delta F in % per ciascun campione è stato quindi calcolato usando l'Equazione 2. Il controllo negativo (legame aspecifico) è stato definito sostituendo IL-33 biotinilata combinata con il rilevamento di criptato di streptavidina con il

solo rilevamento di criptato di streptavidina. I valori Delta F in % sono stati successivamente usati per calcolare il legame specifico in % come descritto nell'Equazione 3.

Quando il saggio di competizione di epitopo ha raggiunto il suo limite di sensibilità, è stato usato un saggio che usava un mAb IL330259 ottimizzato intermedio per provare campioni di scFv non purificato. Campioni di anticorpo anti-IL-33 non purificati sono stati provati per l'inibizione del legame di IL-33 FLAG®His umana biotinilata o IL-33 di topo biotinilata a IL330259 etichettato DyLight aggiungendo 5 microlitri di ciascun campione a una piastra di saggio a basso volume da 384 pozzetti (Costar, 3673). Successivamente, una soluzione contenente 20 nM di IL330259 etichettato DyLight è stata preparata per il saggio di IL-33 umana e 4 nM di IL330259 etichettato DyLight sono stati preparati per il saggio sui topi e 2,5 microlitri aggiunti alle piastre di saggio (IgG etichettata usando il kit (Thermo Scientific, 53051) secondo le istruzioni del fabbricatore). A ciò è seguita l'addizione di 2,5 microlitri di una soluzione contenente 20 nM di IL-33 umana biotinilata (Adipogen, AG-40B-0038) o 1,6 nM di L-33 FLAG®His di topo biotinilata, combinata con 6 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB). Tutte le diluizioni sono state eseguite in un tampone di saggio contenente 0,8 M di fluoruro di potassio (VWR, 26820.236) e albumina di siero bovino allo 0,1% (BSA, PAA, K05-013) in PBS di Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Le piastre di saggio sono state incubate per 4 ore a temperatura ambiente seguita da 16 ore a 4

gradi Celsius e la fluorescenza a risoluzione temporale è stata letta a lunghezze d'onda di emissione di 620 nm e 665 nm usando un lettore di piastre EnVision (Perkin Elmer). I dati sono stati analizzati calcolando il rapporto di 665/620 nm seguito dai valori Delta F in % per ciascun campione. Il rapporto di 665/620 nm è stato usato per correggere l'interferenza di campione usando l'Equazione 1. Il Delta F in % per ciascun campione è stato quindi calcolato usando l'Equazione 2. Il controllo negativo (legame aspecifico) è stato definito sostituendo IL-33 biotinilata combinata con il rilevamento di criptato di streptavidina con il solo rilevamento di criptato di streptavidina. I valori Delta F in % sono stati successivamente usati per calcolare il legame specifico in % come descritto nell'Equazione 3.

Inibizione di legame di IL-33 a mAb mediante scFv purificato

I cloni Fv a catena singola che hanno mostrato un maggiore effetto inibitorio sull'interazione IL-33:mAb poiché estratti periplasmici non purificati rispetto a IL330101 sono stati sottoposti a sequenziamento del DNA (Osbourn, et al. Immunotechnology 2(3):181-96(1996); Vaughan, et al. Nat Biotechnol 14(3):309-14 (1996)). Gli scFv unici sono stati espressi di nuovo nei batteri e purificati mediante cromatografia per affinità (come descritto in WO01/66754). Le potenze di questi campioni sono state determinate facendo competere una serie di diluizioni della preparazione purificata contro IgG di IL330101 per il legame a IL-33 umana biotinilata, IL-33 FLAG®His di topo biotinilata o

IL-33 FLAG®His di Cynomolgus biotinilata come descritto sopra ma con l'aggiunta del saggio di IL-33 FLAG®His di cynomolgus biotinilata (è stata aggiunta IL-33 FLAG®His di cynomolgus biotinilata alla concentrazione di 12 nM).

La **Figura 13**: mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotta dal legame di IL-33 umana biotinilata a IL330101 con concentrazioni crescenti di anticorpi di scFv IL-33 IL330101, IL330259, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è il legame specifico percentuale.

Preparazioni di scFv purificato che erano in grado di inibire l'interazione IL-33:mAb in misura maggiore rispetto a IL330101 sono state selezionate per la conversione al formato IgG. Il metodo di espressione e purificazione di IgG è descritto nell'Esempio 1.

Quando il saggio di competizione di epitopo ha raggiunto il suo limite di sensibilità, è stato usato un saggio che usa un mAb ottimizzato intermedio (IL330259) per provare i campioni di scFv purificato. Campioni di anticorpi anti-IL-33 purificati sono stati provati per l'inibizione di legame di IL-33 umana biotinilata, IL-33 FLAG®His di topo biotinilata o IL-33 FLAG®His di cynomolgus biotinilata a IL330259 come descritto sopra con l'aggiunta del saggio di IL-33 FLAG®His di cynomolgus biotinilata (IL-33 FLAG®His di cynomolgus biotinilata è stata aggiunta a una concentrazione di 12 nM).

Sulla base dei dati di sequenza e di competizione di epitopo, gli esiti VH e VL selezionati sono stati ricombinati mediante tecniche di

biologia molecolare standard per formare librerie in cui i cloni contenevano sequenze VH e VL accoppiate in modo casuale (per esempio, librerie CDR2 VH/CDR3 VL e CDR3 VH/CDR3 VL). In alternativa, le sequenze CDR3 VH e CDR3 VL sono state accoppiate in modo casuale e ricombinate con sequenze CDR2 VH specifiche selezionate da un raggruppamento di varianti migliorate, per generare librerie in cui tutte e tre le CDR erano non parentali. Tipicamente cinque turni di selezione per affinità usando concentrazioni decrescenti e alternate di IL-33 umana e di topo biotinilata, da 10 nM a 10 pM, sono stati eseguiti su tutte le librerie di ricombinazione per identificare sequenze scFv con cinetica migliorata. In alternativa, le librerie di ricombinazione sono state selezionate usando una concentrazione fissa di IL-33 biotinilata (per esempio, 1 nM, 100 pM o 300 pM) in presenza di IL-33 non biotinilata per 1000 volte per quantità crescenti di tempo (per esempio 30 minuti, 1 ora, 2 ore o 4 ore) in quattro turni di selezione, un processo noto nell'arte come selezione "di costante di dissociazione" o "di competizione", per identificare gli scFv con cinetica migliorata.

I campioni sono stati nuovamente sottoposti a screening in un saggio di competizione di epitopo HTRF® per la capacità di inibire il legame huIL-33 etichettato all'anticorpo genitore IL330101 o all'anticorpo ottimizzato per CDR2 VH IL330259 come descritto in precedenza. Gli ScFv che hanno mostrato un effetto inibitorio significativamente migliorato rispetto a IL330101, sono stati sottoposti a sequenziamento del DNA e sono state prodotte varianti uniche come

scFv purificati per un'ulteriore caratterizzazione. Gli scFv inibitori sono stati convertiti in un formato di anticorpo di immunoglobulina intera G1 (IgG1) come descritto nell'Esempio 1.

In alternativa, le singole sequenze uniche di CDR2 VH, CDR3 VH e CDR3 VL sono state ricombinate in modo specifico e razionale e prodotte direttamente come IgG. In questo esempio, le IgG sono state provate per una cinetica migliorata senza alcuna selezione di affinità aggiuntiva.

Anticorpi con cinetica migliorata sono stati identificati da tutte le strategie e sono esemplificati da IL330259, IL330377, IL330388, IL330396, IL330398 e H338L293.

Le sequenze amminoacidiche dei domini V_H e V_L di IL330101 genitore e degli anticorpi anti-IL-33 ottimizzati sono state allineate alle sequenze germinali umane note nel database IMGT (Lefranc, M. P. et al. Nucl. Acids Res. 2009. 37(Database issue): D1006-D1012), e la linea germinale più vicina è stata identificata mediante somiglianza di sequenza. Per il dominio V_H della linea di anticorpi IL330101 questa era IGHV3-21/IGHJ2. Per il dominio V_L era IGLV3-25/IGLJ3. Senza considerare i residui Vernier (Foote, J., et al. J Mol Biol, 1992. 224: pagina 487), che sono rimasti invariati, non vi è stato alcun cambiamento richiesto nelle intelaiature dei domini V_H e vi sono 4 cambiamenti nelle intelaiature V_L (V3E, T5M, A45V e V104L; numerazione Kabat). Queste posizioni sono state cambiate come indicato usando tecniche standard di mutagenesi sito-diretta con primer

mutageni appropriati. Gli anticorpi che sono stati germinati in questo modo risultano negli elenchi di sequenza con il suffisso 'fgl'. I SEQ ID NO corrispondenti alle varie regioni degli anticorpi IL330259, H338L293, IL330377, IL330388, IL330396 e IL330398 sono mostrati nella **Tabella 13**.

Tabella 13. Sequenze di anticorpo Anti-IL-33

IgG1	VH SEQ ID	VL SEQ ID	CDR 1,2,3	CDR 1,2,3
	NO:	NO:	VH	VL
IL330101_fgl	112	117	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 118
			SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 119
			SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 120
IL330259	152	157	SEQ ID NO: 153	SEQ ID NO: 158
			SEQ ID NO: 154	SEQ ID NO: 159
			SEQ ID NO: 155	SEQ ID NO: 160
IL330259_fgl	162	167	SEQ ID NO: 163	SEQ ID NO: 168

IgG1	VH SEQ ID	VL SEQ ID	CDR 1,2,3	CDR 1,2,3
	NO:	NO:	VH	VL
			SEQ ID NO: 164	SEQ ID NO: 169
			SEQ ID NO: 165	SEQ ID NO: 170
H338L293	172	177	SEQ ID NO: 173	SEQ ID NO: 178
			SEQ ID NO: 174	SEQ ID NO: 179
			SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 180
H338L293_fgl	182	187	SEQ ID NO: 183	SEQ ID NO: 188
			SEQ ID NO: 184	SEQ ID NO: 189
			SEQ ID NO: 185	SEQ ID NO: 190
IL330377	192	197	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 198
			SEQ ID NO: 194	SEQ ID NO: 199

IgG1	VH SEQ ID	VL SEQ ID	CDR 1,2,3	CDR 1,2,3
	NO:	NO:	VH	VL
			SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 200
IL330377_fgl	202	207	SEQ ID NO: 203	SEQ ID NO: 208
			SEQ ID NO: 204	SEQ ID NO: 209
			SEQ ID NO: 205	SEQ ID NO: 210
IL330388	212	217	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 218
			SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 219
			SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 220
IL330388_fgl	222	227	SEQ ID NO: 223	SEQ ID NO: 228
			SEQ ID NO: 224	SEQ ID NO: 229
			SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 230

IgG1	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
IL330396	232	237	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 238
			SEQ ID NO: 234	SEQ ID NO: 239
			SEQ ID NO: 235	SEQ ID NO: 240
IL330396_fgl	242	247	SEQ ID NO: 243	SEQ ID NO: 248
			SEQ ID NO: 244	SEQ ID NO: 249
			SEQ ID NO: 245	SEQ ID NO: 250
IL330398	252	257	SEQ ID NO: 253	SEQ ID NO: 258
			SEQ ID NO: 254	SEQ ID NO: 259
			SEQ ID NO: 255	SEQ ID NO: 260
IL330398_fgl	262	267	SEQ ID NO: 263	SEQ ID NO: 268

IgG1	VH SEQ ID	VL SEQ ID	CDR 1,2,3	CDR 1,2,3
	NO:	NO:	VH	VL
			SEQ ID NO: 264	SEQ ID NO: 269
			SEQ ID NO: 265	SEQ ID NO: 270

Inibizione di legame di IL-33 a mAb mediante IgG purificata

La capacità degli anticorpi anti-IL-33 di inibire il legame di IL-33 umana biotinilata, IL-33 FLAG®His di topo biotinilata o di IL-33 FLAG®His di cynomolgus all'IgG di IL330101 etichettato DyLight è stata valutata in un saggio di competizione HTRF® biochimico (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International).

Campioni di anticorpi anti-IL-33 purificati sono stati provati per l'inibizione di IL-33 umana biotinilata, IL-33 FLAG®His di topo biotinilata o IL-33 FLAG®His di cynomolgus biotinilata a IL330101 etichettato DyLight aggiungendo 5 microlitri di ciascuna concentrazione di campione a una piastra di saggio a basso volume da 384 pozzetti (Costar, 3673). Successivamente, è stata preparata una soluzione contenente 40 nM di IL330101 etichettato Dylight e 2,5 microlitri sono stati aggiunti alle piastre di saggio (etichettate usando il kit (Thermo Scientific, 53051) secondo le istruzioni del fabbricatore). A ciò è seguita l'addizione di 2,5 microlitri di una soluzione contenente 40 nM di IL-33 umana biotinilata (Adipogen, AG-40B-0038), 2,5 nM di IL-33 FLAG®

His di topo biotinilata o 12 nM di IL-33 FLAG®His di cynomolgus biotinilata combinata con 4,6 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB). Tutte le diluizioni sono state eseguite in un tampone di saggio contenente 0,8 M di fluoruro di potassio (VWR, 26820.236) e albumina di siero bovino allo 0,1% (BSA, PAA, K05-013) in PBS di Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Le piastre di saggio sono state incubate per 4 ore a temperatura ambiente seguita da 16 ore a 4 gradi Celsius e la fluorescenza a risoluzione temporale è stata letta a lunghezze d'onda di emissione di 620 nm e 665 nm usando un lettore di piastre EnVision (Perkin Elmer). I dati sono stati analizzati calcolando il rapporto di 665/620 nm seguito dai valori Delta F in % per ciascun campione. Il rapporto di 665/620 nm è stato usato per correggere l'interferenza di campione usando l'Equazione 1. Il Delta F in % per ciascun campione è stato quindi calcolato usando l'Equazione 2. Il controllo negativo (legame aspecifico) è stato definito sostituendo IL-33 biotinilata combinata con il rilevamento di criptato di streptavidina con il solo rilevamento di criptato di streptavidina. I valori Delta F in % sono stati successivamente usati per calcolare il legame specifico in % come descritto nell'Equazione 3.

La **Figura 14A**: mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotta dal legame di IL-33 umana biotinilata a IL330101 con concentrazioni crescenti di anticorpi di IgG1 di IL-33 IL330101, IL330259, dove l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è il legame specifico percentuale.

Quando il saggio di competizione di epitopo ha raggiunto il suo limite di sensibilità, è stato usato un saggio che usa un mAb intermedio ottimizzato IL330259 per provare i campioni di IgG purificata. Ciò avviene come viene descritto per provare scFv purificato.

Quando il saggio di competizione di epitopo di IL330259 ha raggiunto il suo limite di sensibilità, è stato usato un terzo saggio che usa un mAb ottimizzato (H338L293) per provare i campioni di IgG purificata. Campioni di anticorpo anti-IL-33 purificati sono stati provati per l'inibizione di legame di IL-33 FLAG®His umana biotinilata, IL-33 FLAG®His di cynomolgus biotinilata o IL-33 FLAG®His di topo biotinilata a H338L293 etichettato DyLight aggiungendo 5 microlitri di ciascun campione a una piastra di dosaggio a basso volume da 384 pozzetti (Costar, 3673). Successivamente, è stata preparata una soluzione contenente 20 nM di H338L293 etichettato Dylight e 2,5 microlitri sono stati aggiunti alle piastre di saggio (etichettate usando il kit (Thermo Scientific, 53051) secondo le istruzioni del fabbricatore). A ciò è seguita l'addizione di 2,5 microlitri di una soluzione contenente 4 nM di IL-33 umana biotinilata (Adipogen, AG-40B-0038), 0,8 nM di IL-33 FLAG® His di topo biotinilata o 1,6 nM di IL-33 FLAG®His di cynomolgus biotinilata combinata con 4,6 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB). Tutte le diluizioni sono state eseguite in un tampone di saggio contenente 0,8 M di fluoruro di potassio (VWR, 26820.236) e albumina di siero bovino allo 0,1% (BSA, PAA, K05-013) in PBS di Dulbecco (Invitrogen, 14190185).

Le piastre di saggio sono state incubate per 4 ore a temperatura ambiente seguite da 16 ore a 4 °C e la fluorescenza a risoluzione temporale è stata letta a lunghezze d'onda di emissione di 620 nm e 665 nm usando un lettore di piastre EnVision (Perkin Elmer). I dati sono stati analizzati calcolando il rapporto di 665/620 nm seguito dai valori Delta F in % per ciascun campione. Il rapporto di 665/620 nm è stato usato per correggere l'interferenza di campione usando l'Equazione 1. Il Delta F in % per ciascun campione è stato quindi calcolato usando l'Equazione 2. Il controllo negativo (legame aspecifico) è stato definito sostituendo IL-33 biotinilata combinata con il rilevamento di criptato di streptavidina con il solo rilevamento di criptato di streptavidina. I valori Delta F in % sono stati successivamente usati per calcolare il legame specifico in % come descritto nell'Equazione 3.

La **Figura 14B**: mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotta dal legame di IL-33 umana biotinilata a H338L293 con concentrazioni crescenti di anticorpi di IgG1 H338L293, IL330396 e IL330388, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è il legame specifico percentuale.

Inibizione della produzione di IL-6 di Huvec da parte di anticorpi IL-33

Gli anticorpi sono stati valutati per la capacità di inibire la produzione di IL-6 stimolata da IL-33 di Huvec come descritto nell'Esempio 2

La **Figura 15A** mostra la riduzione della produzione di IL-6 aumentando le concentrazioni di anticorpi (IL330101, IL330377, H338L293, IL330388, IL330396, IL330398) in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è la risposta massima in %. Le preparazioni di IgG purificata di anticorpi hanno inibito l'attività di IL-6 fino a un massimo del □70%, rispetto a un anticorpo policlonale commerciale che inibiva al 100%.

Inibizione della produzione di IL-6 di mastociti da parte di anticorpi IL-33

Gli anticorpi sono stati valutati per la capacità di inibire la produzione di IL-6 stimolata da IL-33 da mastociti derivatida sangue cordonale umano come descritto nell'Esempio 2

La **Figura 15B** mostra la riduzione della produzione di IL-6 aumentando le concentrazioni di anticorpi (IL330101, H338L293, IL330388, IL330396) in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è la risposta massima in %. Le preparazioni di IgG purificata di anticorpi hanno inibito l'attività di IL-6 del 100%, rispetto all'anticorpo di controllo negativo.

I risultati di IC50 per la produzione di IL-6 di HUVEC e la produzione IL-6 di mastociti sono mostrati nella **Tabella 14**.

Tabella 14. Potenze esemplificative di anticorpi ottimizzati

Clone	IgG1 Geomean (CI al 95%) IC50 (nM)	
	Produzione di IL-6 di Huvec	Produzione di IL-6 di mastociti

Clone	IgG1 Geomean (CI al 95%) IC50 (nM)	
	Produzione di IL-6 di Huvec	Produzione di IL-6 di mastociti
IL330101	193	93
IL330377_FGL	6,6	1,3
H338L293	1,9	1,7
IL330388_FGL	2,1	1,2
IL330396_FGL	2,8	1,5
IL330398_FGL	1,5	0,9

Farmacologia di anticorpo

La produzione di IL-6 da mastociti derivati da sangue cordonale è stata indotta aumentando le concentrazioni di IL-33 (Adipogen) usando il metodo descritto nell'Esempio 2. Questa dose-risposta è stata compiuta in presenza di concentrazioni crescenti di H338L293 o IL330388 per produrre uno spostamento verso destra della curva dose-risposta di IL-33. I valori EC_{50} per IL-33 in assenza e presenza di anticorpo sono stati calcolati usando il software GraphPad PRISM (La Jolla, CA, STATI UNITI) ed è stato calcolato il rapporto di dose (DR). I dati sono stati tracciati come $\log [\text{Anticorpo}]$ M (asse x) rispetto a $\log [DR-1]$ (asse y). Questo mostra chiaramente un profilo non competitivo (tracciato curvo), caratteristico di un modulatore allosterico. Per indagare ciò, i dati di ciascun esperimento sono stati normalizzati e

combinati in un unico insieme di dati. Un modello allosterico è stato adattato usando il software Prism Graphpad e il K_b e il valore di alfa sono stati determinati. I valori di alfa erano simili per entrambe le derivazioni esaminate, indicando un valore di alfa di $\approx 0,02$ (vale a dire, la riduzione massima in termini di affinità/potenza di IL-33 quando l'anticorpo è legato è ≈ 50 volte). L'affinità funzionale (K_b) può essere stimata per H338L293 ($\approx 4,2$ nM) e IL330388 $\approx 1,7$ nM).

La **Figura 16** mostra un'analisi di Schild di IL330388 e H338L293 in un saggio di produzione di IL-6 di mastociti. Entrambi gli anticorpi mostrano il profilo di un modulatore allosterico.

Calcolo dell'affinità di legame per gli anticorpi IL-33 usando BIAcore

L'affinità di legame di campioni di IgG purificata di membri di legame esemplificativi a IL-33 umana, di cynomolgus o di topo è stata determinata mediante affinità della soluzione usando un BIAcore 2000 (GE Healthcare). Una superficie di IL33 biotinilata è stata immobilizzata su un chip sensore rivestito di streptavina (GE Healthcare cat. n° BR-1000-32). Gli anticorpi anti-IL33 sono stati incubati con varie concentrazioni di IL33 non etichettata ed equilibrati a 25 °C per 48 ore. La quantità di anticorpo libero è stata determinata facendo fluire i campioni sul chip di IL33 e misurando la risposta rispetto a una curva standard di anticorpo. Le affinità sono state determinate usando l'adattamento di affinità della soluzione nel software di valutazione BIA. Le affinità per gli anticorpi IL330101, H338L293, IL330388, IL330396

che si legano a IL-33 umana, di cynomolgus o di topo sono mostrate nella **Tabella 15**.

Tabella 15: Affinità di soluzione BIAcore di membri di legame esemplificativi

Anticorpo	Antigene	KD (nM)
IL3300101	IL-33 FLAG®-His umana	3,20E-06
H338L293	IL-33 FLAG®-His umana	5,90E-10
H338L293	IL-33 FLAG®-His di Cynomolgus	5,45E-10
H338L293	IL-33 FLAG®-His di topo	4,52E-10
IL3300388	IL-33 FLAG®-His umana	3,00E-10
IL3300388	IL-33 FLAG®-His di Cynomolgus	2,92E-10
IL3300388	IL-33 FLAG®-His di topo	8,82E-11
IL3300396	IL-33 FLAG®-His umana	5,93E-10

Esempio 4 regolazione Redox di IL-33

Reagenti

cDNA codificante per il componente maturo di IL-33 umana (amminoacidi 112-270); numero di accesso (Swiss-Prot) O95760 è stato sintetizzato mediante PCR di estensione del primer e clonato in pJexpress404 (DNA 2.0). La sequenza codificante è stata modificata per contenere un sito di scissione della proteasi 10xhis, Avitag e Fattore-Xa (MHHHHHHHHHHAAGLNDIFEAQKIEWHEAAIEGR) nel

terminale N della proteina. IL33-01 N-terminale con tag His10/Avitag (WT, SEQ ID 632) è stata generata trasformando cellule di E.coli BL21 (DE3). Le cellule trasformate sono state coltivate in terreni di autoinduzione (Overnight Express™ Autoinduction System 1, Merck Millipore, 71300-4) a 37 °C per 18 ore prima che le cellule fossero raccolte mediante centrifugazione e conservate a -20 °C. Le cellule sono state risospese in BugBuster (Merck Millipore, 70921-5), contenente compresse di una miscela di inibitori della proteasi completa (Roche, 11697498001), 2,5 u/ml di Benzonasi nucleasi (Merck Millipore, 70746-3) e 1 mg/ml di lisozima ricombinante. Il lisato cellulare è stato chiarificato mediante centrifugazione a 75.000 x g per 2 ore a 4 °C. Le proteine IL-33 sono state purificate dal surnatante mediante cromatografia di affinità di nichel in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 20 mM di imidazolo, eluendo in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 250 mM di imidazolo. IL-33 è stata ulteriormente purificata mediante cromatografia a esclusione dimensionale usando una colonna Superdex 75 10/300 GL in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4. Le frazioni di picco sono state analizzate mediante SDS PAGE. Le frazioni contenenti IL-33 pura sono state raggruppate e la concentrazione misurata mediante misurazione Nanodrop A280. I campioni finali sono stati analizzati mediante SDS PAGE.

Per generare IL-33 priva di tag (BK349), IL33-01 con tag His10/Avitag N-terminale è stata incubata con 10 unità di Fattore Xa

(GE healthcare 27-0849-01) per mg di proteinain tampone 2 x DPBS a temperatura ambiente per 1 ora. IL33 priva di tag è stata purificata usando la cromatografia SEC in 2 x DPBS su una colonna S75 (GE Healthcare 28-9893-33) con una portata di 1 ml/minuto.

Altri reagenti delineati nella **Tabella 16** sono stati generati come descritto nell'Esempio 1.

Tabella 16. Reagenti di IL-33

Reagente	Fornitore	Numero di catalogo/progettazione	SEQ ID
IL-33 Flag®His umana	Di laboratorio		SEQ ID NO. 627
IL-33 Flag®His di topo	Di laboratorio		SEQ ID NO. 628
IL33-01 His10/Avitag umana	Di laboratorio		SEQ ID NO. 632
IL33-01 priva di tag umana	Di laboratorio	BK349	
IL-33 umana	Axxora / Alexis	ALX-522-098	
IL-33 di topo	Peptrotech	210-33	
IL-33 di topo	R&D systems	3626/ML	

Modificazioni di proteine

IgG e proteine recettrici modificate usate nel presente documento sono state biotinilate tramite ammine libere usando il collegamento EZ Sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo/Pierce, 21335) come descritto nell'Esempio 1. Le proteine IL-33 usate nel presente documento sono state biotinilate tramite cisteine libere usando il collegamento EZ Biotin-BMCC (Perbio/Pierce, prodotto n° 21900).

IL-33 perde rapidamente attività in vitro

L'attività di IL-33 è stata misurata nei saggi di segnalazione HUVEC (30 minuti) e nel saggio di produzione di IL-6 (18-24 ore), i cui metodi sono descritti rispettivamente negli Esempi 1 e 2.

La **Figura 17** mostra l'attività di IL-33 umana, di IL-33 biotinilata con cisteina o di IL-33 pretrattata su terreni di coltura cellulare, misurata nei saggi di segnalazione HUVEC (30 minuti) e nel saggio di produzione di IL-6 (18-24 ore). La **Figura 17A** mostra il confronto dell'attività di IL-33 umana (Adipogen) misurata dai saggi di NFkB o IL-6 in cui l'asse x è la concentrazione di IL-33 umana in concentrazione molare e l'asse y è la risposta massima percentuale. IL-33 era significativamente meno potente nei saggi di una notte rispetto a quelli brevi (30 minuti). IL-33 Flag®His umana biotinilata tramite residui di cisteina non ha perso attività tra saggi brevi (30 minuti) e più lunghi (di una notte) (**Figura 17B**). Per indagare su questo fenomeno, IL-33 (BK349) è stata pretrattata per 18 ore in terreni di coltura cellulare

(EBM-2 (Lonza, # CC-3156) con Kit Suppl. EGM-2 SingleQuot e fattori di crescita (Lonza, # CC-4176)) e quindi confrontata con IL-33 non trattata per la capacità di indurre la segnalazione di NFkB. IL-33 che è stata pretrattata con terreni di coltura ha mostrato una significativa perdita di attività (**Figura 17C**).

Analisi SDS-PAGE di IL-33

Per indagare i potenziali cambiamenti alla proteina IL-33, PBS/albumina di siero bovino (BSA) allo 0,1% o IL-33 umana (BK349 o IL-33 Flag®His umana) di Terreno IScoves modificato di Dulbecco (IMDM)-trattata e IL-33 Flag®His di topo sono state analizzate mediante elettroforesi SDS PAGE in condizioni riducenti o non riducenti. I campioni sono stati preparati in tampone di caricamento di gel 1x NuPAGE (Invitrogen) e denaturati a 90 °C per 3 minuti. I campioni ridotti contenevano beta-mercaptoetanololo al 2%. I campioni sono stati fatti scorrere su mini gel Bis-Tris al 12% NuPAGE Novex (Invitrogen) con tampone di scorrimento MOPS (Invitrogen) secondo le istruzioni del fabbricatore. Campioni ridotti e non ridotti sono stati fatti scorrere su gel separati. Sono stati caricati 500 ng di IL-33 per corsia. I gel sono stati lavati 3 x 5 minuti su piattaforma di agitazione in ddH2O e quindi colorati per 1 ora usando EzBlue (reagente di colorazione di gel a base di blu brillante Coomassie G-250, Sigma G1041). I gel sono stati decolorati in dH2O e scansionati usando uno scanner Epsom.

La **Figura 18** mostra SDS-PAGE di IL-33 umana o di topo in condizioni riducenti o non riducenti, prima o dopo il trattamento con il

terreno modificato Iscove di Dulbecco (IMDM). Differenze nel peso molecolare apparente di IL-33 dopo il trattamento con IMDM sono state osservate solo in condizioni non riducenti che implicano la presenza di modificazioni redox correlate per IL-33 sia umana sia di topo. La **Figura 18A** mostra la differenza nel peso molecolare apparente dell'IL-33 umana (BK349) a seguito di trattamento con IMDM che è stata osservata solo in condizioni non riducenti. La **Figura 18B** mostra IL-33 Flag®His umana, non biotinilata rispetto a biotinilata in condizioni non riducenti. È stata osservata una differenza nel peso molecolare apparente per IL-33 Flag®His, ma non per IL-33 Flag®His biotinilata con cisteina a seguito di trattamento con IMDM. La **Figura 18C** mostra la differenza nel peso molecolare apparente dell'IL-33 Flag®His di topo a seguito di trattamento con IMDM che è stata osservata solo in condizioni non riducenti.

Analisi di spettrometria di massa e mappatura di disolfuro

La forma di terreni trattati di IL-33 umana è stata purificata per ulteriori analisi. IL-33 umana (BK349) è stata incubata con terreni IMDM al 60% o in PBS a una concentrazione proteica finale di 300 ug/ml per 18 ore a 37 °C. Dopo 18 ore, IL33 trattata con terreni è stata purificata da componenti dei terreni usando la Cromatografia a esclusione dimensionale (SEC) su una colonna S75 16:600 Superdex (GE healthcare 28-9893-33) in 2 x DPBS usando un sistema AKTExpress FPLC (GE healthcare). Le frazioni di picco sono state analizzate

mediante SDS PAGE e le frazioni pure non aggregate sono state raggruppate e analizzate mediante LC-MS.

La **Figura 19** mostra la purificazione di IL-33 umana trattata con IMDM mediante SEC. La frazione monomerica è stata raccolta per ulteriori analisi.

LC-MS

L'analisi LC-MS in fase inversa (RP) è stata eseguita usando un UPLC Acquity accoppiato a uno spettrometro di massa a tempo di volo quadrupolare (QToF) Synapt G1 (Waters, Milford, STATI UNITI). 1 µg di proteina purificata diluita in 10 mM di Tris HCl pH 8 a 1 mg/ml è stata iniettata su una colonna analitica BEH300 C4 50 mm x 2,1 mm, con granulometria di 1,7 µm tenuta a 65 °C (Waters, Milford, STATI UNITI). La proteina è stata eluita a una portata costante di 0,15 mL/min usando un gradiente binario di 5 minuti; il solvente B è stato inizialmente aumentato dal 5 al 95% in 1 minuto, ridotto al 20% in 2 minuti e riportato al 5% in altri 2 minuti. La colonna è stata pulita prima della successiva iniezione mediante oscillazione tra solvente B alto (95%) e basso (5%) per 5 minuti. I solventi A (acqua) e B (acetonitrile) sono stati integrati con acido trifluoroacetico allo 0,01% (v/v) e acido formico allo 0,1% (v/v). Gli spettri sono stati acquisiti tra 500-4500 m/z. Parametri chiave strumentali incluse modalità di ionizzazione positiva, tensione sorgente: 3,4 kV, tensione del cono campione: 50 V, temperatura sorgente: 140 °C, temperatura di desolvatazione: 400 °C.

BioPharmaLynx (Waters, Milford, STATI UNITI) è stato usato per la deconvoluzione degli involuppi di carica.

La **Figura 20** mostra la massa intatta di PBS rispetto a IL-33 trattata con IMDM determinata mediante LC-MS. IL-33 trattata con IMDM ha mostrato una perdita di 4 Da rispetto a IL-33 trattata con PBS compatibile con la formazione di due legami disolfuro.

Mappatura di legame disolfuro

Per ciascun campione, sono stati preparati 50 µg di proteina a 3 mg/ml in 100 mM di fosfato di sodio, 1 mM di N-etilmaleimide, tampone a pH 7,0 e incubati per 20 minuti a temperatura ambiente. I campioni disidratati sono stati risospesi in 7 M di Guanidina HCl, 100 mM di NaCl, 10 mM di fosfato di sodio e incubati a 37 °C per 30 minuti. La proteina denaturata è stata diluita in 0,3 mg/ml e fatta digerire con Glu-C in un rapporto E:S di 1:50 in 2 M di Guanadina, 100 mM di fosfato di sodio, 0,1 mM di EDTA, pH 7,0 a 37 °C. Dopo 2 ore al secondo, è stata aggiunta uguale aliquota di Lys-C. Dopo altre 2 ore il digest è stato diviso; per l'analisi ridotta il digest è stato incubato con 50 mM di Ditiotreitolo per 15 minuti a temperatura ambiente. Campioni ridotti e non ridotti sono stati analizzati mediante RP LC-MS usando un UPLC Acquity accoppiato a uno spettrometro di massa QToF Synapt G2 (Waters, Milford, STATI UNITI). Per ciascun campione, 5 µg di digest di Lys-C sono stati iniettati su una colonna analitica BEH300 C18 150 mm x 2,1 mm, con granulometria di 1,7 µm, tenuta a 55 °C (Waters, Milford, STATI UNITI). I peptidi sono stati eluiti a una portata costante di

0,2 mL/min usando un gradiente binario di 75 minuti; il solvente B è stato aumentato dallo 0% al 35%. La colonna è stata pulita prima della successiva iniezione mediante oscillazione tra solvente B alto (95%) e basso (5%) per 5 minuti. I solventi A (acqua) e B (acetonitrile) sono stati integrati con acido trifluoroacetico allo 0,02% (v/v). Gli spettri sono stati acquisiti tra 50-2000 m/z usando una modalità di acquisizione indipendente dai dati. Gli spettri a bassa e alta energia sono stati elaborati usando BioPharmaLynx (Waters, Milford, STATI UNITI).

La **Figura 21** mostra la mappatura disolfuro di IL-33 umana trattata con IMDM. La **Figura 21A** mostra spettri di massa combinati e deconvoluti da analisi di mappatura del peptide Lys-C non ridotto e ridotto di IL-33 DSB. La **Figura 21B** mostra spettri isolati per peptidi contenenti cisteina. I peptidi unici per campioni ridotti e non ridotti sono evidenziati rispettivamente in verde e blu. I dati erano coerenti con la formazione di due ponti disolfuro. Una specie identificata aveva ponti tra le cisteine C208-C249 e C227-C232, rispettivamente. Tuttavia, il picco predominante non è stato risolto e potrebbero esistere altre specie. La **Figura 21C** mostra sequenze di peptidi legati con disolfuro identificati mediante analisi di mappatura del peptide Lys-C non ridotto e ridotto di IL-33 legato con disolfuro. I legami disolfuro sono rappresentati da due trattini (-). Gli errori di Lys-C sono rappresentati da parentesi quadre.

Analisi NMR dell'IL-33 legato al disolfuro

Sulla base della struttura riportata di IL-33 (Lingel, A. et al. Structure 17, 1398-1410 (2009); Liu, X. et al. Proc. Natl. Acad. Sci.

STATI UNITI 110, 14918-14923 (2013)), i residui di cisteina non sono sufficientemente ravvicinati poiché si verifichi un legame disolfuro senza un cambiamento conformazionale significativo. Per indagare su questa NMR è stata eseguita un'analisi di coerenza quantistica multipla eteronucleare (HMQC).

Produzione di proteine IL-33 ¹⁵N

DNA codificante per IL-33 di tipo selvatico con tag 6His N-terminale e il sito di scissione della proteasi TEV (SEQ ID. 633) è stato usato per trasformare le cellule di E.coli BL21 Gold. Le cellule trasformate sono state coltivate a 37 °C in un terreno minimo M9 integrato con 5 g/L di polvere ¹⁵N -IsoGro™ fino a raggiungere un OD600 nm da 0,6 a 0,8, quando l'espressione della proteina è stata indotta mediante aggiunta di 100 mM di IPTG. Le colture sono state continuate a 18 °C per ulteriori 20 ore prima che le cellule venissero raccolte mediante centrifugazione e conservate a -80 °C. Le cellule sono state risospese in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 20 mM di Imidazolo, 5 mM di Betamercaptoetanolo contenente compresse di inibitore della proteasi completa (Roche, 11697498001), 2,5 U/ml di Benzonasi nucleasi (merck Millipore, 70746-3) e 1 mg/ml di lisozima ricombinante. Le cellule risospese sono state lisate usando un disgregatore cellulare Constant Systems a 25 kpsi e chiarificate mediante centrifugazione a 75.000 x g per 2 ore a 4 °C. IL-33 è stata purificata dal surnatante mediante cromatografia di affinità di nichel in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 20 mM di Imidazolo,

5 mM di Betamercaptoetanolo, eluendo in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 250 mM di Imidazolo, 5 mM di Betamercaptoetanolo. La proteina eluita è stata incubata con la proteasi TEV e dializzata in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 20 mM di Imidazolo, 5 mM di Betamercaptoetanolo a 4 °C. La proteina priva di tag è stata separata da IL-33 non scissa mediante cromatografia di affinità di nichel in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 20 mM di Imidazolo, 5 mM di Betamercaptoetanolo. IL-33 è stata ulteriormente purificata mediante cromatografia a esclusione dimensionale usando una colonna HiLoad 16/60 Superdex 75 (GE healthcare) in 20 mM di Fosfato di sodio pH 6,5, 100 mM di NaCl, 5 mM di Betamercaptoetanolo, usando un sistema AKTApurify FPLC (GE healthcare). Le frazioni di picco sono state analizzate mediante SDS PAGE.

Le frazioni contenenti IL-33 pura sono state raggruppate e la concentrazione misurata mediante misurazione Nanodrop A280. La proteina è stata concentrata usando un concentratore di centrifugazione di taglio di peso molecolare Amicon 10.000 fino a una concentrazione finale di 9,5 mg/ml per l'analisi NMR.

La proteina etichettata ^{15}N purificata in PBS pH 7,4 è stata incubata con un terreno IMDM al 60% a una concentrazione proteica finale di 0,28 mg/ml per 18 ore a 37 °C. Dopo 18 ore, la proteina è stata concentrata usando un concentratore di centrifugazione di taglio di peso molecolare Amicon 10.000 a una concentrazione di 0,8 mg/ml. La

proteina è stata quindi purificata mediante cromatografia a esclusione dimensionale usando un HiLoad 16/60 Superdex 75 in PBS pH 7,4. Le frazioni di picco sono state analizzate mediante SDS PAGE e le frazioni pure non aggregate sono state raggruppate. Infine, la proteina è stata concentrata usando un concentratore di centrifugazione di taglio di peso molecolare Amicon 10.000 a una concentrazione di 1,8 mg/ml (100 μ M) per l'analisi NMR.

Analisi NMR

Gli spettri NMR sono stati registrati a 298 K su uno spettrometro Bruker Avance da 600 MHz con Topspin 2.3 dotato di una criosonda TCI da 5 mm con gradienti dell'asse Z. Il campione IL33 WT etichettato ^{15}N è stato preparato come descritto con l'addizione di ossido di deuterio al 5% per consentire il bloccaggio del campione. Gli spettri di correlazione ^1H - ^{15}N esemplificati sono stati acquisiti impiegando la sequenza di impulsi HMQC sofast (Schanda, P; Brutscher, B; Spettroscopia NMR bidimensionale molto veloce per l'analisi in tempo reale di eventi dinamici nelle proteine sulla scala temporale di secondi, J. Am. Chem. Soc. (2005) 127, 8014-5) con (F2xF1) 1024x64 punti complessi (in modalità TPPI a stati), larghezza di scansione 9615x1460 Hz, tempi di acquisizione 53,4 ms x 43,8 ms.

La **Figura 22A** mostra l'analisi SDS-PAGE di IL33 WT trattata con IMDM. SDS PAGE mostrando IL33 WT trattata con IMDM ridotto e non ridotto prima e dopo la concentrazione per NMR.

La **Figura 22B** mostra l'analisi NMR di IL33 WT. Sovrapposizione degli spettri HMQC ^1H - ^{15}N per 0,1 mM di IL33 WT etichettata ^{15}N prima e dopo il trattamento con i terreni IMDM tracciati rispettivamente in nero e rosso. Il confronto dei due spettri indica una struttura completamente diversa e meno ordinata a seguito di trattamento con IMDM.

Spettroscopia di dicroismo circolare (CD).

Per confermare il cambiamento conformazionale e indagare ulteriormente, è stata eseguita l'analisi Spettroscopica di dicroismo circolare (CD).

Le analisi CD lontano da UV e vicino a UV sono state eseguite su uno strumento Jasco-815 (Easton, Maryland). Per CD lontano da UV gli spettri sono stati registrati su un intervallo di lunghezze d'onda di 180-260 nm in una cuvetta con lunghezza di percorso di 1 mm alla concentrazione di campione di 0,14 mg/mL e 0,12 mg/mL rispettivamente per redIL-33 e IL-33 DSB a 20 °C in soluzione tampone di 10 mM di Fosfato pH = 6,9. Per CD vicino a UV gli spettri sono stati registrati su un intervallo di lunghezze d'onda di 260-350 nm in una cuvetta con lunghezza di percorso di 10 mm alla concentrazione di campione di 1,38 mg/mL e 0,89 mg/mL rispettivamente per redIL-33 e IL-33 DSB a 20 °C in soluzione tampone di DPBS. Gli spettri CD della soluzione tampone sono stati registrati e sottratti da tutti gli spettri campione per correggere gli effetti dello strumento, della cuvetta e della

linea di base. Il software CD Pro è stato impiegato per la deconvoluzione degli spettri in elementi strutturali secondari.

Figura 22C: Spettroscopia di dicroismo circolare (CD) vicino UV. Gli spettri sono stati registrati su un intervallo di lunghezze d'onda di 260-350 nm. Gli spettri finali erano la media di 4 scansioni. Gli amminoacidi aromatici e le bande di assorbimento del disolfuro sono adattati da Kelly (Kelly S. M. et al. How to study protein by Circular Dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751, 119-139 (2005)) La differenza osservata nell'ellitticità attorno all'assorbimento di Trp è coerente con il cambiamento nell'ambiente del solo Triptofano (W193) che dimostra cambiamenti alla struttura terziaria in questa regione tra IL-33 ridotta e DSB. La differenza di intensità intorno a 260 nm è coerente con l'introduzione di cromofori aggiuntivi dalla formazione di legami disolfuro.

Figura 22D: Caratteristiche chiave di IL-33. Trp193, cisteine e sito di legame ST2 (Liu, X. et al. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. STATI UNITI* 110, 14918-14923 (2013)) sono indicati all'interno della struttura di IL-33 risolta (Lingel 2009)

Figura 22E: Spettroscopia di dicroismo circolare (CD) lontano da UV. Gli spettri sono stati registrati su un intervallo di lunghezze d'onda di 190-260 nm. Gli spettri finali erano la media di 8 scansioni. Gli spettri lontani da UV sono coerenti con strutture secondarie prevalentemente a β -foglietto come constatato in precedenza con

questa famiglia di proteine (Chang B. S. et al, Formation of an active dimer during storage of interleukin-1 receptor antagonist in aqueous solution. *Biophysical Journal*. 71, 3399-3406 (1996); Craig S. et al. Conformation, Stability and folding of Interleukin1 β . *Biochemistry*. 26, 3570-3576 (1987); Hailey K.L. et al. Pro-interleukin (IL)-1 β shares a core region of stability as compared with mature IL-1 β while maintaining a distinctly different configurational landscape. *J. Biol. Chem*. 284, 26137-26148 (2009); Hazudat D. et al. Purification and characterisation of Human Recombinant Precursor Interleukin 1 β . *J. Biol. Chem*. 264, 1689-1693 (1989); Meyers C.A. et al, Purification and characterization of Human recombinant interleukin-1 β . *J. Biol. Chem*. 262, 11176-11181 (1987)). Gli spettri sono significativamente diversi dimostrando un cambiamento nella struttura secondaria in IL-33 DSB, rispetto a IL-33 ridotta.

Gli spettri CD indicavano un cambiamento conformazionale significativo tra le forme di IL-33. Gli spettri di redIL-33 erano coerenti con i dati pubblicati. Gli spettri IL-33 DSB erano coerenti con una proteina strutturata che era diversa dalla forma ridotta. Per mappare le aree che possono essere più alterate tra IL-33 ridotta e DSB, abbiamo eseguito la spettrometria di massa a scambio di idrogeno/deuterio.

Spettrometria di massa a scambio di idrogeno/deuterio (HDX-MS).

Le proteine sono state diluite a 3,5 μ M in soluzione salina tamponata con fosfato, pH 7,4. Questo stock è stato usato per avviare

esperimenti di etichettatura mediante diluizione di 10 volte con solvente acquoso deuterato (10 mM di fosfato di sodio, pD 6.6). Sono stati svolti esperimenti di mappatura iniziali per assegnare le specie dagli spettri di massa alle sequenze di peptidi peptici da IL33. Ciò è stato svolto in gran parte come descritto²¹. In breve, la proteina diluita protonata è stata miscelata 1:1 con una soluzione di spegnimento (100 mM di fosfato di potassio, pH 2,55, 0,1 M di TCEP, 1 °C), in modo tale che il pH della miscela finale fosse 2,55. La proteina spenta è stata iniettata in un Waters HDX Manager con una colonna di pepsina immobilizzata (2,0 x 30 mm; Poroszyme, Life Technologies), una colonna di intrappolamento C18 (VanGuard ACQUITY BEH 2,1 x 5 mm; Waters) e una colonna analitica C18 (1,0 x 100 mm ACQUITY BEH; Waters). Le fasi mobili erano acido formico allo 0,1% in H₂O (A) e acido formico allo 0,1% in ACN (B), in modo tale che il loro pH fosse 2,55. La proteina è stata applicata alla pepsina e alle colonne di intrappolamento in 100 µl/min di tampone A ed eluita dalla colonna analitica in un gradiente lineare B del 3-40% a 40 µl/min. Le sequenze peptidiche sono state assegnate dai dati dei frammenti MSE con Protein Lynx Global Server (Waters) 3.0.2 e DynamX 3.0 (Waters). I dati di etichettatura sono stati acquisiti come per il sequenziamento, eccetto il fatto che lo spettrometro di massa è stato impostato solo per scansioni MS. I dati a livello di peptide sono stati analizzati in DynamX e MatLab (Mathworks). La **Figura 23** mostra l'analisi della spettrometria di massa a scambio di idrogeno (HX-MS) di IL-33 ridotta e DSB. La **Figura 23A** Confronto

dello scambio frazionario di idrogeno (per deuterio) in IL-33 ridotta (riquadro di sinistra) e DSB IL-33 (riquadro di destra). I dati sono mappati sulla struttura IL-33 pubblicata^(lingel 2009) in entrambi i casi a scopo di confronto. Le lacune nella copertura di sequenza in cui non è stato possibile ottenere dati sui dati HX-MS sono evidenziate in blu ardesia. Le catene laterali dei residui di cisteina vengono visualizzate come barrette. La **Figura 23B** mostra un modello strutturale di dati HX-MS differenziali sovrapposti al sito di legame ST2 (rosso e magenta).^(Liu 2013) Il blu scuro indica regioni di maggiore scambio di idrogeno in IL-33 DSB rispetto a IL-33 ridotta. Il sito di legame ST2 1 si trova nell'area di maggiore differenza nello scambio H/D ed è probabilmente stato alterato nella struttura.

Legame di IL-33 ridotta rispetto a DSB a ST2 (BIAcore)

La IL-33 legata con disolfuro è probabilmente una struttura molto diversa dalla forma di IL-33 ridotta, legante ST2 (**Figure 22, 23**), e la conversione alla forma legata con disolfuro è stata associata alla perdita di attività funzionale (**Figura 17C**). Per indagare ciò, la forma di IL-33 legata con disolfuro è stata provata in merito alla capacità di legare ST2 mediante analisi BIAcore. Il legame diretto di IL-33 al dominio extracellulare di ST2 è stato determinato mediante Risonanza plasmonica di superficie usando un BIAcore 2000 (GE healthcare). ST2 è stato immobilizzato tramite il tag Fc usando un agente di cattura Fc anti-umano (GE healthcare BR-1003-39) su un chip sensore CM5 (GE healthcare BR-1003-99) per dare una superficie stabile di

approssimativamente 150 RU. IL-33 è stato fatto fluire sulla superficie a 30 ul/min per tre minuti per determinare le costanti di associazione. La dissociazione è stata misurata facendo fluire il tampone a 30 ul/min per 15 minuti. I sensorgrammi sono stati interpretati usando un software di valutazione BIA e la cinetica è stata determinata usando sensorgrammi sottratti a doppio riferimento usando un modello di legame 1:1 (Langmuir).

La **Figura 24A** mostra il legame di redIL-33 a ST2. Vengono mostrati sensorgrammi da 7,8 nM a 0,24 nM, che danno un KD di 0,2 nM.

La **Figura 24A** mostra il legame di IL-33 (IL33-DSB) legata con disolfuro a ST2. Vengono mostrati sensorgrammi da 500 nM a 0,24 nM senza alcun legame evidente osservato.

La perdita di legame e attività di ST2 ci ha portato a ipotizzare che l'ossidazione potrebbe essere un meccanismo per terminare l'attività di IL-33 e limitare la durata delle risposte immunologiche dipendenti da ST2 in vivo.

Rilevamento delle forme di IL-33

Per accertare che la forma di IL-33 legata con disolfuro esista effettivamente in vivo, abbiamo usato tre diversi saggi di rilevamento di IL-33 commerciali (2 IL-33 umana e una IL-33 di topo). Duoset ELISA di IL-33 umana e di topo (RnD Systems) sono stati convertiti in formato MSD (Meso Scale Discovery, Rockville, MD). Le concentrazioni di rivestimento degli anticorpi di cattura erano le seguenti: pAb IL-33 anti-

topo 37,5 ug/ml; pAb anti-IL-33 umana 18 ug/mL. L'anticorpo di cattura è stato diluito in PBS con Triton X-100 allo 0,03% e 5 µl sono stati usati per rivestire a punti piastre di legame standard (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) al centro di ciascun pozzetto e lasciate disidratare per una notte a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate x3 in PBS-Tween e bloccate con 25 µl di Diluente di saggio sigillando le piastre e incubando per 30 minuti a temperatura ambiente con agitazione (450 giri/minuto). 25 µl di campioni o calibratori diluiti in Diluente di saggio sono stati trasferiti nelle piastre di saggio bloccate, che sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente con agitazione (450 giri/minuto). Le piastre sono state lavate x3 in PBS-Tween e 25 µl di reagente di rilevamento (anticorpo di rilevamento più streptavidina SulfoTag diluiti a 1 µg/ml in diluente per anticorpi). Le piastre sono state sigillate e incubate per 1 ora a RT con agitazione. Le piastre sono state lavate x3 in PBS-Tween. Sono stati aggiunti 150 µl di tampone Read T diluito per 2X in acqua distillata. Le piastre sono state lette entro 15 minuti (Meso Scale Discovery, Rockville, MD).

Il saggio di IL-33 umana Millipore (Cat # HTH17MAG-14K lotto 2159117) è stato eseguito secondo le istruzioni del fabbricatore. In breve, gli standard e i campioni di IL-33 sono stati diluiti in un tampone di saggio e incubati con biglie per 1 ora a temperatura ambiente con agitazione (500 giri/minuto), protetti dalla luce. Il contenuto dei pozzetti è stato rimosso e lavato x2 con 200 µl di tampone di lavaggio. Sono stati aggiunti 25 µl di anticorpo di rilevamento per pozzetto e le piastre

sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente. Sono stati aggiunti 25 ul di streptavidina-PE (senza lavaggio) e le piastre sono state incubate per altri 30 minuti, agitando (850 giri/minuto) e protette dalla luce. Il contenuto dei pozzetti è stato rimosso e lavato x2 con 200 ul di tampone di lavaggio. I campioni sono stati risospesi in 125 ul di tampone di saggio, coperti e agitati a 850 giri/minuto per 30 secondi. I campioni sono stati analizzati su Bio-Plex 200 (BioRad). La piastra è stata letta a un RP1 basso, contando 50 biglie per regione (regione 44) con gate di rilevamento di doppietto impostati su 5000 (basso) e 25000 (alto).

La **Figura 25** mostra l'analisi di tre saggi ELISA IL-33 commerciali per il rilevamento delle forme di IL-33 ridotta e legata con disolfuro. Viene anche mostrato l'effetto di ST2 sull'interferenza con il segnale di saggio sia per le forme ridotte sia per quelle legate al disolfuro. La **Figura 25A e B** mostra che i due saggi commerciali di IL-33 umana rilevano prevalentemente la forma di IL-33 legata con disolfuro (IL33-DSB), suggerendo che questa è la specie principale che altri hanno misurato fino ad oggi in campioni umani ex vivo. Il segnale del saggio di IL-33 "ridotta" ma non ossidata/legata con disolfuro può essere eliminato mediante l'addizione di sST2. La **Figura 25C** mostra il saggio di IL-33 di topo che rileva le forme sia ridotta sia ossidata di IL-33 di topo. Il segnale del saggio di IL-33 "ridotta" ma non ossidata può essere eliminato mediante addizione di sST2.

Poiché non siamo stati in grado di identificare un saggio commerciale specifico per la forma ridotta e attiva di ST2 di IL-33 umana, abbiamo sviluppato i nostri nuovi saggi. mAb IL330425 (SEQ ID NO. 62 e 67) o mAb IL330004 (SEQ ID NO. 12 e 17) sono stati usati come anticorpi di cattura. IL-33 catturata è stata rilevata con sST2.Fc biotinilato (R&D systems) o IL330425 biotinilato (SEQ ID NO. 62 e 67) rispettivamente. L'anticorpo di cattura è stato diluito a 150 ug/mL in PBS con Triton X-100 allo 0,03% e 5 µl sono stati usati per rivestire a punti piastre di legame standard (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) al centro di ciascun pozzetto e lasciate disidratare per una notte a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate x3 in PBS-Tween e bloccate con 25 µl di Diluente di saggio sigillando le piastre e incubando per 30 minuti a temperatura ambiente con agitazione (450 giri/minuto). 25 µl di campioni o calibratori diluiti in Diluente di saggio sono stati trasferiti nelle piastre di saggio bloccate, che sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente con agitazione (450 giri/minuto). Le piastre sono state lavate 3X in PBS-Tween e 25 µl di reagente di rilevamento (anticorpo di rilevamento più streptavidina SulfoTag diluiti a 1 µg/ml in diluente per anticorpi). Le piastre sono state sigillate e incubate per 1 ora a RT con agitazione. Le piastre sono state lavate x3 in PBS-Tween. Sono stati aggiunti 150 µl di tampone Read T diluito per 2X in acqua distillata. Le piastre sono state lette entro 15 minuti (Meso Scale Discovery, Rockville, MD).

Le **Figure 26A, B** mostrano i saggi ELISA che sono specifici per il rilevamento di redIL-33 ridotta. Non si osserva alcun rilevamento della forma legata con disolfuro.

Decorso di conversione in forma di IL-33 legata con disolfuro

I saggi che rilevano diverse forme di IL-33 come descritto sopra sono stati usati per monitorare un decorso della conversione da redIL-33 alla sua forma legata con disolfuro. 10 ug/mL di redIL-33 priva di tag sono stati incubati in siero umano al 100%, PBS/BSA all'1% o IMDM/BSA all'1% a 37 °C. Ai punti temporali $t = 0$, 15 minuti, 30 minuti, 1 ora, 2 ore, 4 ore, 6 ore, 8 ore e 24 ore un'aliquota di 10 μ l è stata rimossa e aggiunta a 90 μ l di PBS/BSA all'1% (diluizione 1 su 10 fino a 1 ug/ml), questo è stato diviso in aliquote 3 x 30 μ l e congelato rapidamente su ghiaccio secco prima di conservarlo a -80 °C. È stato anche preparato un campione $t = 0$ fresco immediatamente prima dell'analisi ELISA come controllo per il ciclo di congelamento/scongelamento. I campioni sono stati analizzati usando i saggi MSD umani (R&D Systems) e gli IL33004/IL330425-biotinilati descritti sopra per misurare rispettivamente IL-33 legata con disolfuro e ridotta. Insieme, questi saggi hanno consentito il monitoraggio della conversione dalla forma ridotta a quella disolfuro-legata di IL-33.

Per confermare il risultato degli ELISA, IL-33 nei campioni di decorso è stata analizzata mediante Western blot. I campioni sono stati sottoposti a SDS-PAGE in condizioni riducenti o non riducenti. I

campioni sono stati preparati in tampone di caricamento di gel 1x NuPAGE (Invitrogen) e denaturati a 90 °C per 3 minuti. I campioni ridotti contenevano beta-mercaptoetanolo al 2%. I campioni sono stati fatti scorrere su mini gel Bis-Tris al 12% NuPAGE Novex (Invitrogen) con tampone di scorrimento MOPS (Invitrogen) secondo le istruzioni del fabbricatore. Campioni ridotti e non ridotti sono stati fatti scorrere su gel separati. Sono stati caricati 100 pg di IL-33 per corsia. Le proteine sono state trasferite alle membrane di Nitrocellulosa (Invitrogen n° cat. IB3010-02) e rilevate mediante Western blotting con pAb anti-IL-33 (R&D systems).

La **Figura 27** mostra un decorso di IL-33 umana incubata in IMDM o siero umano. **Figura 27A:** Gli ELISA IL-33 (saggi di IL33004/IL330425-biotinilati e MSD umani R&D systems) sono stati usati per rilevare rispettivamente IL-33 ridotta e legata con disolfuro. **Figura 27B:** L'analisi Western blot è stata usata per rilevare forme di IL-33 ridotta e legata con disolfuro. La conversione alla forma di IL-33 legata con disolfuro è avvenuta rapidamente con una conversione del 50% in 1-2 ore. La scomparsa di IL-33 ridotta era ben correlata con la comparsa di IL-33 ossidata sia nell'analisi ELISA sia in quella Western blot.

Generazione di un topo transgenico IL-33 umanizzato

Per studiare il comportamento e il ciclo di vita di IL-33 endogena, abbiamo usato un topo transgenico con il gene per IL-33 di topo sostituito con il gene di IL-33 umana. Un topo transgenico IL-33

umanizzato è stato generato come descritto di seguito. In breve, frammenti genomici di topo (ottenuti dalla libreria BAC C57BL/6J RPCIB-731), un frammento genomico umano (ottenuto dalla libreria BAC RPCIB-753 umana) e caratteristiche selezionate (come siti di ricombinazione e marcatori di selezione) sono stati combinati per creare il vettore di bersagliamento (dati non mostrati).

Il vettore di bersagliamento è stato linearizzato con BstBI ed elettroporato nella linea cellulare ES Balb/cJ di TaconicArtemi (Balb/c.2) e i cloni di cellule ES sono stati selezionati con Puromicina (selezione positiva) e Gancyclovir (selezione negativa). I cloni di cellule ES resistenti alla puromicina risultanti sono stati quindi sottoposti a screening mediante una combinazione di PCR e analisi Southern per identificare cloni ES correttamente bersagliati. Questi sono stati espansi e congelati in azoto liquido.

A seguito di somministrazione di ormoni, femmine C57BL/6 superovulate sono state accoppiate con maschi C57BL/6. Le blastocisti sono state isolate dall'utero al dpc 3.5. Per la microiniezione, le blastocisti sono state poste in una goccia di DMEM con FCS al 15% sotto olio minerale. Una pipetta per microiniezione a punta piatta, piezo-attuata con un diametro interno di 12-15 micrometri è stata usata per iniettare 10-15 cellule ES BALB/c bersagliate in ciascuna blastocisti. A seguito di recupero, 8 blastocisti iniettate sono state trasferite a ciascun corno uterino di 2,5 giorni dopo il coito, femmine NMRI pseudopregnanti. Il chimerismo è stato misurato nelle chimere (G0) dal contributo del

colore del rivestimento delle cellule ES all'ospite C57BL/6 (bianco/nero). Topi altamente chimerici sono stati allevati per ceppo BALB/cJBomTac femmine mutanti per la presenza di un gene della ricombinasi Flp (ceppo Flp-Deleter). La trasmissione della linea germinale per colore del rivestimento è stata identificata dalla presenza di bianco, ceppo BALB/c, prole (G1). L'effettiva trasmissione della linea germinale è stata confermata mediante genotipizzazione PCR usando primer specifici per l'allele bersagliato (dati non mostrati).

Esistenza di forme redox di IL-33 in vivo.

Modelli di *Alternaria alternata* hanno indotto infiammazione delle vie aeree nei topi che sono stati precedentemente descritti (Kouzaki et al. J. Immunol. 2011, 186: 4375-4387; Bartemes et al J Immunol, 2012, 188: 1503-1513). Topi IL-33 maschi o femmine di tipo selvatico o umanizzati (6-10 settimane) sono stati anestetizzati brevemente con isofluorano e sono stati somministrati 25 µg di estratto di *Alternaria alternata* (ALT) (Greer, Lenoir, NC) o veicolo per via intranasale in un volume totale di 50 µl. In molteplici punti temporali dopo stimolazione con ALT, i topi sono stati anestetizzati in modo terminale con pentobarbital sodico prima del lavaggio broncoalveolare (BAL). Il liquido di lavaggio broncoalveolare (BALF) è stato raccolto mediante lavaggio (0,3 ml, 0,3 ml e 0,4 ml) tramite cannula tracheale. BALF è stato centrifugato e il surnatante è stato analizzato per la presenza di forme redox di IL-33 usando i saggi descritti sopra. Tutto il lavoro è stato compiuto secondo gli standard etici e di allevamento del

Ministero degli Interni del Regno Unito sotto l'autorità di una licenza di progetto appropriata.

La **Figura 28** mostra l'analisi di BALF da topi IL-33 umanizzati raccolti in vari punti temporali in seguito a stimolazione intranasale con ALT, usando una combinazione di molteplici saggi ELISA. **(A)** Millipore, **(B)** R&D systems e **(C)** saggi di IL330425/sST2 biotinilati sono stati usati per misurare IL-33 in presenza o assenza di sST2 (grafici a sinistra). I segnali in presenza di sST2 (segnale dalla frazione ridotta di IL-33 eliminata) sono stati confrontati con uno standard IL-33 legata con disolfuro per quantificare i livelli di IL-33 legata con disolfuro. Il segnale di IL-33 ridotta è stato calcolato come la differenza di segnale tra le misurazioni di IL-33 in presenza e in assenza di ST2, quantificato rispetto a uno standard di IL-33 ridotta. Le stime per IL-33 ridotta sono mostrate nei grafici a destra. Tutti i saggi mostrano che l'IL-33 rilasciata era prevalentemente nella sua forma ridotta con un massimo compreso tra 5 e 30 minuti, seguito da un rapido calo che diventava non rilevabile entro 120 minuti. Al contrario, IL-33-DSB è aumentata gradualmente dal tempo 0, raggiungendo un picco a 30-120 minuti e scomparendo entro 24 ore. Questi dati sono coerenti con un modello in cui IL-33 viene rilasciata in forma ridotta e quindi rapidamente ossidata in vivo in IL33-DSB.

La **Figura 29** mostra l'analisi di BALF da topi BALB/c di tipo selvatico raccolta in vari punti temporali in seguito a stimolazione intranasale con ALT. La **Figura 29A** ELISA di IL-33 di topo (R&D

systems) è stato usato per misurare IL-33 in presenza o in assenza di sST2 (IL-33 di topo trattata con terreni usata come curva standard). La **Figura 29B** I segnali in presenza di sST2 (segnale dalla frazione di IL-33 ridotta eliminata) sono stati confrontati con uno standard IL-33 di topo trattata con terreni per quantificare i livelli di IL-33 ossidata. Il segnale di IL-33 ridotta è stato calcolato come la differenza di segnale tra le misurazioni di IL-33 in presenza e in assenza di ST2, quantificato rispetto a uno standard di IL-33 di topo ridotta. I dati mostrano che IL-33 rilasciata era prevalentemente nella sua forma ridotta con un picco a 15 minuti, a cui è seguito un rapido calo divenendo non rilevabile entro 120 minuti. Al contrario, IL-33-DSB è aumentata gradualmente dal tempo 0, raggiungendo un picco a 45-60 minuti e scomparendo entro 24 ore. Questi dati sono coerenti con un modello in cui IL-33 viene rilasciata in forma ridotta e quindi rapidamente ossidata in vivo in IL33-DSB.

Esempio 5 Caratterizzazione di anticorpi anti-IL-33

H338L293 provoca un cambiamento conformazionale

L'anticorpo monoclonale H338L293 (SEQ ID NO 182 e 187), la cui generazione è descritta negli esempi 2 e 3, è un modulatore allosterico di IL-33. IL-33 può cambiare significativamente la conformazione in una forma legata con disolfuro (come descritto nell'Esempio 4). I seguenti esperimenti dimostrano che mAb H338L293 risulta destabilizzare la molecola di IL-33, favorendone il dispiegamento e accelerando la conversione nella forma legata con disolfuro. I reagenti

e le modificazioni di proteine usati nel presente documento erano come descritti negli esempi precedenti.

Saggio Sypro Orange

Sypro Orange si lega in modo aspecifico alle superfici idrofobiche e l'acqua spegne fortemente la fluorescenza di Sypro Orange. Quando una proteina si dispiega, le superfici idrofobiche esposte si legano al colorante, determinando un aumento della fluorescenza. 5uM di anticorpo sono stati incubati con 20 uM di redIL-33 a 25 °C in presenza di colorante arancione 8xSYPRO diluito da uno stock 5000x (Life technologies S-6650) in 1xDPBS. La fluorescenza (eccitazione 490 nm ed emissione 575 nm) è stata misurata ogni minuto usando un rilevatore Chromo4 Real Time (Bio-rad). Abbiamo osservato che incubando redIL-33 con l'anticorpo H338L293 e non redIL-33 o anticorpo da soli, si è verificato un aumento del segnale di fluorescenza indicativo del dispiegamento delle proteine.

La **Figura 30A** mostra le unità di fluorescenza relative a 100 minuti in seguito a incubazione di 5uM di anticorpo con 20 uM di redIL33 a 25 °C in presenza di colorante arancione 8xSYPRO. In presenza di redIL-33 H338L293, ma non di IL330004 o mAb di controllo, è aumentato il segnale fluorescente indicativo del dispiegamento delle proteine.

La **Figura 30B** mostra le unità di fluorescenza relative nel tempo in seguito a incubazione di concentrazioni variabili di H338L293 con 20uM di redIL33 a 25 °C in presenza di colorante arancione

8xSYPRO. Il segnale fluorescente aumenta all'aumentare della concentrazione di anticorpo.

Elettroforesi SDS-PAGE

Per determinare se H338L293 potesse influenzare il legame disolfuro di IL-33, IL-33 è stata monitorata in presenza di H338L293 confrontando l'analisi SDS-PAGE ridotta e non ridotta. 100 ug/ml di IL-33¹¹²⁻²⁷⁰ umana ricombinante (BK349) sono stati incubati in PBS/BSA allo 0,1% contenente 1,5 mg/ml di mAb H338L293, mAb NIP228 o senza aggiunta di un mAb. I campioni sono stati incubati per 20 ore a 37 °C in un incubatore per colture di tessuti standard. I campioni contenenti 1 ug di IL-33 sono stati analizzati mediante SDS-PAGE su gel Bis-Tris mini NuPAGE al 12% Novex (Invitrogen) in condizioni riducenti e non riducenti. In seguito, i gel SDS-PAGE sono stati lavati 3 x 5 min in ddH₂O, incubati in EzBlue (Sigma G1041, una macchia proteica a base di G-250 blu brillante di coomassie) per 1 ora e decolorati in ddH₂O fino a quando lo sfondo del gel era chiaro. Tutte le fasi di colorazione con gel sono state eseguite a temperatura ambiente su una piattaforma oscillante. I gel sono stati visualizzati usando lo scanner digitale Epsom.

La **Figura 30C** mostra l'analisi SDS-PAGE di IL-33. La preincubazione di IL-33 con H338L293, ma senza mAb di controllo o senza mAb, ha aumentato la presenza della forma di IL-33 con legante disolfuro a migrazione più rapida in condizioni non riducenti.

Inibizione della segnalazione di NFkB in Huvec da parte di IgG

La segnalazione di NFkB nelle cellule endoteliali della vena ombelicale umana in risposta a IL-33 è stata valutata mediante traslocazione nucleare della sottounità di NFkB p65/RelA, rilevata mediante colorazione di immunofluorescenza come descritto nell'Esempio 1. Le cellule sono state stimulate con concentrazioni di IL-33 variabili in presenza di molteplici concentrazioni di anticorpo H338L293 di prova per 30 minuti o 6 ore.

La **Figura 31** mostra l'effetto di H338L293 sulla traslocazione di NFkB stimolata da IL-33 su HUVEC. Questi risultati mostrano che, come constatato in precedenza, H338L293 non ha inibito la traslocazione nucleare di NFkB p65/RelA in Huvec stimulate con IL-33 30 minuti dopo la stimolazione. Tuttavia, trascorse 6 ore è stata constatata l'inibizione. I risultati sono coerenti con l'impossibilità di H338L293 di inibire direttamente il legame di IL-33 a ST2 ma con la capacità di convertire IL-33 in una forma non-ST2 entro poche ore.

Inibizione di legame di IL-33 a ST2 mediante IgG purificata

La capacità di H338L293 di inibire il legame di IL-33 con tag FLAG®His al recettore ST2 è stata valutata in un saggio di competizione biochimico HTRF® (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International) come descritto nell'Esempio 1. Sono state provate due condizioni. In primo luogo, l'anticorpo e IL-33 sono stati aggiunti simultaneamente al saggio esattamente come

nell'Esempio 1. Come in precedenza, le preparazioni di IgG purificata non erano in grado di inibire l'interazione IL-33:ST2 alle concentrazioni provate. In secondo luogo, H338L293 è stato preincubato con IL-33FLAG®His per 18 ore prima dell'addizione al saggio. In questo caso è stata osservata l'inibizione dipendente dalla concentrazione del legame IL-33:ST2. Presi insieme questi dati sono coerenti con la conversione da parte di H338L293 di IL-33 in una forma di legame non ST2 nel tempo.

La **Figura 32** mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotta dal legame di IL-33 umana a ST2 umano con concentrazioni crescenti di H338L293, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è il legame specifico percentuale. Questi risultati mostrano che H338L293 inibisce il legame di IL-33 a ST2 solo dopo una prolungata pre-incubazione con il ligando.

Mappatura di epitopo

È stata tentata la mappatura di epitopo di IgG di H338L293 per chiarire la modalità di legame di IL-33 a questa IgG. Sono stati eseguiti esperimenti di Cromatografia a esclusione dimensionale (SEC) al fine di osservare la formazione di complessi IL-33:IgG. Una colonna BioSep-SES-S 2000 (300 x 7,4 mm, codice articolo 550331-4) è stata equilibrata con PBS di Dulbecco a 0,5 mL min⁻¹ su HPLC Agilent HP1100. I picchi sono stati rilevati usando il segnale di 280 nm da un Rilevatore a matrice di diodi (DAD). Questi studi hanno confermato che la formazione del complesso anticorpo-antigene era alquanto lenta e

richiedeva almeno svariate ore. Una volta concesso il tempo sufficiente per la formazione del complesso completo, la tripsina è stata aggiunta ai complessi IL-33:IgG preformati, seguita da analisi SEC. La digestione con tripsina di 36 minuti ha comportato un aumento del tempo di ritenzione del picco principale a 14,1 minuti (intermedio tra il tempo di eluizione del picco del complesso non trattato (13,6 min) e l'eluizione di IgG di H338L292 intatta (14,4 min)). I metodi di spettrometria di massa sono stati quindi usati per identificare l'epitopo minimo di IgG di H338L293. Le masse osservate mediante MS MALDI-TOF Shimadzu dal picco di 14,1 min catturato erano di 3.209 e 4.485,3 Da. Le masse osservate mediante MS ABI4800 MALDI-TOF erano di 3.208,9 Da a un picco ad alta intensità con un picco secondario di 4.486,4 Da anche presente. La massa di ioni precursori osservata di 3206-3208 Da e l'analisi di frammentazione ABI4800 MS/MS degli ioni precursori di 3.206 Da corrispondeva al frammento tritico IL-33 previsto MLMVTLSPKDFWLHANNKEHSVELHK. Ciò rientra nella sequenza primaria complessiva di IL-33-Flag His10 r umana (SEQ ID NO. 627)

come mostrato di seguito:

```
MSITGISPITEYLASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVEDLKKDEKKDKVLLSYYESQHPSNE
SGDGVDGKMLMVTLSPKDFWLHANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNMHSNCVS
FECKTDPGVFIGVDNHLALIKVDSSENLCTENILFKLSETNPAFLYKVVGAAADYKDDDD
KAAHHHHHHHHHH
```

Il peptide identificato insieme a un troncato (LSPTKDFWLHANNKEHSVELHK) e alle varianti rimescolate di entrambi, sono stati quindi sintetizzati chimicamente e usati negli studi di associazione di conferma T100 Biacore (GE Healthcare). La proteina

G' (Sigma Aldrich, P4689) è stata accoppiata in modo covalente alla superficie di un chip sensore CM5 (GE Healthcare) usando reagenti di accoppiamento amminico standard secondo le istruzioni del fabbricatore. La superficie della proteina G' è stata usata per catturare H338L293 o ST2-Fc tramite il dominio Fc per fornire una densità di superficie di circa 290RU per ciclo. I peptidi di IL33 preparati in tampone HBS-EP+, a un intervallo di concentrazioni, sono stati fatti passare sulla superficie del chip del sensore. La superficie è stata rigenerata usando due lavaggi di Glicina da 10 mM con pH 1,7 e pH 1,5 tra ciascuna iniezione di anticorpo. I sensorgrammi risultanti sono stati valutati usando il software di valutazione Biacore T100 2.0.3 (GE Healthcare) e adattati a un modello di legame Langmuir 1:1, per fornire dati di legame relativi.

Il peptide dell'epitopo sintetico a lunghezza intera si è fortemente legato a IgG di H338L293 ma non al recettore di IL-33 (ST2-Fc). Sia il peptide sintetico a lunghezza intera sia quello troncato si legavano fortemente a H338L293, ma contrariamente alle versioni a lunghezza intera rimescolato e troncato. Questa è una forte prova che il frammento di IL-33 identificato dall'escissione del peptide non è un artefatto e rappresenta il nucleo dell'epitopo di H338L293. 0,625 - 20 nM del peptide troncato sono stati fatti fluire su IgG di H338L293 per stimare l'affinità. Sono stati ottenuti accoppiamenti 1:1 di buona qualità con un valore K_D di 2,36 nM.

La **Figura 33** mostra la mappatura dell'epitopo di H338L293. Il riquadro superiore mostra l'analisi SEC di complessi IL33:IgG con H338L293 prima e dopo la digestione con tripsina. Il riquadro inferiore mostra il peptide troncato che è stato determinato per legarsi fortemente a H338L293 di colore nero all'interno della struttura di IL-33 descritta da Lingel et al 2009.

Esempio 6 Mutanti Cys → Ser di IL-33

Per comprendere il ruolo delle quattro cisteine libere di IL-33 umana nella sua conversione alla forma legata con disolfuro, abbiamo generato un panel completo di tutti i possibili mutanti da Cys a Ser. La maggior parte di queste molecole mutanti di IL-33 ha mostrato un'attività iniziale simile attraverso ST2 rispetto a IL-33 di tipo selvatico. A seguito di incubazione in terreni, i mutanti non hanno mostrato una migrazione gel più rapida, coerente con la mancanza di capacità di formare 2 legami disolfuro. Tuttavia, la perdita di potenza dopo il trattamento con i terreni variava tra i mutanti.

Generazione di cisteina di IL-33 in panel di mutante di serina

Molecole di cDNA codificanti per il componente maturo di IL-33 umana (112-270); numero di adesione (Swiss-Prot) O95760 e una serie di varianti con 1, 2, 3 o 4 residui di cisteina mutati in serina in tutte le combinazioni (15 in totale) sono state sintetizzate mediante PCR di estensione del primer e clonate in pJexpress404 (DNA 2.0). Le sequenze codificanti per IL-33 di tipo selvatico (WT) e mutante sono

state modificate per contenere un sito di scissione della proteasi 10xhis, Avitag e Fattore-Xa (MHHHHHHHHHHAAGLNDIFEAQKIEWHEAAIEGR) nel terminale N delle proteine.

Il DNA codificante per i mutanti IL-33 è stato usato per trasformare le cellule di E.coli BL21 Gold. Le cellule trasformate sono state coltivate a 37 °C fino a raggiungere un OD_{600 nm} da 0,3 a 0,5. Le colture sono state quindi coltivate a 18 °C fino a raggiungere un OD_{600 nm} compreso tra 0,6 e 0,8, quando l'espressione della proteina è stata indotta mediante addizione di 100 mM di IPTG. Le colture sono state continuate a 18 °C per altre 20 ore prima che le cellule venissero raccolte mediante centrifugazione e conservate a -80 °C.

Le cellule sono state risospese in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 20 mM di Imidazolo, 5 mM di Betamercaptoetanolo contenente compresse di inibitore della proteasi completa (Roche, 11697498001), 2,5u/ml di Benzonasi nucleasi (merck Millipore, 70746-3) e 1 mg/ml di lisozima ricombinante. Le cellule risospese sono state lisate usando un disgregatore cellulare Constant Systems a 25 kpsi e chiarificate mediante centrifugazione a 75.000 x g per 2 ore a 4 °C. IL33 è stato purificato dal surnatante mediante cromatografia di affinità di nichel in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 20 mM di Imidazolo, 5 mM di Betamercaptoetanolo, eluendo in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 250 mM di Imidazolo, 5 mM di Betamercaptoetanolo. IL33 è stata ulteriormente

purificata mediante cromatografia a esclusione dimensionale usando una colonna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) in Soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4. Le frazioni di picco sono state analizzate mediante SDS PAGE. Le frazioni contenenti IL33 pura sono state raggruppate e la concentrazione misurata mediante misurazione Nanodrop A280. Campioni finali sono stati analizzati mediante SDS PAGE e spettrometria massa intatta. La proteina è stata sottoposta a congelamento rapido in azoto liquido.

Tabella 17. Sequenze di mutante IL-33

Mutante	Posizione 208	Posizione 227	Posizione 232	Posizione 259	AA.112- 270
IL33-01	C	C	C	C	SEQ ID NO: 632
IL33-02	S	C	C	C	SEQ ID NO: 634
IL33-03	C	S	C	C	SEQ ID NO: 635
IL33-04	C	C	S	C	SEQ ID NO: 636
IL33-05	C	C	C	S	SEQ ID NO: 637
IL33-06	S	S	C	C	SEQ ID NO:638

Mutante	Posizione 208	Posizione 227	Posizione 232	Posizione 259	AA.112- 270
IL33-07	C	C	S	S	SEQ ID NO: 639
IL33-08	S	C	S	C	SEQ ID NO: 640
IL33-09	C	S	C	S	SEQ ID NO: 641
IL33-10	C	S	S	C	SEQ ID NO: 642
IL33-11	S	C	C	S	SEQ ID NO: 643
IL33-12	S	S	S	C	SEQ ID NO: 644
IL33-13	S	S	C	S	SEQ ID NO: 645
IL33-14	S	C	S	S	SEQ ID NO: 646
IL33-15	C	S	S	S	SEQ ID NO: 647
IL33-16	S	S	S	S	SEQ ID NO: 648

Attività di mutanti di IL-33 Cys→4Ser

Per verificare l'integrità della proteina, l'attività di IL-33 di tipo selvatico non trattata (IL33-01) e dei mutanti di IL-33 è stata misurata in un saggio di segnalazione dipendente da ST2. La segnalazione di NPkB nelle cellule endoteliali della vena ombelicale umana (Huvec) in risposta a IL-33 è stata valutata mediante traslocazione nucleare della sottounità di NFkB p65/RelA rilevata mediante colorazione di immunofluorescenza come descritto nell'Esempio 1. Per indagare sulla perdita di attività a seguito di trattamento con terreni di coltura cellulare, le proteine IL-33 01-16 sono state incubate per una notte in un Terreno Iscove modificato di Dulbecco (IMDM) e valutate confrontandole con le proteine non trattate.

Tabella 18. Attività di mutanti di IL-33 in saggio di traslocazione di NFkB di HUVEC

Nome	Sequenza	IC50 (nM) non trattata	Perdita di attività a seguito di trattamento IMDM	SEQUENZA
IL33-01 (WT)	CCCC	0,13	+++	SEQ ID NO: 632
IL33-02	SCCC	0,19	++	SEQ ID NO: 634
IL33-03	CSCC	0,16	++	SEQ ID NO:

Nome	Sequenza	IC50 (nM) non trattata	Perdita di attività a seguito di trattamento IMDM	SEQUENZA
				635
IL33-04	CCSC	0,17	+	SEQ ID NO: 636
IL33-05	CCCS	0,10	++	SEQ ID NO: 637
IL33-06	SSCC	0,28	+	SEQ ID NO:638
IL33-07	CCSS	0,22	+	SEQ ID NO: 639
IL33-08	SCSC	0,21	-	SEQ ID NO: 640
IL33-09	CSCS	0,20	++	SEQ ID NO: 641
IL33-10	CSSC	0,61	+	SEQ ID NO: 642
IL33-11	SCCS	0,49	+	SEQ ID NO: 643
IL33-12	SSSC	0,39	-	SEQ ID NO: 644

Nome	Sequenza	IC50 (nM) non trattata	Perdita di attività a seguito di trattamento IMDM	SEQUENZA
IL33-13	SSCS	0,08	+	SEQ ID NO: 645
IL33-14	SCSS	0,14	-	SEQ ID NO: 646
IL33-15	CSSS	0,12	-	SEQ ID NO: 647
IL33-16	SSSS	0,17	-	SEQ ID NO: 648

La **Figura 34** mostra l'attività dei mutanti di IL-33 prima e dopo il trattamento per 18 ore con IMDM. IL-33 di tipo selvatico (IL33-01) che è stata pretrattata con terreni di coltura ha perso completamente l'attività rilevabile. Tutti i mutanti hanno mostrato una minore perdita di potenza rispetto a WT. Alcuni mutanti erano completamente protetti dalla perdita di potenza.

Rilascio di citochine mastocitarie umane

Per constatare se i mutanti fossero più potenti nello stimolare le risposte a valle in punti temporali più lunghi in vitro, è stato usato un saggio di produzione di IL-6 di mastociti per una notte per misurare l'attività di IL-33 umana di tipo selvatico e mutanti selezionati. I metodi

di saggio sono descritti nell'Esempio 2. I dati sono esemplificati da IL33-11.

La **Figura 35A** mostra che IL33-11 ha una potenza maggiore rispetto a IL-33 WT nello stimolare la produzione di IL-6 di mastociti umani. IL33-01 (WT) e IL33-11 senza trattamento antecedente sono stati usati per stimolare la produzione di IL-6 da mastociti derivati dal sangue cordonale umano a concentrazioni variabili, in cui l'asse x è la concentrazione di IL-33 in concentrazione molare e l'asse y è il livello di IL-6 rilevato nei surnatanti dopo 18 ore.

Potenza in vivo del mutante di IL-33

Topi BALB/c femmina (6-8 settimane) sono stati anestetizzati brevemente con isofluorano e trattati con 0,1-10ug di IL-33 umana di tipo selvatico (IL33-01, SEQ ID NO: 632), IL33-11 (SEQ ID NO: 643) o veicolo per via intranasale in un volume totale di 50 µl. 24 ore dopo la stimolazione, i topi sono stati anestetizzati alla fine con pentobarbital sodico prima del lavaggio broncoalveolare (BAL). BALF è stato raccolto e analizzato come descritto nell'Esempio 4.

La **Figura 35B** mostra che la somministrazione intranasale del doppio mutante di IL33-11 richiedeva solo un decimo della quantità di per una risposta IL-5 dipendente da ST2 equivalente rispetto a IL-33 nativa. Ciò è coerente con l'attività prolungata del mutante in contrasto con la più rapida inattivazione di IL-33 di tipo selvatico nell'ambiente polmonare del topo.

Analisi NMR di IL33-11

Per indagare le differenze conformazionali tra IL33-11 e la proteina IL-33 umana di tipo selvatico (IL33-01), è stata eseguita l'analisi NMR.

Produzione di proteine IL-33 ¹⁵N

DNA codificante per IL-33 di tipo selvatico con tag 6His N-terminale e il sito di scissione della proteasi TEV (SEQ ID. 633) è stato usato per trasformare le cellule di E.coli BL21 Gold. Le cellule trasformate sono state coltivate a 37 °C in un terreno minimo M9 integrato con 5 g/L di polvere ¹⁵N -IsoGro™ fino a raggiungere un OD600 nm da 0,6 a 0,8, quando l'espressione della proteina è stata indotta mediante aggiunta di 100 mM di IPTG. Le colture sono state continuate a 18 °C per ulteriori 20 ore prima che le cellule venissero raccolte mediante centrifugazione e conservate a -80 °C. Le cellule sono state risospese in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 20 mM di Imidazolo, 5 mM di Betamercaptoetanolo contenente compresse di inibitore della proteasi completa (Roche, 11697498001), 2,5 U/ml di Benzonasi nucleasi (merck Millipore, 70746-3) e 1 mg/ml di lisozima ricombinante. Le cellule risospese sono state lisate usando un disgregatore cellulare Constant Systems a 25 kpsi e chiarificate mediante centrifugazione a 75.000 x g per 2 ore a 4 °C. IL-33 è stata purificata dal surnatante mediante cromatografia di affinità di nichel in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 20 mM di Imidazolo, 5 mM di Betamercaptoetanolo, eluendo in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 250 mM di Imidazolo, 5 mM di

Betamercaptoetanolo. La proteina eluita è stata incubata con la proteasi TEV e dializzata in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 20 mM di Imidazolo, 5 mM di BetaMercaptoetanolo a 4 °C. La proteina priva di tag è stata separata da IL-33 non scissa mediante cromatografia di affinità di nichel in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 20 mM di Imidazolo, 5 mM di Betamercaptoetanolo. IL-33 è stata ulteriormente purificata mediante cromatografia a esclusione dimensionale usando una colonna HiLoad 16/60 Superdex 75 (GE healthcare) in 20 mM di Fosfato di sodio pH 6,5, 100 mM di NaCl, 5 mM di Betamercaptoetanolo, usando un sistema AKTApurify FPLC (GE healthcare). Le frazioni di picco sono state analizzate mediante SDS PAGE. Le frazioni contenenti IL-33 pura sono state raggruppate e la concentrazione misurata mediante misurazione Nanodrop A280. La proteina è stata concentrata usando un concentratore di centrifugazione di taglio di peso molecolare Amicon 10.000 fino a una concentrazione finale di 1,8 mg/ml (100µM) per l'analisi NMR.

Analisi NMR

Gli spettri NMR sono stati registrati a 298 K su uno spettrometro Bruker Avance da 600 MHz con Topspin 2.3 dotato di una criosonda TCI da 5 mm con gradienti dell'asse Z. Il campione IL33 WT etichettato ^{15}N è stato preparato come descritto con l'addizione di ossido di deuterio al 5% per consentire il bloccaggio del campione. Gli spettri di correlazione ^1H - ^{15}N esemplificati sono stati acquisiti impiegando la

sequenza di impulsi HMQC sofast (Schanda, P; Brutscher, B; Spettroscopia NMR bidimensionale molto veloce per l'analisi in tempo reale di eventi dinamici nelle proteine sulla scala temporale di secondi, J. Am. Chem. Soc. (2005) 127, 8014-5) con (F2xF1) 1024x64 punti complessi (in modalità TPPI a stati), larghezza di scansione 9615x1460 Hz, tempi di acquisizione 53,4 ms x 43,8 ms.

La **Figura 36** mostra la sovrapposizione degli spettri HMQC ^1H - ^{15}N per 0,1 mM di IL33-01 e IL33-11 etichettati con ^{15}N tracciati rispettivamente in nero e rosso. Sono indicate le assegnazioni per i residui pertinenti. I dati mostrano spostamenti di picco intorno a C208 e C259 come previsto. Tuttavia, ci sono più spostamenti di picco del previsto da T185 a A196 che potrebbero indicare un cambiamento di conformazione.

Esempio 7 Isolamento e identificazione di anticorpi anti-IL-33 che usano IL33-11

Le proteine di IL-33 Cys → ser mutanti stabilizzano IL-33 nella sua forma ridotta e hanno conformazioni diverse rispetto al tipo selvatico (come descritto nell'Esempio 6). Le proteine mutanti possono fornire la disponibilità di diversi epitopi anticorpali o una maggiore longevità/stabilità degli epitopi e possono pertanto essere utili per isolare gli anticorpi IL-33 neutralizzanti, in particolare per la forma ridotta di IL-33. Questo esempio usa la proteina mutante IL33-11 resistente all'ossidazione per isolare gli anticorpi IL-33 mediante visualizzazione dei fagi.

Proteine ricombinanti

IL33-01 N-terminale con tag His10/Avitag (WT, SEQ ID NO. 632), IL33-11 N-terminale con tag

His10/Avitag (C208S, C259S, SEQ ID 643) e IL-33 N-terminale con tag His10/Avitag di cyno (SEQ ID 649), sono stati generati trasformando cellule di E.coli BL21 (DE3). Le cellule trasformate sono state coltivate in terreni di autoinduzione (Sistema di autoinduzione 1 Overnight Express™, Merck Millipore, 71300-4) a 37 °C per 18 ore prima che le cellule fossero raccolte mediante centrifugazione e conservate a -20 °C. Le cellule sono state risospese in BugBuster (Merck Millipore, 70921-5), contenente compresse di miscela di inibitori della proteasi completa (Roche, 11697498001), 2,5u/ml di Benzonasi nucleasi (Merck Millipore, 70746-3) e 1 mg/ml di lisozima ricombinante. Il lisato cellulare è stato chiarificato mediante centrifugazione a 75.000 x g per 2 ore a 4 °C. Le IL-33 sono state purificate dal surnatante mediante Cromatografia di affinità di nichel in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 20 mM di Imidazolo, eluendo in 50 mM di Fosfato di sodio, pH 8,0, 300 mM di NaCl, 250 mM di Imidazolo. IL-33 è stata ulteriormente purificata mediante cromatografia a esclusione dimensionale usando una colonna Superdex 75 10/300 GL in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4. Le frazioni di picco sono state analizzate mediante SDS PAGE. Le frazioni contenenti IL-33 pura sono state raggruppate e la concentrazione misurata mediante misurazione

Nanodrop A280. I campioni finali sono stati analizzati mediante SDS PAGE.

Il vettore ST2 umano descritto nell'Esempio 1 è stato modificato per contenere ECD di ST2 umano con un tag Flag-His C-terminale (SEQ ID NO 650).

Tabella 19. Reagenti

Reagente	Fornitore	Numero di SEQ catalogo/progettazione	SEQ ID
IL33-01 His10/Avi umana	Di laboratorio	PS-937	SEQ ID NO. 632
IL33-11 His10/Avi umana	Di laboratorio	PS-938	SEQ ID NO. 643
IL-33 His10/Avi di Cyno	Di laboratorio	CCH 3 Aprile 2014	SEQ ID NO. 649
IL-4Rα Flag®His	Di laboratorio	020629080	
Insulina bovina - biotina	Sigma	12258	
ST2 Flag His umano	Di laboratorio	BK282	SEQ ID NO. 650
ST2.Fc umano	R&D Systems		

Modificazioni di proteine

Le proteine contenenti il motivo della sequenza Avitag (GLNDIFEAQKIEWHE) sono state biotinilate usando l'enzima biotina ligasi (BirA) (Avidty, Bulk BirA) seguendo il protocollo del fabbricatore. Tutte le IgG e le proteine modificate senza Avitag usate nel presente documento sono state biotinilate tramite ammine libere usando il collegamento EZ Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo/Pierce, 21335) come descritto nell'Esempio 1.

Selezioni

Le selezioni sono state eseguite essenzialmente come descritto nell'Esempio 1 ma usando la proteina mutante di IL33-11 C208S, C259S. In breve, le particelle del fago di scFv sono state incubate con IL-33-11 ricombinante biotinilata in soluzione (biotinilata tramite tag Avi). Le particelle sono state incubate con 100 nM di IL33-11 ricombinante biotinilata per 2 ore. Gli ScFv legati all'antigene sono stati quindi catturati su biglie paramagnetiche rivestite di streptavidina (Dynabeads®, M-280) seguendo le raccomandazioni del fabbricatore. Il fago non legato è stato lavato via in una serie di cicli di lavaggio usando PBS-Tween. Le particelle fagiche trattenute sull'antigene sono state eluite, infettate in batteri e salvate per il successivo turno di selezione. Sono stati effettuati altri due turni di selezione in presenza di concentrazioni decrescenti di IL33-11 biotinilata (50 nM e 25 nM).

Inibizione di legame di IL-33 a ST2 mediante scFv non purificato

Un numero rappresentativo di singoli cloni derivanti dagli esiti della selezione dopo due o tre turni di selezione descritti sopra è stato coltivato in piastre a 96 pozzetti. ScFv sono stati espressi nel periplasma batterico (Kipriyanov, et al. J Immunol Methods 200 (1-2): 69-77 (1997)) e sottoposti a screening per la loro attività inibitoria in un saggio di legame basato su IL-33:ST2 FRET omogeneo (trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza) HTRF® (Fluorescenza omogenea a risoluzione temporale, Cisbio International). Essenzialmente i metodi erano simili a quelli descritti nell'Esempio 1. In questo saggio, i campioni sono sottoposti a competizione con ST2 umano con tag FLAG®His per il legame a IL33-01 umana biotinilata (IL33-01, SEQ ID No. 632) (di tipo selvatico) o IL33-11 umana biotinilata (IL33-11, SEQ ID No. 643).

Campioni di anticorpo anti-IL-33 non purificati sono stati provati per l'inibizione del legame di IL-33 biotinilata con tag FLAG®His a ST2 aggiungendo 5 microlitri di ciascuna diluizione del campione di prova di anticorpo a una piastra di saggio a basso volume da 384 pozzetti (Costar, 3673). Successivamente, è stata preparata una soluzione contenente 4 nM di ST2 con tag FLAG®His e 5 nM di rilevamento anti-FLAG® XL665 (Cisbio International, 61FG2XLB) e 2,5 microlitri della miscela sono stati aggiunti alla piastra di saggio. A ciò è seguita l'addizione di 2,5 microlitri di una soluzione contenente 2,4 nM di IL33-01 umana biotinilata o IL33-11 combinata con 1,5 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB). Tutte le

diluizioni sono state eseguite in un tampone di saggio contenente 0,8 M di fluoruro di potassio (VWR, 26820.236) e albumina di siero bovino allo 0,1% (BSA, PAA, K05-013) in PBS di Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Le piastre di saggio sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente e la fluorescenza a risoluzione temporale è stata letta a lunghezze d'onda di emissione di 620 nm e 665 nm usando un lettore di piastre EnVision (Perkin Elmer). Le piastre sono state incubate per ulteriori 16 ore (una notte) a 4 gradi Celsius e la fluorescenza a risoluzione temporale è stata letta di nuovo. Il controllo negativo (legame aspecifico) è stato definito sostituendo IL33-01 biotinilata umana o IL33-11 combinata con il rilevamento di criptato di streptavidina solo con il rilevamento di criptato di streptavidina. I dati sono stati analizzati come descritto nell'Esempio 1.

Inibizione di legame di IL-33 a ST2 mediante scFv purificato

I cloni Fv a catena singola che hanno mostrato un effetto inibitorio sull'interazione IL-33:ST2 come estratti periplasmici non purificati in entrambi i punti temporali sono stati sottoposti a sequenziamento del DNA (Osbourn, et al. Immunotechnology 2(3):181-96 (1996); Vaughan, et al. Nat Biotechnol 14(3):309-14 (1996)). Gli scFv unici sono stati espressi di nuovo nei batteri e purificati mediante cromatografia per affinità (come descritto in WO01/66754). Le potenze di questi campioni sono state determinate mediante competizione con una serie di diluizioni della preparazione purificata contro il legame di ST2 umano con tag FLAG®His a IL33-01 biotinilata o IL33-11 biotinilata

come descritto sopra. Le piastre di saggio sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente (1 ora di incubazione), oppure le piastre di saggio sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente seguita da 16 ore a 4 gradi Celsius (incubazione di una notte). Sono stati selezionate preparazioni di scFv purificato che erano in grado di inibire l'interazione IL-33:ST2 in entrambi i punti temporali per la conversione in formato IgG.

La **Figura 37A**: mostra l'inibizione del segnale FRET a seguito di incubazione di 1 ora, prodotta dal legame di IL-33-01 umana a ST2 umano con concentrazioni crescenti di anticorpo di scFv di IL-33 33v20064, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è il legame specifico percentuale.

La **Figura 37B**: mostra l'inibizione del segnale FRET a seguito di incubazione di 1 ora, prodotta dal legame di IL33-11 a ST2 umano con concentrazioni crescenti di anticorpo di scFv di IL-33 33v20064, in cui l'asse x è la concentrazione dell'anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è un legame specifico percentuale.

La **Figura 37C**: mostra l'inibizione del segnale FRET a seguito di incubazione di una notte, prodotta dal legame di IL-33-01 umana a ST2 umano con concentrazioni crescenti di anticorpo di scFv di IL-33 33v20064, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è un legame specifico percentuale.

La **Figura 37D**: mostra l'inibizione del segnale FRET a seguito di incubazione di una notte, prodotta dal legame di IL33-11 a ST2

umano con concentrazioni crescenti di anticorpo di scFv di IL-33 33v20064, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è un legame specifico percentuale.

Riformattazione di scFv in IgG1

Preparazioni di scFv purificato che erano in grado di inibire l'interazione IL-33:ST2 sono state convertite in un formato di anticorpo di immunoglobulina intera G1 (IgG1) come descritto nell'Esempio 1. Anticorpi che hanno inibito in misura simile o maggiore IL330004 (Esempio 1, SEQ ID NO 12 e 17) sono stati riproposti per ulteriori analisi. Tali anticorpi sono esemplificati da 33v20064. SEQ ID NO corrispondenti alle varie regioni dell'anticorpo 33v20064 sono mostrate nella **Tabella 20**.

Tabella 20. Sequenze di anticorpo Anti-IL-33

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
33v20064	SEQ ID NO: 272	SEQ ID NO: 277	SEQ ID NO: 273	SEQ ID NO: 278
			SEQ ID NO: 274	SEQ ID NO: 279
			SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 280

Inibizione di legame di IL-33 a ST2 mediante IgG purificata

La capacità degli anticorpi anti-IL-33 di inibire il legame di IL-33-01 con tag FLAG®-His biotinilata al recettore ST2 è stata valutata in un saggio di competizione biochimico HTRF® (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International), i cui principi sono descritti sopra. L'attività delle preparazioni di IgG purificata è stata determinata facendo competere una serie di diluizioni di IgG purificata contro ST2 con tag FLAG®-His umano per il legame a IL-33-01 umana biotinilata umana (SEQ ID No. 632).

La **Figura 38A**: mostra l'inibizione del segnale FRET a seguito di incubazione di 1 ora, prodotta dal legame di IL-33 umana biotinilata a ST2 con concentrazioni crescenti di anticorpo di IgG1 di 33v20064, dove l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è un legame specifico percentuale.

La **Figura 38B**: mostra l'inibizione del segnale FRET a seguito di incubazione di una notte, prodotta dal legame di IL-33 umana a ST2 umano con concentrazioni crescenti di anticorpo di IgG1 33v20064, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è un legame specifico percentuale.

Inibizione di produzione di IL-6 di Huvec da parte di IgG

33v20064 è stato valutato per l'inibizione della produzione di IL-6 stimolata da IL-33 in HUVEC, i cui metodi sono descritti nell'Esempio 2. IL-33 His-Avi umana di tipo selvatico (IL33-01, SEQ ID No. 632) (30 ng/mL) o IL-33 His-Avi mutante (IL33-11, SEQ ID No. 643) (30ng/mL)

sono state usate per stimolare le HUVEC in presenza di concentrazioni variabili di anticorpi di prova.

La **Figura 39A**: mostra l'inibizione della produzione di IL-6 da HUVEC stimulate da IL33-01 (WT) mediante l'anticorpo 33v20064 rispetto a IL330004 e all'anticorpo di controllo negativo di IgG1 anti-NIP, NIP228, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è la risposta massima in percentuale. 33v20064 ha mostrato una parziale inibizione della risposta a IL-33 WT ad alte concentrazioni di anticorpi, mentre IL330004 non ha mostrato alcun effetto.

La **Figura 39B**: mostra l'inibizione della produzione di IL-6 da HUVEC stimulate da IL33-11 mediante l'anticorpo 33v20064 rispetto a IL330004 e all'anticorpo di controllo negativo di IgG1 anti-NIP, NIP228, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è la risposta massima in percentuale. 33v20064 ha mostrato un'inibizione più completa della produzione di IL-6 stimolata dal mutante IL33-11 rispetto a IL330004.

Reattività crociata degli anticorpi anti-IL-33

La reattività crociata dell'anticorpo anti IL-33 33v20064 è stata determinata usando un saggio basato su legame IL-33:mAb omogeneo FRET (trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza) HTRF® (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International). In questo saggio, i campioni sono stati sottoposti a competizione con IL-

33-01 umana biotinilata (SEQ ID No. 632) per il legame a IgG di 33v20064 etichettato DyLight.

Tabella 21: Reagenti di saggio FRET

Reagente	Fornitore	Numero di SEQUENZA catalogo/progettazione	
IL-33 Flag®His umana	Di laboratorio	PS-582	SEQ ID No. 627
IL-33 Flag®His di topo	Di laboratorio	BK-265	SEQ ID No. 628
IL-33 Flag®His di Cynomolgus	Di laboratorio	PS-368	SEQ ID No. 629
B7H3 Avi-His	Di laboratorio	DBPur125	
IL-1 alfa umana	R&D Systems	201-LB/CF	
IL-1 beta umana	R&D Systems	200-LA/CF	

IL-33 FLAG®His umana, di cyno e di topo (descritte nell'Esempio 1) sono state provate per l'inibizione del legame di IL-33 umana a 33v20064 etichettato DyLight aggiungendo 5 microlitri di ciascuna diluizione del campione di IL-33 a una piastra di saggio a basso volume da 384 pozzetti (Costar, 3673). Successivamente, è stata

preparata una soluzione contenente 20 nM di 33v20064 etichettato Dylight e 2,5 microlitri sono stati aggiunti alla piastra di saggio (etichettata usando il kit (Innova Biosciences, 326-0010) secondo le istruzioni del fabbricatore). A ciò è seguita l'addizione di 2,5 microlitri di una soluzione contenente 1,2 nM di IL-33-01 umana biotinilata combinata con 1,5 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB). Tutte le diluizioni sono state eseguite in un tampone di saggio contenente 0,8 M di fluoruro di potassio (VWR, 26820.236) e albumina di siero bovino allo 0,1% (BSA, PAA, K05-013) in PBS di Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Le piastre di saggio sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente e la fluorescenza a risoluzione temporale è stata letta a lunghezze d'onda di emissione di 620 nm e 665 nm usando un lettore di piastre EnVision (Perkin Elmer). I dati sono stati analizzati calcolando il rapporto di 665/620 nm seguito dai valori Delta F in % per ciascun campione. Il rapporto di 665/620 nm è stato usato per correggere l'interferenza di campione usando l'Equazione 1. Il Delta F in % per ciascun campione è stato quindi calcolato usando l'Equazione 2. Il controllo negativo (legame aspecifico) è stato definito sostituendo IL-33 biotinilata umana combinata con il rilevamento del criptato di streptavidina solo con il rilevamento di criptato di streptavidina. I valori Delta F in % sono stati successivamente usati per calcolare il legame specifico in % come descritto nell'Equazione 3. Valori di IC₅₀ sono stati determinati usando il software GraphPad Prism mediante adattamento della curva usando

un'equazione logistica a quattro parametri (Equazione 4). Questi risultati hanno dimostrato che 33v20064 ha una reazione crociata con IL-33 di cynomolgus. 33v20064 ma non ha mostrato competizione con IL-33 di topo.

La **Figura 40A**: mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotta dal legame di IL-33-01 umana biotinilata a 33v20064 etichettato DyLight, con concentrazioni crescenti di proteine di prova, in cui l'asse x è la concentrazione del campione di prova in concentrazione molare e l'asse y è un legame specifico percentuale. L'inibizione del segnale FRET è stata osservata con IL-33 umana e di cynomolgus, ma non di topo.

Selettività di anticorpi anti-IL-33

La selettività dell'anticorpo anti IL-33 33v20064 è stata determinata usando un saggio basato sul legame IL-33:mAb FRET omogeneo (trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza) HTRF® (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International). In questo saggio, i campioni sono stati sottoposti a competizione con IL-33 umana His-Avi biotinilata (IL33-01, SEQ ID No. 632) per il legame a IgG di 33v20064 di tipo selvatico etichettato DyLight. IL-1 alfa umana e IL-1 beta umana sono state provate per l'inibizione del legame di IL-33-01 biotinilata a 33v20064 etichettato DyLight come descritto sopra. Questi risultati hanno dimostrato che 33v20064 non mostrava competizione con IL-1 alfa o IL-1 beta umana.

La **Figura 40B**: mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotta dal legame di IL-33-01 umana biotinilata a 33v20064 etichettato DyLight, con concentrazioni crescenti di proteine di prova, in cui l'asse x è la concentrazione del campione di prova in concentrazione molare e l'asse y è un legame specifico percentuale. L'inibizione del segnale FRET non è stata osservata con IL-1 alfa o IL-1 beta umane.

Esempio 8 Ottimizzazione di anti-IL-33 di Ab di 33v20064

Regioni di intelaiatura di linea germinale di 33v20064

Le sequenze amminoacidiche dei domini V_H e V_L dell'anticorpo genitore 33v20064 sono state allineate alle sequenze germinali umane note nel database IMGT (Lefranc, M. P. et al. Nucl. Acids Res. 2009. 37(Database issue): D1006-D1012), e la linea germinale più vicina è stata identificata mediante somiglianza di sequenza. Per i domini V_H della linea di anticorpi 33v20064 questa era IGHV3-23⁰¹. Per i domini V_L era IGLV3-1. La germinazione è stata compiuta su 33v20064 prima del processo di maturazione di affinità. Senza considerare i residui di Vernier (Foote 1992), a cui non sono stati apportati cambiamenti, c'erano 6 residui nelle intelaiature dei domini V_L di 33v20064 che differivano dalla linea germinale, 5 dei quali sono stati ripristinati alla sequenza germinale più vicina usando il metodo di mutagenesi di Kunkel (Clackson, T. e Lowman, H.B. Phage Display - A Practical Approach, 2004. Oxford University Press) con i primer mutagenici appropriati. Il prodotto di questa germinazione era 33_640001. I numeri ID di sequenza sono descritti nella Tabella 22.

Tabella 22. Sequenze di linea germinale di anticorpo

33v20064

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
33_640001	SEQ ID NO: 282	SEQ ID NO: 287	SEQ ID NO: 283	SEQ ID NO: 288
			SEQ ID NO: 284	SEQ ID NO: 289
			SEQ ID NO: 285	SEQ ID NO: 290

Inibizione di legame di IL-33 a ST2 mediante scFv purificato

L'attività di 33_640001 è stata confrontata con il suo genitore non germinato, 33v20064. La capacità degli anticorpi di scFv di inibire il legame di IL-33 umana His Avi biotinilata (IL33-01, SEQ ID No. 632) al recettore ST2 con tag FLAG®-His è stata valutata in un saggio di competizione HTRF® biochimico (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International) come descritto nell'Esempio 7.

La **Figura 41A**: mostra l'inibizione del segnale FRET a seguito di incubazione di 1 ora, prodotta dal legame di IL-33 umana a ST2 umano con concentrazioni crescenti di anticorpi di scFv, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è un

legame specifico percentuale. 33_640001 aveva un'attività equivalente al suo genitore non germinato.

La **Figura 41B**: mostra l'inibizione del segnale FRET a seguito di incubazione di una notte, prodotta dal legame di IL-33 umana a ST2 umano con concentrazioni crescenti degli anticorpi di scFv, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è un legame specifico percentuale. 33_640001 aveva un'attività equivalente al suo genitore non germinato.

Maturazione di affinità

33v20064 è stato ottimizzato usando un approccio bersagliato di mutagenesi e selezioni di visualizzazione dei fagi basate sull'affinità. Grandi librerie di fagi di scFv derivate dal genitore germinato (33_640001) sono state create mediante mutagenesi diretta da oligonucleotidi della regione determinante la complementarità 3 (CDR3) a catena variabile pesante (V_H) e leggera (V_L) usando tecniche di biologia molecolare standard come descritto (*Clackson 2004*). Per la CDR3 V_H , le due posizioni Vernier che precedono le CDR definite da Kabat (vale a dire, le posizioni V_H 93 e 94) sono state anch'esse incluse per la potenziale ottimizzazione nell'approccio della mutagenesi bersagliata. Le librerie sono state sottoposte a selezioni di visualizzazione dei fagi basate sull'affinità al fine di selezionare varianti con maggiore affinità per IL-33 umana. Queste selezioni sono state compiute alternando IL-33 umana His-Avi biotinilata di tipo selvatico (IL33-01, SEQ ID NO. 632) e antigeni di IL-33 mutante His Avi

biotinilata (IL33-11, SEQ ID NO. 643) in turni sequenziali, o con l'antigene di IL33-11 biotinilata da solo in tutti i turni. Le selezioni sono state eseguite essenzialmente come descritto in precedenza (*Thompson 1996*). In breve, le particelle del fago scFv sono state incubate con l'antigene biotinilato ricombinante in soluzione. I fagi di ScFv legati all'antigene sono stati quindi catturati su biglie paramagnetiche rivestite di streptavidina (Dynabeads® M-280) seguendo le raccomandazioni del fabbricatore. Le particelle di fagi di scFv selezionate sono state quindi salvate come descritto in precedenza (Osbourn, J.K., et al. *Immunotechnology*, 1996. 2(3): pagine 181-96), e il processo di selezione è stato ripetuto in presenza di concentrazioni alternate e decrescenti di antigene biotinilato, tipicamente da 50 nM a 10 pM in cinque turni di selezione.

33v20064 è stato anche ottimizzato usando la tecnologia di visualizzazione dei ribosomi essenzialmente come descritto da Hanes *et al.* (Hanes, J., et al. *Methods in Enzymology*, 2000. 328: pagine 404-30). Il clone di scFv genitore 33v20064 è stato usato come un modello per la costruzione della libreria e la conversione in un formato di visualizzazione di ribosoma per le selezioni successive. A livello di DNA, un promotore T7 è stato aggiunto all'estremità 5' per una trascrizione efficiente nell'mRNA. A livello di mRNA, il costrutto conteneva un sito di legame del ribosoma procariotico (sequenza di Shine-Dalgarno). All'estremità 3' della catena singola, il codone di arresto è stato rimosso ed è stata aggiunta una porzione di batteriofago V13 gIII (gene III) che

fungeva da spaziatore tra il nascente polipeptide di scFv e il ribosoma (Hanes 2000).

Una libreria di visualizzazione dei ribosomi derivata dal costrutto di scFv genitore (33v20064) è stata creata mediante mutagenesi casuale usando il kit di mutagenesi casuale di PCR (reazione a catena della polimerasi) Diversify™ (BD Biosciences) seguendo le raccomandazioni del fabbricatore. Le condizioni per questa PCR soggetta a errori (EP) sono state scelte per introdurre in media 8,1 cambiamenti di nucleotidi per 1000 coppie di basi (secondo il fabbricatore). La libreria EP risultante è stata quindi usata nelle selezioni di visualizzazione dei ribosomi basate sull'affinità (Hanes 2000). Gli scFv sono stati espressi *in vitro* usando il Sistema di produzione RNA su larga scala RiboMAX™ (T7) (Promega) seguendo il protocollo del fabbricatore e un sistema di traduzione privo di cellule procariotiche basato su *E.coli*. I complessi di scFv anticorpo-ribosoma-mRNA (ARM) prodotti sono stati incubati in soluzione con antigene di IL-33 umana biotinilata, alternando gli antigeni di IL33-01 biotinilata e IL33-11 biotinilata in turni sequenziali, o con l'antigene di IL-33-11 biotinilata da solo in tutti i turni. I complessi terziari specificamente legati (IL-33:ARM) sono stati catturati su biglie paramagnetiche rivestite di streptavidina (Dynabeads® M-280) seguendo le raccomandazioni del fabbricatore (Dyna) mentre gli ARM non legati sono stati lavati via. L'mRNA codificante per gli scFv legati è stato quindi recuperato mediante PCR di trascrizione inversa (RT-PCR). Il processo di

selezione è stato ripetuto sulla popolazione ottenuta per ulteriori turni di selezioni con concentrazioni decrescenti di IL-33 umana biotinilata (da 100 nM a 100 pM su 5 turni), al fine di arricchire e in tal modo selezionare cloni con maggiore affinità per IL-33. Gli esiti dei turni di selezione 3, 4 e 5 sono stati subclonati in pCantab6 (McCafferty, J., et al. Appl Biochem Biotechnol, 1994. 47(2-3): pagina 157.), e sono stati identificati cloni migliorati come descritto di seguito.

Inibizione di legame di IL-33 a mAb mediante scFv non purificato

Un numero rappresentativo di singoli cloni provenienti dagli esiti della selezione è stato coltivato in piastre da 96 pozzetti. ScFv sono stati espressi nel periplasma batterico (Kipriyanov, et al. J Immunol Methods 200 (1-2): 69-77 (1997)) e sottoposti a screening per la loro attività inibitoria in un saggio basato sul legame IL-33:mAb omogeneo FRET (trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza) HTRF® (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International). In questo saggio, i campioni sono stati sottoposti a competizione con IgG di 33v20064 etichettato con DyLight per il legame a IL-33-01 His Avi biotinilata (SEQ ID NO. 632) o IL-33 His Avi di cynomolgus biotinilata (SEQ ID NO. 649). Tali saggi di competizione di epitopo si basano sul principio che un campione di anticorpo di prova, che riconosce un epitopo simile all'IgG anti-IL-33 etichettata, competerà con l'IgG etichettata per il legame a IL-33 biotinilata determinando una riduzione del segnale di saggio.

Campioni di anticorpi anti-IL-33 non purificati sono stati provati per l'inibizione di legame di IL33-01 His Avi biotinilata (umana) o di IL-33 His Avi di cynomolgus biotinilata a 33v20064 etichettato DyLight aggiungendo 5 microlitri di campione a una piastra di saggio a basso volume da 384 pozzetti (Costar, 3673). Successivamente, una soluzione contenente 2,4 nM di 33v20064 etichettato DyLight è stata preparata per il saggio di IL-33 umana ed è stata preparata una soluzione di 6 nM di 33v20064 etichettato DyLight per il saggio sui cynomolgus e 2,5 microlitri sono stati aggiunti alle piastre di saggio (etichettate usando il kit (Innova Biosciences, 326-0010) secondo le istruzioni del fabbricatore). A ciò è seguita l'addizione di 2,5 microlitri di una soluzione contenente 0,8 nM di IL-33-01 umana biotinilata combinata con 0,75 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB) per il saggio umano o una soluzione contenente 4 nM di IL-33 di cynomolgus biotinilata combinata con 1,5 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB) per il saggio di cynomolgus. Tutte le diluizioni sono state eseguite in un tampone di saggio contenente 0,8 M di fluoruro di potassio (VWR, 26820.236) e albumina di siero bovino allo 0,1% (BSA, PAA, K05-013) in PBS di Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Le piastre di saggio sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente e la fluorescenza a risoluzione temporale è stata letta a lunghezze d'onda di emissione di 620 nm e 665 nm usando un lettore di piastre EnVision (Perkin Elmer). I dati sono stati analizzati calcolando il rapporto di

665/620 nm seguito dai valori Delta F in % per ciascun campione. Il rapporto di 665/620 nm è stato usato per correggere l'interferenza di campione usando l'Equazione 1. Il Delta F in % per ciascun campione è stato quindi calcolato usando l'Equazione 2. Il controllo negativo (legame aspecifico) è stato definito sostituendo IL-33 biotinilata combinata con il rilevamento di criptato di streptavidina con il solo rilevamento di criptato di streptavidina. I valori Delta F in % sono stati successivamente usati per calcolare il legame specifico in % come descritto nell'Equazione 3.

Quando il saggio di competizione di epitopo ha raggiunto il suo limite di sensibilità, è stato usato un saggio che usa un mAb intermedio ottimizzato 33_640027 per provare campioni di scFv non purificato. Il saggio era essenzialmente come descritto per il saggio di competizione di 33v20064 con le seguenti modificazioni: sono stati preparati 20 nM di 33_640027 etichettato DyLight e sono stati aggiunti 2,5 microlitri alle piastre di saggio. A ciò è seguita l'addizione di 2,5 microlitri di una soluzione contenente 0,32 nM di IL-33-01 umana biotinilata combinata con 0,75 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB) per il saggio umano o una soluzione contenente 0,8 nM di IL-33 di cynomolgus biotinilata combinata con 1,5 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB) per il saggio di cynomolgus.

Inibizione di legame di IL-33 a mAb mediante scFv purificato

I cloni Fv a catena singola che hanno mostrato un effetto inibitorio sull'interazione IL-33:mAb poiché estratti periplasmici non purificati sono stati sottoposti a sequenziamento del DNA (Osbourn, et al. Immunotechnology 2(3):181-96 (1996); Vaughan, et al. Nat Biotechnol 14(3):309-14 (1996).). Gli scFv unici sono stati espressi di nuovo nei batteri e purificati mediante cromatografia per affinità (come descritto in WO01/66754). Campioni di anticorpo anti-IL-33 purificati sono stati provati per la potenza di inibizione mediante competizione con una serie di diluizioni della preparazione purificata contro IgG di 33v20064 etichettato DyLight o IgG di 33_640027 etichettato DyLight per il legame a IL33-01 His Avi biotinilata, IL33-11 His Avi biotinilata o IL-33 His di Avi cynomolgus biotinilata. I metodi sono come descritti nella sezione precedente.

Tabella 23. Attività di anticorpi di scFv in saggi di competizione di epitopo

Saggio		Potenza IC50 (nM)			
		33v20064	33_640027	33_640047	33_640050
33v20064	IL33-01	12	0,4	0,4	0,2
	IL33-11	26	0,6	0,5	0,4
	IL-33 di Cyno	103	8,2	2,7	1,4
33_640027	IL33-01	1498	3,8	2,3	2,5
	IL33-11	1467	2,9	Non	2,4

Saggio		Potenza IC50 (nM)			
		33v20064	33_640027	33_640047	33_640050
				determinato	
	IL-33 di Cyno	3433	38	8,8	4,1

Riformattazione di scFv in IgG1

I cloni Fv a catena singola con proprietà desiderabili dei saggi di legame IL-33:mAb sono stati convertiti in un formato di anticorpo di immunoglobulina intera G1 (IgG1) come descritto nell'Esempio 1. Questi includono gli anticorpi 33_640027 (derivato dalle selezioni della libreria EP) e 33_640047, 33_640050 (derivati dalle selezioni della libreria di mutagenesi del blocco CDR3 V_H) I SEQ ID NO corrispondenti alle varie regioni di questi anticorpi sono mostrati nella **Tabella 24**

Tabella 24. Sequenze di anticorpi di IL33

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
33_640027	SEQ ID NO: 292	SEQ ID NO: 297	SEQ ID NO: 293	SEQ ID NO: 298
			SEQ ID NO: 294	SEQ ID NO: 299
			SEQ ID NO: 295	SEQ ID NO: 300

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
33_640047	SEQ ID NO: 312	SEQ ID NO: 317	SEQ ID NO: 313	SEQ ID NO: 318
			SEQ ID NO: 314	SEQ ID NO: 319
			SEQ ID NO: 315	SEQ ID NO: 320
33_640050	SEQ ID NO: 302	SEQ ID NO: 307	SEQ ID NO: 303	SEQ ID NO: 308
			SEQ ID NO: 304	SEQ ID NO: 309
			SEQ ID NO: 305	SEQ ID NO: 310

Inibizione di legame di IL-33 a mAb mediante IgG purificata

La capacità degli anticorpi anti-IL-33 di inibire il legame di IL33-01 His Avi biotinilata, di IL33-11 His Avi biotinilata o di IL-33 His Avi cynomolgus biotinilata all'IgG di 33v20064 etichettato DyLight o all'IgG di 33_640027 etichettato DyLight è stata valutata in un saggio di competizione biochimico HTRF® (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International) come descritto. Le IgG con proprietà

desiderabili dai saggi di legame IL-33:mAb sono stati selezionati per ulteriori analisi.

Inibizione di produzione di IL-8 in Huvec da parte di IgG

Un saggio di rilascio di citochine è stato usato per valutare l'inibizione della produzione di IL-8 indotta da IL-33 da cellule endoteliali della vena ombelicale umana (Huvec) da parte di anticorpi anti-IL-33. Le cellule sono state esposte a IL-33 in presenza o in assenza di anticorpo di prova o ST2.Fc (R&D systems) essenzialmente come descritto nell'Esempio 2 con modificazioni minori. Le soluzioni di prova di IgG purificate (in duplicato) sono state diluite alla concentrazione desiderata in terreni di coltura completi. IL-33 N-terminale His Avi (IL33-01, SEQ ID NO 632) è stata preparata in un terreno di coltura completo miscelato con un anticorpo di prova appropriato per fornire una concentrazione finale di IL-33 di 2 ng/mL. Tutti i campioni sono stati incubati per 30 minuti a temperatura ambiente, prima del trasferimento della miscela IL-33/anticorpo alla piastra del saggio. Dopo 18-24 ore di incubazione, IL-8 è stata misurata nei surnatanti cellulari mediante ELISA (R&D Systems, DY208) adattato per la lettura dell'eurobio come descritto nell'Esempio 2. I dati sono stati analizzati usando il software Graphpad Prism. I valori di IC_{50} sono stati determinati mediante curva di adattamento usando l'equazione logistica a quattro parametri. I valori di IC_{50} sono stati calcolati e riepilogati nella **Tabella 25** di seguito.

La **Figura 42A** mostra HUVEC stimulate con IL33-01 in presenza di 33v20064, 33_640050, ST2-Fc umano o mAb di controllo,

in cui l'asse x è la concentrazione dell'anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è una percentuale della risposta massima (Produzione IL-8).

Neutralizzazione di IL-33 a lunghezza intera di mammiferi

È attiva anche IL-33 a lunghezza intera (Cayrol et al., Proc Natl Acad Sci STATI UNITI 106(22):9021-6 (2009); Hayakawa et al., Biochem Biophys Res Commun 387(1):218-22 (2009); Talabot-Ayer et al., J Biol Chem. 284(29):19420-6 (2009)).

Per valutare la capacità degli anticorpi di neutralizzare IL-33 a lunghezza intera, le cellule HEK293-EBNA che esprimono HuIL-33 a lunghezza intera (FL) (e controlli trasfettati simulati) sono state raccolte 24 ore dopo la trasfezione con accutasi (PAA, # L11-007). Le cellule sono state diluite a 1×10^8 /mL con PBS e omogeneizzate per 30 secondi usando un omogeneizzatore di tessuti. I detriti cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione. Le HUVEC sono state stimulate con lisati cellulari a concentrazioni variabili. La stimolazione della produzione di citochine è stata osservata solo con lisato cellulare trasfettato con IL-33 a lunghezza intera e senza lisato cellulare trasfettato simulato. Una concentrazione di lisato 1:1000 che stimolava un rilascio sub-massimale di citochine (approssimativamente EC_{50}) è stata selezionata per gli studi di neutralizzazione degli anticorpi. Gli esperimenti sono stati eseguiti come descritto sopra. I valori di IC_{50} sono stati calcolati e riepilogati nella **Tabella 25** di seguito.

La **Figura 42B** mostra HUVEC stimulate con IL-33 a lunghezza intera in presenza di 33v20064, 33_640050, ST2-Fc umano o mAb di controllo, in cui l'asse x è la concentrazione dell'anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è una percentuale della risposta massima (Produzione di IL-8).

Tabella 25. Valori di IC50 nel saggio IL-8 di HUVEC

Anticorpo	IC50 media geometrica (95% CI) (nM)	
	Rispetto a IL-33 His Avi	Rispetto a lisato cellulare di IL-33 a lunghezza intera
33v20064	Inibizione parziale	185
33_640050	0,7 (0,3-1,5)	0,32
ST2.Fc	0,3 (0,1-0,9)	0,67

Prevenzione della forma di IL-33 legata con disolfuro da parte di IgG

IL-33-01 (0,14 nM o 3 ng/mL) è stato incubato in IMDM o PBS, entrambi contenenti BSA all'1% in presenza di assenza di anticorpi (25 ug/mL) o ST2-Fc umano (105 ug/mL) per 0-24 ore a 37 °C, con CO₂ al 5%. In vari punti temporali le aliquote sono state rimosse e aggiunte a una piastra pre-raffreddata contenente PBS o sST2 (concentrazione finale 10,5 ug/mL). sST2 è stato addizionato a mAb di controllo e campioni non trattati al momento della raccolta per arrestare il proseguimento della reazione di ossidazione di IL-33. I campioni sono

stati suddivisi in aliquote in piastre pre-congelate a 96 pozzetti e conservati a -80 °C. L'ELISA di IL-33 umana è stato eseguito secondo le istruzioni del fabbricatore (R&D systems, Cat # DY3625, Lotto # 1362797) con la sostituzione del sistema di rilevamento DELFIA (Perkin Elmer) al posto della streptavidina-HRP e successivi. In breve, piastre Maxisorp nere a 96 pozzetti sono state rivestite con 50 ul per pozzetto di anticorpo di cattura per una notte a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate 3X con 300 ul di Tween-20 allo 0,05% in PBS e bloccate con 150 ul di BSA all'1% in PBS per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate 3 volte e 50 ul per pozzetto di campioni o standard sono stati aggiunti alla piastra per 2 ore a temperatura ambiente con agitazione (400 giri/minuto). Le piastre sono state lavate 3X e 50 ul per pozzetto di anticorpo di rilevamento sono stati aggiunti alla piastra per 2 ore a temperatura ambiente con agitazione (400 giri/minuto). Le piastre sono state lavate come indicato in precedenza e 50 ul per pozzetto di streptavidina-europio diluita 1 su 1000 in tampone di saggio DELFIA sono stati aggiunti alla piastra per 40 minuti a temperatura ambiente, al riparo dalla luce, con agitazione (400 giri/minuto). Le piastre sono state lavate 7 volte con 300 ul per pozzetto di tampone di lavaggio DELFIA. Alla piastra sono stati aggiunti 50 ul per pozzetto di soluzione di potenziamento DELFIA (preriscaldata a temperatura ambiente). Dopo 10 minuti di incubazione a temperatura ambiente al riparo dalla luce, la fluorescenza è stata misurata usando un lettore di piastre EnVision (PerkinElmer). Gli standard e

l'interpolazione dei dati sono stati eseguiti in Microsoft Excel con successiva analisi eseguita nel software GraphPad Prism.

Come esaminato nell'Esempio 4, **Figure 24A**, questo ELISA rileva prevalentemente IL-33 legata con disolfuro (IL33-DSB) entro l'intervallo di concentrazioni di IL-33 misurate in questo esperimento. L'ELISA viene qui usato per monitorare la conversione di IL-33 alla sua forma legata disolfuro in presenza di anticorpi di saggio.

La **Figura 43** mostra la conversione di IL33-01 alla sua forma legata con disolfuro (IL33-DSB) durante l'incubazione in IMDM (**Figura 43A**) o PBS (**Figura 43B**) in presenza o assenza di anticorpi di prova, in cui l'asse x è il tempo in ore e l'asse y è la concentrazione di IL-33-DSB. IL330004 e 33v20064 rallentano la velocità di conversione da IL-33 a IL33-DSB. 33_640050 e ST2.Fc impediscono la conversione a IL-33-DSB nel corso temporale provato.

Ricombinazione di mutazioni benefiche e ulteriore ottimizzazione

Con l'obiettivo di generare ulteriori miglioramenti dell'affinità, le mutazioni benefiche identificate da precedenti cascate di selezione e screening sono state ricombinate in numerosi modi, sia mediante un semplice approccio additivo sia tramite un approccio di libreria di ricombinazione con ulteriori selezioni.

Le analisi di sequenza hanno suggerito che vi erano due "hotspot" mutazionali a punto singolo che erano prevalenti in molte delle sequenze di anticorpi principali; I98M in CDR3 V_H e Q50R in CDR2 V_L

(numerazione Kabat). Queste due mutazioni sono state innestate sul costrutto 33_640001 per generare un nuovo anticorpo, 33_640036, usando tecniche di biologia molecolare standard. In un'ulteriore ricombinazione, il V_H di 33_640047 è stato accoppiato con la V_L di 33_640036 per generare l'anticorpo 33_640117. Questi sono esempi di ricombinazione di sequenze usando un approccio additivo. I SEQ ID NO sono mostrati nella **Tabella 26**.

Tabella 26. Sequenze di anticorpi di IL33

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
33_640036	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
352	352	357	353	358
			SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
			354	359
			SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
			355	360
33_640117	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
362	362	367	363	368
			SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
			364	369
			SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
			365	370

In aggiunta, gli esiti di selezione dalle librerie di mutagenesi a blocchi che coprono le regioni CDR3 V_H e CDR3 V_L avevano mostrato miglioramenti di affinità e una buona diversità di sequenza e sono stati quindi ricombinati usando un approccio di clonaggio della popolazione. Gli esiti della selezione del turno 3 sono stati ricombinati per formare librerie in cui i cloni contenevano sequenze CDR3 V_H e CDR3 V_L accoppiate in modo casuale e randomizzate singolarmente. Queste librerie CDR3 V_H/CDR3 V_L ricombinate sono state quindi usate nelle selezioni di visualizzazione dei ribosomi con alternanza degli antigeni di IL-33 umana His Avi biotinilata di tipo selvatico (IL33-01, SEQ ID NO. 632) e antigeni di IL-33 mutante His Avi biotinilata (IL33-11, SEQ ID NO. 643) in turni sequenziali, o con l'antigene di IL33-11 His Avi biotinilata da solo in tutti i turni. Le selezioni sono state eseguite essenzialmente come descritto per le singole librerie CDR3, in presenza di concentrazioni decrescenti di antigene biotinilato, da 50 nM a 30 pM in cinque turni di selezione.

Sono stati preparati estratti periplasmici grezzi contenenti scFv di un numero rappresentativo di scFv singoli a partire dagli esiti di selezione delle librerie CDR3 V_H/CDR3 V_L ricombinate. La capacità degli anticorpi anti-IL-33 di inibire il legame di IL33-01 His Avi biotinilata o IL-33 di cynomolgus His Avi biotinilata all'IgG di 33v20064 etichettato DyLight o IgG di 33_640027 etichettato DyLight è stata valutata in un saggio di competizione HTRF® biochimico (Fluorescenza a risoluzione temporale, Cisbio International) come descritto. Le varianti di ScFv che

hanno mostrato un effetto inibitorio significativamente migliorato rispetto a scFv genitore e derivazioni generate di pre-ricombinazione, sono state sottoposte a sequenziamento del DNA e varianti ricombinate uniche sono state prodotte come scFv purificato e provate come descritto nella sezione precedente.

Gli anticorpi ottimizzati ottenuti da queste librerie ricombinate sono esemplificati da 33_640076, 33_640081, 33_640082, 33_640084, 33_640086 e 33_640087. I SEQ ID NO. di questi anticorpi sono mostrati nella **Tabella 27**.

Tabella 27. Sequenze di anticorpi di IL33

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
33_640076	SEQ ID NO: 372	SEQ ID NO: 377	SEQ ID NO: 373	SEQ ID NO: 378
			SEQ ID NO: 374	SEQ ID NO: 379
			SEQ ID NO: 375	SEQ ID NO: 380
33_640081	SEQ ID NO: 382	SEQ ID NO: 387	SEQ ID NO: 383	SEQ ID NO: 388
			SEQ ID NO: 384	SEQ ID NO: 389
			SEQ ID NO:	SEQ ID NO:

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
			385	390
33_640082	SEQ ID NO: 392	SEQ ID NO: 397	SEQ ID NO: 393	SEQ ID NO: 398
			SEQ ID NO: 394	SEQ ID NO: 399
			SEQ ID NO: 395	SEQ ID NO: 400
33_640084	SEQ ID NO: 402	SEQ ID NO: 407	SEQ ID NO: 403	SEQ ID NO: 408
			SEQ ID NO: 404	SEQ ID NO: 409
			SEQ ID NO: 405	SEQ ID NO: 410
33_640086	SEQ ID NO: 412	SEQ ID NO: 417	SEQ ID NO: 413	SEQ ID NO: 418
			SEQ ID NO: 414	SEQ ID NO: 419
			SEQ ID NO: 415	SEQ ID NO: 420
33_640087	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
	422	427	423	428
			SEQ ID NO: 424	SEQ ID NO: 429
			SEQ ID NO: 425	SEQ ID NO: 430

Ulteriori mutazioni spontanee sono state introdotte nelle regioni variabili di questi anticorpi in formato scFv durante le procedure di selezione della visualizzazione dei ribosomi come risultato di turni ripetuti di amplificazioni PCR. Questi eventi si aggiungono alla diversità di sequenza degli esiti, ma sono spesso indesiderabili quando si verificano nelle regioni di intelaiatura. Quindi le mutazioni spontanee che si sono verificate nelle regioni di intelaiatura di 33_640076, 33_640081, 33_640082, 33_640084, 33_640086 e 33_640087 sono state riportate alla linea germinale sui costrutti IgG come descritto nell'Esempio 3 usando tecniche di biologia molecolare standard. Tali mutazioni spontanee che si sono verificate in una qualsiasi delle CDR o nei residui di Vernier adiacenti alle CDR (ad esempio, posizioni V_H 27, 28, 29, 30, 93 e 94 secondo la numerazione Kabat) sono state lasciate invariate. Come strategia aggiuntiva per aumentare l'affinità, un "hotspot" precedentemente identificato (la mutazione Q50R in CDR2 V_L)

è stato anch'esso innestato contestualmente sui costrutti. Gli anticorpi risultanti da queste modificazioni di linea germinale e innesto di hotspot sono stati denominati 33_640076-1, 33_640081-A, 33_640082-2, 33_640084-2, 33_640086-2 e 33_640087-2, corrispondenti ai loro anticorpi parentali di 33_640076, 33_640081, 33_640082, 33_640084, 33_640086 e 33_640087 rispettivamente. I SEQ ID NO. di questi anticorpi sono mostrati nella **Tabella 28**.

Tabella 28. Sequenze di anticorpi di IL33

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
33_640076-1	SEQ ID NO: 432	SEQ ID NO: 437	SEQ ID NO: 433	SEQ ID NO: 438
			SEQ ID NO: 434	SEQ ID NO: 439
			SEQ ID NO: 435	SEQ ID NO: 440
33_640081-A	SEQ ID NO: 442	SEQ ID NO: 447	SEQ ID NO: 443	SEQ ID NO: 448
			SEQ ID NO: 444	SEQ ID NO: 449
			SEQ ID NO: 445	SEQ ID NO: 450
33_640082-	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
2	452	457	453	458
			SEQ ID NO: 454	SEQ ID NO: 459
			SEQ ID NO: 455	SEQ ID NO: 460
33_640084- 2	SEQ ID NO: 462	SEQ ID NO: 467	SEQ ID NO: 463	SEQ ID NO: 468
			SEQ ID NO: 464	SEQ ID NO: 469
			SEQ ID NO: 465	SEQ ID NO: 470
33_640086- 2	SEQ ID NO: 472	SEQ ID NO: 477	SEQ ID NO: 473	SEQ ID NO: 478
			SEQ ID NO: 474	SEQ ID NO: 479
			SEQ ID NO: 475	SEQ ID NO: 480
33_640087- 2	SEQ ID NO: 482	SEQ ID NO: 487	SEQ ID NO: 483	SEQ ID NO: 488
			SEQ ID NO:	SEQ ID NO:

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
			484	489
			SEQ ID NO: 485	SEQ ID NO: 490

Ottimizzazione di CDR addizionali

Come ulteriore strategia per aumentare l'affinità, sono state ottimizzate ulteriori CDR. Grandi librerie di fagi di scFv derivate dal genitore germinato (33_640001) sono state create mediante mutagenesi diretta da oligonucleotidi delle CDR1 e CDR2 a catena variabile pesante (V_H) e CDR1 e CDR2 leggera (V_L) usando tecniche standard di biologia molecolare come descritto (Clackson 2004). Le selezioni e lo screening sono stati eseguiti come descritto per le librerie CDR3 V_HV_L . Le varianti di anticorpi più migliorate sono state ottenute dalla libreria CDR2 V_H . Queste sono esemplificate da 33_640166, 33_640169, 33_640170. I SEQ ID NO. di questi anticorpi sono mostrati nella **Tabella 29**.

Tabella 29. Sequenze di anticorpi di IL33

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
33_640166	SEQ ID NO: 322	SEQ ID NO: 327	SEQ ID NO: 323	SEQ ID NO: 328

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
			SEQ ID NO: 324	SEQ ID NO: 329
			SEQ ID NO: 325	SEQ ID NO: 330
33_640169	SEQ ID NO: 332	SEQ ID NO: 337	SEQ ID NO: 333	SEQ ID NO: 338
			SEQ ID NO: 334	SEQ ID NO: 339
			SEQ ID NO: 335	SEQ ID NO: 340
33_640170	SEQ ID NO: 342	SEQ ID NO: 347	SEQ ID NO: 343	SEQ ID NO: 348
			SEQ ID NO: 344	SEQ ID NO: 349
			SEQ ID NO: 345	SEQ ID NO: 350

Come strategia additiva per conseguire ulteriori miglioramenti in termini di affinità, le sequenze CDR2 V_H di 33_640166, 33_640169 e 33_640170 sono state innestate sui costrutti IgG di 33_640076-1,

33_640082-2, 33_640086-2 e 33_640087-2, usando metodi di biologia molecolare standard. Gli anticorpi risultanti da queste ricombinazioni sono stati esemplificati da 33_640076-4, 33_640082-4, 33_640082-6, 33_640082-7, 33_640086-6 e 33_640087-7. Le origini della sequenza e i SEQ ID NO sono mostrati nella **Tabella 30**.

Tabella 30. Origine di sequenza e numeri di SEQ ID di anticorpi IL33

IgG1	Origine	Sequenza		Sequenza		CDR	CDR
		VH		VL		1,2,3 VH	1,2,3 VL
33_640076-4	Innesto della sequenza di CDR2 V _H di 33_640170 su 33_640076-1	SEQ ID NO: 492	SEQ ID NO: 497	SEQ ID NO: 493	SEQ ID NO: 498	SEQ ID NO: 494	SEQ ID NO: 499
CDR2 V _H di	Innesto della	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID

IgG1	Origine	Sequenza	Sequenza	CDR	CDR
		VH	VL	1,2,3 VH	1,2,3 VL
33_640082-4	sequenza CDR2 V _H di 33_640166 su 33_640082-2	NO: 502	NO: 507	ID	ID
				NO: 503	NO: 508
				SEQ ID	SEQ ID
				NO: 504	NO: 509
				SEQ ID	SEQ ID
				NO: 505	NO: 510
33_640082-6	Innesto della sequenza di CDR2 V _H di 33_640169 su 33_640082-2	SEQ ID	SEQ ID	SEQ	SEQ
		NO: 512	NO: 517	ID	ID
				NO: 513	NO: 518
				SEQ ID	SEQ ID
				NO: 514	NO: 519
				SEQ	SEQ

IgG1	Origine	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
				ID NO: 515	ID NO: 520
CDR2 V _H di 33_640082-7	Innesto della sequenza di CDR2 V _H di 33_640170 su 33_640082-2	SEQ ID NO: 522	SEQ ID NO: 527	SEQ ID NO: 523	SEQ ID NO: 528
				SEQ ID NO: 524	SEQ ID NO: 529
				SEQ ID NO: 525	SEQ ID NO: 530
		SEQ ID NO: 532	SEQ ID NO: 537	SEQ ID NO: 533	SEQ ID NO: 538
				SEQ ID NO: 533	SEQ ID NO: 538

IgG1	Origine	Sequenza		CDR	
		VH	VL	1,2,3 VH	1,2,3 VL
				ID NO: 534	ID NO: 539
				SEQ ID NO: 535	SEQ ID NO: 540
CDR2 V _H di 33_640087-7	Innesto della sequenza di CDR2 V _H di	SEQ ID NO: 542	SEQ ID NO: 547	SEQ ID NO: 543	SEQ ID NO: 548
	33_640170 su 33_640087-2			SEQ ID NO: 544	SEQ ID NO: 549
				SEQ ID NO: 545	SEQ ID NO: 550

Anche la ricombinazione delle sequenze benefiche di CDR3V_H/CDR3 V_L e CDR2 V_H è stata eseguita usando un approccio di clonaggio e selezione della popolazione. Gli esiti di selezione del turno 3 dalle librerie di mutagenesi a blocchi che coprono la regione CDR2 V_H sono stati ricombinati con gli esiti di selezione del turno 3 della libreria CDR3 V_H/CDR3 V_L ricombinate in un approccio di clonaggio della popolazione usando tecniche di biologia molecolare standard. Gli esiti di selezione comprendenti un cospicuo numero di varianti scFv sono stati ricombinati per formare librerie in cui i cloni contenevano sequenze accoppiate in modo casuale derivate dalle selezioni di CDR3 V_H/CDR3 V_L e CDR2 V_H. Le selezioni sono state eseguite come descritto per le librerie CDR3 V_HV_L in presenza di concentrazioni decrescenti di antigene biotinilato, tipicamente da 3 nM a 3 pM in cinque turni di selezione. Estratti periplasmici grezzi contenenti scFv da un numero rappresentativo di scFv singoli dagli esiti di selezione sono stati sottoposti a screening in saggi HTRF® biochimici come descritto per le librerie CDR3 V_HV_L. Le varianti di ScFv che hanno mostrato un effetto inibitorio significativamente migliorato rispetto a scFv genitore e derivazioni generate di pre-ricombinazione, sono state sottoposte al sequenziamento del DNA.

Quando il saggio di competizione di epitopo che utilizza 33_640027 ha raggiunto il suo limite di sensibilità, è stato usato un saggio che usa 33_640117 per provare i campioni di scFv purificati. Il saggio era essenzialmente come descritto per il saggio di competizione

di 33v20064 con le seguenti modificazioni: Sono stati preparati 2,5 nM di 33_640117 etichettato DyLight e sono stati aggiunti 2,5 microlitri alle piastre di saggio. A ciò è seguita l'addizione di 2,5 microlitri di una soluzione contenente 0,12 nM di IL-33-01 umana biotinilata combinata con 0,75 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB) per il saggio umano o una soluzione contenente 0,24 nM di IL-33 di cynomolgus biotinilata combinata con 1,5 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB) per il saggio di cynomolgus. La fluorescenza è stata letta dopo un'ora e incubazione di una notte. I campioni più potenti in entrambi i punti temporali sono stati riproposti per la riformattazione in IgG.

Varianti ricombinate uniche sono state valutate come scFv purificato e gli scFv più attivi sono stati quindi selezionati e convertiti nel formato IgG1 come descritto nell'Esempio 1. Gli anticorpi ottenuti da queste librerie ricombinate sono esemplificati da 33_640201 e 33_640237. Le mutazioni spontanee che sono state introdotte nelle regioni di intelaiatura di 33_640201 e 33_640237 durante le selezioni di visualizzazione dei ribosomi sono state riportate alle sequenze germinali come descritto in precedenza in questa sezione e le loro controparti germinate sono state denominate rispettivamente 33_640201-2 e 33_640237-2. I SEQ ID di questi anticorpi sono mostrati nella **Tabella 31**.

Tabella 31. Sequenze di anticorpi di IL33

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
33_640201	SEQ ID NO: 552	SEQ ID NO: 557	SEQ ID NO: 553	SEQ ID NO: 558
			SEQ ID NO: 554	SEQ ID NO: 559
			SEQ ID NO: 555	SEQ ID NO: 560
33_640237	SEQ ID NO: 562	SEQ ID NO: 567	SEQ ID NO: 563	SEQ ID NO: 568
			SEQ ID NO: 564	SEQ ID NO: 569
			SEQ ID NO: 565	SEQ ID NO: 570
33_640201- 2	SEQ ID NO: 572	SEQ ID NO: 577	SEQ ID NO: 573	SEQ ID NO: 578
			SEQ ID NO: 574	SEQ ID NO: 579
			SEQ ID NO: 575	SEQ ID NO: 580
33_640237- 2	SEQ ID NO: 582	SEQ ID NO: 587	SEQ ID NO: 583	SEQ ID NO: 588

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL	CDR 1,2,3 VH	CDR 1,2,3 VL
			SEQ ID NO: 584	SEQ ID NO: 589
			SEQ ID NO: 585	SEQ ID NO: 590

I dati per gli anticorpi ottimizzati per CDR3 V_H/CDR3V_L e CDR2 V_H mediante ricombinazione razionale o approcci di popolazione sono esemplificati da 33_640082-6, 33_640087-7, 33_640201 e 33_640237 nelle **Figure 44 e 45**.

Inibizione di legame di IL-33 a mAb mediante IgG purificata

La capacità degli anticorpi anti-IL-33 di inibire il legame di IL33-01 umana His Avi biotinilata o IL-33 His Avi di cynomolgus alla IgG di 33_640117 etichettato DyLight è stata valutata in un saggio di competizione biochimico HTRF® (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International) come descritto sopra.

La **Figura 44A** mostra l'inibizione del segnale FRET a seguito di incubazione di 1 ora, prodotta dal legame di IL-33 umana biotinilata (IL33-01) a IgG di 33_640117 etichettato con DyLight con concentrazioni crescenti di anticorpi 33v20064, 33_640050, 33_640082-6, 33_640087-7, 33_640201 e 33_640237, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è il legame specifico percentuale.

La **Figura 44B** mostra l'inibizione del segnale FRET a seguito di incubazione di una notte, prodotta dal legame di IL-33 umana biotinilata (IL33-01) a IgG di 33_640117 etichettato con DyLight con concentrazioni crescenti di anticorpi 33v20064, 33_640050, 33_640082-6, 33_640087-7, 33_640201 e 33_640237, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è il legame specifico percentuale.

La **Figura 44C** mostra l'inibizione di legame del segnale FRET a seguito di incubazione di 1 ora, prodotta da IL-33 His Avi di cynomolgus biotinilata a IgG di 33_640117 etichettato con DyLight con concentrazioni crescenti di anticorpi 33v20064, 33_640050, 33_640082-6, 33_640087-7, 33_640201 e 33_640237 in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è un legame specifico percentuale.

Tabella 32. Valori IC50 di anticorpi di IgG1 in 117 saggi di competizione di epitopo

Anticorpo	IC50 (nM)		
	117-WT 1 ora	117-WT una notte	117-cyno 1 ora
33v20064 IgG	150	689	788
33_640050 IgG	0,3	1,5	4,1
33_640076-4 IgG	0,1	0,1	0,6
33-640081 IgG	0,3	0,6	10
33_640082-6 IgG	0,1	0,1	0,2

Anticorpo	IC50 (nM)		
	117-WT 1 ora	117-WT una notte	117-cyno 1 ora
33_640082-7 IgG	0,1	0,1	0,2
33_640084-2 IgG	0,3	0,3	0,8
33_640086-6 IgG	0,1	0,1	0,2
33_640087-7 IgG	0,1	0,1	0,2
33_640201 IgG	0,2	0,2	0,3
33_640237IgG	0,1	0,1	1,8

Inibizione di produzione di IL-8 in Huvec da parte di IgG

IgG sono state provate in un saggio di produzione di IL-8 di Huvec. Le cellule sono state esposte a IL-33 His Avi (IL33-01, SEQ ID NO 632) N-terminale o lisato cellulare IL-33 a lunghezza intera di mammifero (lisato FL-IL33) in presenza o assenza di anticorpo di prova come descritto in precedenza. I valori di IC₅₀ sono stati calcolati e riepilogati nella **Tabella 33** di seguito.

La **Figura 45A** mostra HUVEC stimulate con IL33-01 in presenza di anticorpi 33_640050, 33_640082-6, 33_640087-7, 33_640201 e 33_640237, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è una percentuale della risposta massima (Produzione IL-8).

La **Figura 45B** mostra HUVEC stimulate con lisato cellulare di IL-33 a lunghezza intera in presenza di anticorpi di prova 33_640050,

33_640082-6, 33_640087-7, 33_640201 e 33_640237, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è una percentuale della risposta massima (Produzione di IL-8).

Tabella 33. Valori di IC50 nel saggio IL-8 di HUVEC

Anticorpo	IC50 (nM)	
	Rispetto a IL-33 His Avi	Rispetto a lisato cellulare di IL-33 a lunghezza intera
33_640076 - 4	0,032	0,095
33_640082-6	0,030	0,097
33_640082-7	0,031	0,095
33_640084-2	0,036	0,132
33_640086-6	0,026	0,081
33_640087-7	0,025	0,073
33_640201	0,046	0,101
33_640237	0,056	0,091

Sequenza di linea germinale IGLJ

Le sequenze amminoacidiche delle regioni di intelaiatura V_L degli anticorpi 33_640076-4, 33_640081-A, 33_640082-6, 33_640082-7, 33_640084-2, 33_640086-6, 33_640087-7, 33_640201-2 e 33_640237-2 sono state allineate a sequenze note della linea germinale IGLJ umana nel database IMGT (Lefranc, MP et al. Nucl. Acids Res. 2009. 37(Database issue): D1006-D1012), e la linea germinale più vicina è stata identificata mediante somiglianza di sequenza. Per tutti questi anticorpi questo era IGLJ2, che ha una singola differenza di amminoacidi rispetto agli anticorpi nella posizione 104 della regione V_L (numerazione Kabat). Questo residuo è stato riportato alla linea germinale come descritto nell'Esempio 3 usando metodi di biologia molecolare standard. Gli anticorpi risultanti sono stati denominati 33_640076-4B, 33_640081-AB, 33_640082-6B, 33_640082-7B, 33_640084-2B, 33_640086-6B, 33_640087-7B, 33_640201-2B e 33_640237-2B corrispondenti alla loro linea parentale di 33_640076-4, 33_640081-A, 33_640082-6, 33_640082-7, 33_640084-2, 33_640086-6, 33_640087-7, 33_640201-2 e 33_640237-2 rispettivamente. Le ID SEQ delle regioni V_H e V_L di questi anticorpi sono mostrate nella **Tabella 34**.

Tabella 34. Sequenze di anticorpi di IL33 germinati

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL
33_640076-4B	SEQ ID NO: 592	SEQ ID NO: 594
33_640081-AB	SEQ ID NO: 596	SEQ ID NO: 598

IgG1	Sequenza VH	Sequenza VL
33_640082-6B	SEQ ID NO: 600	SEQ ID NO: 602
33_640082-7B	SEQ ID NO: 604	SEQ ID NO: 606
33_640084-2B	SEQ ID NO: 608	SEQ ID NO: 610
33_640086-6B	SEQ ID NO: 612	SEQ ID NO: 614
33_640087-7B	SEQ ID NO: 616	SEQ ID NO: 618
33_640201-2B	SEQ ID NO: 620	SEQ ID NO: 622
33_640237-2B	SEQ ID NO: 624	SEQ ID NO: 626

Esempio 9 Modello di infiammazione delle vie aeree in vivo

Clonaggio, espressione e purificazione della trappola di citochine di IL-33

Le sequenze proteiche per IL-1RAcP di topo e ST2 di topo sono state ottenute da Swiss Prot (numeri di accesso Q61730 e P14719 rispettivamente). La trappola per citochine di IL-33 di topo è stata progettata sulla base di Economides et al 2003 ed era costituita dagli amminoacidi 1-359 Q61730 e gli amminoacidi 27-332 P14719 fusi con la porzione Fc dell'IgG1 umana. Le sequenze proteiche sono state ottimizzate per i codoni (Geneart) e clonate in pDEST12.2 Le proteine OriP sono state secrete dalle cellule nel terreno utilizzando i peptidi segnale nativi di IL-1RAcP. Per l'espressione nelle cellule CHO, l'agente di collegamento gateway è stato rimosso sovrapponendo il primer PCR. Il vettore di espressione di trappola è stato trasfettato in

cellule di mammifero transienti CHO. La trappola di IL-33 di topo è stata espressa e secreta nel terreno. I raccolti sono stati raggruppati e filtrati prima della purificazione usando la cromatografia della Proteina A. I surnatanti della coltura sono stati caricati su una colonna Hitrap Protein A da 5 ml (GE Healthcare) e lavati con 1xDPBS, la Trappola legata è stata eluita dalla colonna usando 0,1 M di Citrato di sodio (pH 3,0) e neutralizzata mediante l'aggiunta di Tris-HCl (pH 9,0). Il materiale eluito è stato ulteriormente purificato mediante SEC in 1xDPBS usando una colonna S200 16:600 Superdex (GE healthcare) e la concentrazione è stata determinata in modo spettrofotometrico usando un coefficiente di estinzione basato sulla sequenza di amminoacidi (Mach et al., Anal. Biochem. 200(1):74-80 (1992)).

Topi IL-33 umanizzati

I metodi per la generazione di topi IL-33 umanizzati sono stati precedentemente descritti nell'Esempio 4. I topi umanizzati vengono usati in modelli di vie aeree e/o infiammazioni allergiche per valutare l'effetto degli anticorpi di IL-33 anti-umana.

Modello di infiammazione delle vie aeree *in vivo*

Modelli di *Alternaria alternata* (ALT) hanno indotto infiammazione nelle vie aeree nei topi che sono stati precedentemente descritti (Kouzaki et al. J. Immunol. 2011, 186: 4375-4387; Bartemes et al J Immunol, 2012, 188: 1503-1513). IL-33 endogena viene rilasciata rapidamente in seguito a esposizione ad ALT e guida la produzione di IL-5 dipendente da IL-33 e l'eosinofilia nel polmone. Topi maschi o

femmine di tipo selvatico o IL-33 umanizzati (6-10 settimane) sono stati anestetizzati brevemente con isofluorano e gli sono stati somministrati 25 µg di estratto di ALT (Greer, Lenoir, NC) o veicolo per via intranasale in un volume totale di 50 µl. I topi sono stati trattati per via intraperitoneale o intranasale con sostanze di prova: IL330004 IgG (SEQ ID N. 12 e 17), H338L293 IgG (SEQ ID N. 182 e 187), trappola di IL-33 di topo, 33_640050 (SEQ ID n. 302 e 307), IgG di controllo isotipo (NIP228) o veicolo (PBS, 10 ml/kg) a 24 ore prima (per trattamento intraperitoneale) o 2 ore prima (per trattamento intranasale) della stimolazione intranasale con ALT. A 24 ore dopo la stimolazione, i topi sono stati anestetizzati alla fine con pentobarbital sodico prima del dissanguamento e del lavaggio broncoalveolare (BAL). Il liquido di lavaggio broncoalveolare (BALF) è stato raccolto mediante lavaggio (0,3 ml, 0,3 ml e 0,4 ml) tramite cannula tracheale. BALF è stato centrifugato, le cellule sono state contate (cellule totali da FACS (FacsCALIBER, BD)) e il surnatante è stato analizzato per le citochine mediante ELISA (Meso Scale Discovery, Rockville, MD). I conteggi differenziali delle cellule (200 cellule/vetrino) sono stati eseguiti su preparati di citospin colorati con Diff-Quik (Fisher Scientific, REGNO UNITO). Tutto il lavoro è stato compiuto secondo gli standard etici e di allevamento del Ministero degli Interni del Regno Unito sotto l'autorità di una licenza di progetto appropriata.

La **Figura 46** mostra che H338L293 inibisce in modo dose-dipendente IL-5 di BAL indotta da ALT e l'eosinofilia nei topi BALB/c di

tipo selvatico. Le sostanze di prova sono state dosate per via nasale (10, 30 o 100 mg/kg come indicato tra parentesi) a -2 ore prima della stimolazione con 25 ug di ALT. BALF è stato raccolto 24 ore dopo stimolazione con ALT e analizzato per la presenza di IL-5 (**Figura 46A**) ed eosinofili (**Figura 46B**). L'effetto significativo delle sostanze di prova è stato determinato usando ANOVA unidirezionale con la prova di confronto multiplo di Bonferroni. *** $p < 0,001$, □□ $p < 0,01$ rispetto a mAb di controllo (n = 4-8). Una trappola di IL-33 di topo è stata usata come controllo positivo.

La **Figura 47** mostra che H338L293 (30 mg/kg) e la trappola di IL-33 di topo (10 mg/kg), ma non IL330004 (30 mg/kg), inibiscono IL-5 di BAL indotta da ALT in topi IL-33 umanizzati. Le sostanze di prova sono state dosate per via intranasale a -2 ore prima della stimolazione con 25 ug di ALT. BALF è stato raccolto 24 ore dopo la stimolazione con ALT e analizzato per la presenza di IL-5. L'effetto significativo delle sostanze di prova è stato determinato usando ANOVA unidirezionale con la prova di confronto multiplo di Bonferroni. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ (n=4).

La **Figura 48** Mostra che la dose di 33_640050 inibisce in modo indipendente *Alternaria*-indotta da IL-5 BAL nei topi IL-33 umanizzati. Le sostanze in esame sono state dosate per via intraperitoneale (0,3, 3 o 30 mg/kg come indicato tra parentesi) a -24 ore prima della stimolazione con 25 ug di *Alternaria*. BALF è stato raccolto 24 ore dopo la stimolazione con ALT e analizzato per la presenza di IL-5. L'effetto

significativo delle sostanze di prova è stato determinato usando ANOVA unidirezionale con la prova di confronto multiplo di Bonferroni. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ ($n=4-5$).

Esempio 10 Caratterizzazione di anticorpi anti-IL-33

Inibizione di legame di IL-33 a ST2 mediante IgG purificata

La capacità degli anticorpi anti-IL-33 di inibire il legame di IL33-01 con tag FLAG®-His biotinilata al recettore ST2 è stata valutata in un saggio di competizione biochimico HTRF® (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International), i cui principi sono descritti sopra. L'attività delle preparazioni di IgG purificata è stata determinata facendo competere una serie di diluizioni di IgG purificata contro ST2 con tag FLAG®-His umano per il legame a IL33-01 biotinilata umana (SEQ ID No. 632).

La **Figura 49A**: mostra l'inibizione del segnale FRET a seguito di incubazione di una notte, prodotta dal legame di IL-33 umana a ST2 umano con concentrazioni crescenti di anticorpi 33v20064, 33_640087-7, 33_640087-7B, 33_640050 e 33_640237-2B, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è un legame specifico percentuale.

Inibizione di produzione di IL-8 in Huvec da parte di IgG

IgG sono state provate in un saggio di produzione di IL-8 di Huvec. Le cellule sono state esposte a IL-33 His Avi (IL33-01, SEQ ID NO 632) N-terminale in presenza o in assenza di anticorpi di prova come descritto in precedenza. I valori di IC_{50} sono stati calcolati e

rieepilogati nella **Tabella 35** di seguito. I dati mostrano che la germinazione della sequenza IGLJ non ha avuto alcun effetto sulla potenza degli anticorpi.

La **Figura 49B** mostra HUVEC stimulate con IL33-01 in presenza di anticorpi di prova 33_640087-7, 33_640087-7B, 33_640237-2 e 33_640237-2B, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è una percentuale della risposta massima (Produzione IL-8).

Tabella 35. Valori di IC50 nel saggio IL-8 di HUVEC

Anticorpo	IC50 (nM) rispetto a IL-33 His Avi
33_640087-7	0,041
33_640087-7B	0,046
33_640237-2	0,105
33_640237-2B	0,067

Selettività e reattività crociata degli anticorpi anti-IL-33

La selettività e la reattività crociata degli anticorpi anti IL-33 germinati è stata determinata usando un saggio basato sul legame IL-33:mAb FRET omogeneo (trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza) HTRF® (Fluorescenza a risoluzione temporale omogenea, Cisbio International). In questo saggio, i campioni sono stati sottoposti a competizione con IL-33-01 umana biotinilata (SEQ ID NO

632) per il legame a IgG di 33_640087-7B etichettato DyLight (SEQ ID N. 618 e 618) o IgG 33_640237-2B (SEQ ID N. 624 e 626).

IL-33 FLAG®His umana, di cyno e di topo (descritte nell'Esempio 1 e nella Tabella 21), IL-1 alfa e IL-1 beta umane (R&D systems) (Tabella 21) o IL-33 di ratto (GenScript) sono state provate per inibizione del legame di IL-33 umana a 33_640087-7B etichettato DyLight650 o 33_640237-2B etichettato DyLight650 aggiungendo 5 microlitri di ciascuna diluizione di campione a una piastra di saggio a basso volume da 384 pozzetti (Costar, 3673). Successivamente, è stata preparata una soluzione contenente 1,2 nM di 33_640087-7B o 33_640237-2B etichettati DyLight650 e 2,5 microlitri sono stati aggiunti alla piastra di saggio (etichettata usando il kit (Innova Biosciences, 326-0010) secondo le istruzioni del fabbricatore). A ciò è seguita l'addizione di 2,5 microlitri di una soluzione contenente 0,12 nM di IL-33-01 umana biotinilata combinata con 0,75 nM di rilevamento di criptato di streptavidina (Cisbio International, 610SAKLB). Tutte le diluizioni sono state eseguite in un tampone di saggio contenente 0,8 M di fluoruro di potassio (VWR, 26820.236) e albumina di siero bovino allo 0,1% (BSA, PAA, K05-013) in PBS di Dulbecco (Invitrogen, 14190185). Le piastre di saggio sono state incubate per 4 ore a temperatura ambiente seguita da 18 ore a 4 gradi Celsius e la fluorescenza a risoluzione temporale è stata letta a lunghezze d'onda di emissione di 620 nm e 665 nm usando un lettore di piastre EnVision (Perkin Elmer). I dati sono stati analizzati calcolando il rapporto di 665/620 nm seguito dai valori Delta F in % per

ciascun campione. Il rapporto di 665/620 nm è stato usato per correggere l'interferenza di campione usando l'Equazione 1. Il Delta F in % per ciascun campione è stato quindi calcolato usando l'Equazione 2. Il controllo negativo (legame aspecifico) è stato definito sostituendo IL-33 biotinilata umana combinata con il rilevamento del criptato di streptavidina solo con il rilevamento di criptato di streptavidina. I valori Delta F in % sono stati successivamente usati per calcolare il legame specifico in % come descritto nell'Equazione 3. Valori di IC₅₀ sono stati determinati usando il software GraphPad Prism mediante adattamento della curva usando un'equazione logistica a quattro parametri (Equazione 4). Questi risultati hanno dimostrato che 33_640087-7B e 33_640237-2B reagiscono in modo crociato con IL-33 di cynomolgus ma non con IL-33 di topo, IL-33 di ratto, IL-1 alfa umana o IL-1 beta umana.

La **Figura 50A**: mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotta dal legame di IL-33-01 umana biotinilata a 33_640087-7B etichettato DyLight (SEQ ID N. 618 e 618), con concentrazioni crescenti di proteine di prova, in cui l'asse x è la concentrazione del campione di prova in concentrazione molare e l'asse y è un legame specifico percentuale. L'inibizione del segnale FRET è stata osservata con IL-33 umana e di cynomolgus, ma non di topo o ratto, IL-1 alfa umana o IL-1 beta umana.

La **Figura 50B**: mostra l'inibizione del segnale FRET, prodotta dal legame di IL-33-01 umana biotinilata a 33_640237-2B etichettato DyLight (SEQ ID N. 624 e 626), con concentrazioni crescenti di proteine

di prova, in cui l'asse x è la concentrazione del campione di prova in concentrazione molare e l'asse y è un legame specifico percentuale. L'inibizione del segnale FRET è stata osservata con IL-33 umana e di cynomolgus, ma non di topo o ratto, IL-1 alfa umana o IL-1 beta umana.

Neutralizzazione di IL-33 endogena nel saggio di IL-8 di HUVEC

Al fine di determinare se gli anticorpi fossero in grado di neutralizzare IL-33 endogena, è stato usato il tessuto polmonare umano per fornire una sorgente di proteina IL-33 endogena. Lo studio è stato approvato dal comitato etico di ricerca NRES East of England (Cambridge East) (numero di riferimento 08/H0304/56p5) e il tessuto è stato donato con il consenso informato dei pazienti. Tessuto adiacente non canceroso da pazienti con cancro polmonare e da interventi chirurgici di trapianto di polmone sono stati forniti in terreno Aqix RS-I (Aqix Ltd) su ghiaccio dalla Banca dei tessuti di ricerca del Papworth Hospital NHS Trust. Il tessuto è stato diluito con 400 mg/mL in PBS e omogeneizzato per 30 secondi usando un omogeneizzatore di tessuti. I detriti cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione. Le HUVEC sono state stimulate con lisati polmonari a concentrazioni variabili. Una concentrazione EC_{50} di lisato che stimolava un rilascio stimolato di IL-8 è stata selezionata per gli studi di neutralizzazione degli anticorpi. Le cellule sono state esposte al lisato polmonare in presenza o assenza di anticorpo di prova come descritto in precedenza. sST2 ha inibito la risposta di IL-8 di un massimo di approssimativamente il 70%,

suggerendo che la maggior parte, ma non tutta, la produzione di IL-8 era guidata da IL-33 endogena all'interno del lisato polmonare. IgG di 33_640050 e 33_640087-7B hanno inibito la risposta di IL-8 in misura simile a sST2, dimostrando la loro capacità di legare e neutralizzare IL-33 endogena. IgG di 33_640050 ha neutralizzato il lisato polmonare con una IC₅₀ di 0,032 nM. 33_640087-7B ha neutralizzato il lisato polmonare con una IC₅₀ di 0,013 nM. sST2 ha neutralizzato il lisato polmonare con una IC₅₀ di 0,019 nM

La **Figura 51** mostra HUVEC stimulate con lisato polmonare umano in presenza degli anticorpi di prova 33_640050 e 33_640087-7B rispetto a sST2, in cui l'asse x è la concentrazione di anticorpo in concentrazione molare e l'asse y è una percentuale della risposta massima (Produzione IL-8). sST2 ha inibito la risposta di IL-8 di un massimo di approssimativamente il 70%, suggerendo che la maggior parte, ma non tutta, la produzione di IL-8 era guidata da IL-33 endogena all'interno del lisato polmonare. Entrambi gli anticorpi hanno inibito la risposta di IL-8 in misura simile a sST2, dimostrando la loro capacità di legare e neutralizzare IL-33 endogena.

Modello di infiammazione delle vie aeree in vivo

I metodi per la generazione di topi IL-33 umanizzati sono stati precedentemente descritti nell'Esempio 4. Topi umanizzati sono stati usati in un modello di infiammazione delle vie aeree indotta da *Alternaria alternata* (ALT) come descritto nell'Esempio 9 per valutare l'effetto di 33_640087-7B. Topi IL-33 maschi o femmine selvatici o

umanizzati (6-10 settimane) sono stati anestetizzati brevemente con isofluorano e gli sono stati somministrati 25 µg di estratto di ALT (Greer, Lenoir, NC) o veicolo per via intranasale in un volume totale di 50 µl. I topi sono stati trattati per via intraperitoneale con sostanze di prova: IgG di 33_640087-7B (SEQ ID N. 618 e 618), IgG di controllo isotipo (NIP228) o veicolo (PBS, 10 ml/kg) a 24 ore prima della stimolazione intranasale con ALT. A 24 ore dopo la stimolazione, i topi sono stati anestetizzati alla fine con pentobarbital sodico prima del dissanguamento e del lavaggio broncoalveolare (BAL). Il liquido di lavaggio broncoalveolare (BALF) è stato raccolto mediante lavaggio (0,3 ml, 0,3 ml e 0,4 ml) tramite cannula tracheale. BALF è stato centrifugato e il surnatante è stato analizzato per le citochine mediante ELISA (Meso Scale Discovery, Rockville, MD). Tutto il lavoro è stato compiuto secondo gli standard etici e di allevamento del Ministero degli Interni del Regno Unito sotto l'autorità di una licenza di progetto appropriata.

La **Figura 52** mostra che 33_640087-7B inibisce in modo dose-dipendente IL-5 di BAL indotta da *Alternaria* nei topi IL-33 umanizzati. Le sostanze di prova sono state dosate per via intraperitoneale (0,1, 1,3 o 10 mg/kg indicato tra parentesi) a -24 ore prima della stimolazione con 25 ug di *Alternaria*. BALF è stato raccolto 24 ore dopo la stimolazione con ALT e analizzato per la presenza di IL-5. L'effetto significativo delle sostanze di prova è stato determinato usando ANOVA

unidirezionale con la prova di confronto multiplo di Bonferroni.
*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ (n=5-6).

Esempio 11 Affinità di anticorpi anti-IL-33

L'affinità del frammento di anticorpo anti-IL-33 (Fab) per IL33 umana ricombinante è stata determinata usando il monitoraggio di interazione in tempo reale di BIACORE™ e all'equilibrio utilizzando KinExA™ per 33_640087-7B. Per entrambe le metodologie la proteina IL33 umana è stata purificata mediante SEC-HPLC per garantire la qualità dell'antigene e anche del Fab per l'analisi biacore.

Analisi di affinità Biacore

I frammenti Fab sono stati generati dalla scissione della papaina da IgG1 a lunghezza intera e purificati mediante SEC. L'affinità del frammento di anticorpo (Fab) è stata misurata usando il Biacore T100 a 25 °C. La streptavidina è stata immobilizzata in modo covalente su una superficie del chip C1 usando tecniche di accoppiamento di ammine standard a una concentrazione di 4 µg/ml in 10 mM di Acetato di sodio pH 4,5. Sono state conseguite densità superficiali tipiche della streptavidina nell'intervallo 115-170 RU. IL-33 umana ricombinante, enzimaticamente biotinilata (prodotta in laboratorio) è stata titolata sulla superficie del chip di streptavidina a 4 µg/ml in tampone HBS-EP+ per abilitare il legame a ~30 RU di Fab alla saturazione (R_{max}). Questo basso livello di legame dell'analita ha garantito effetti di trasporto di massa minimi.

L'IL-33 Fab è stata diluita in serie da 5 nM a 78 pM in tampone HBS-EP+ e fatta fluire sul chip a 50 µl/min, con 3 minuti di associazione e fino a 30 minuti di dissociazione. Molteplici iniezioni di solo tampone sono state effettuate nelle stesse condizioni per consentire la doppia sottrazione di riferimento degli insiemi finali del sensorgramma, che sono stati analizzati usando il software BiaEval (versione 2.0.1). La superficie del chip è stata completamente rigenerata con impulsi di 3M MgCl₂.

L'affinità di ST2-Flag-His10 (SEQ. ID no. 650) espresso in cellule HEK-EBNA per IL-33 umana è stata determinata mediante BIACORE™ usando gli stessi metodi descritti sopra.

Tabella 36. Risultati di affinità Biacore per Fab anti-IL-33

Analita	Impostazione di adattamento	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (pM)	R_{max}	Chi ²
33_640001 Fab	Rmax globale	9,76 E+6	3,26 E-2	3340	27,0	0,022
33_640050 Fab	Rmax locale	3,08 E+7	1,05 E-4	3,4	48,9	0,022
33_640087-7B Fab	Rmax locale	2,20 E+7	9,42 E-6	0,43	30,7-32,8	0,010
Monomero ST2-FH	Rmax locale	1,52 E+7	4,35 E-5	2,9	23,4	0,022

Analisi di affinità KinExA

Al fine di confermare l'elevata affinità riscontrata con il saggio SPR, ci siamo rivolti ai Saggi di esclusione cinetica (KinExA). KinExA sta sempre più riscontrando successo per la risoluzione delle interazioni proteina:proteina di maggiore affinità, nella fattispecie quelle negli intervalli da pM a sub-pM dove le tecniche di biosensori basate sulla superficie raggiungono i loro limiti pratici (Rathanaswami P, Roalstad S, Roskos L, Qiaojuan JS, Lackie S, Babcook J. Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005; 334: 1004-1013).

L'affinità dell'anticorpo 33_640087-7B è stata misurata mediante saggi di esclusione cinetica eseguiti sul KinExA 3200. Le biglie di campionamento sono state preparate miscelando 200 mg di biglie secche UltraLink Biosupport Azlactone con 110 ug di IL-33 (come menzionato in precedenza) in 2,5 ml di 50 mM di bicarbonato di sodio idrogeno pH 8,4 a temperatura ambiente per 2 ore con agitazione costante. Le biglie sono state risciacquate e bloccate con 10 mg/ml di BSA in 1M di Tris pH 8,7. Prima dell'uso, le biglie sono state risospese in D-PBS, azoturo di sodio allo 0,02%. Le miscele di equilibrio di 33_640087-7B/IL-33 sono state preparate in un tampone campione composto da 1 mg/ml di BSA, azoturo di sodio allo 0,02% in DPBS (PBS di Dulbecco). Sono state usate due diverse concentrazioni di IgG con varie concentrazioni di IL-33, 5 pM di 33_640087-7B con IL-33

diluata in serie da 125 pM a 61 fM e 500 fM di 33_640087-7B con IL-33 diluita in serie da 62,5 pM a 15 fM, entrambe compiute con zero controlli di IL-33. Il reagente fluorescente di rilevamento secondario era Fc anti-umano di capra Alexa Fluor 647 diluito in 1 mg/ml di BSA, azoturo di sodio allo 0,02%, Tween 20 allo 0,1% in DPBS. I campioni sono stati analizzati sul KinExA mentre erano alloggiati in un armadio a temperatura controllata impostato a 25 °C. I dati sono stati analizzati usando la versione del software KinExA Pro 4.1.11.

I saggi KinExa indicano che 33_640087-7B ha una K_D di <142 fM (femtomolare) per IL-33 umana (**Tabella 37**).

Tabella 37. Risultati di affinità KinExA per IgG di 33_640087-7B

Analita	K_D (pM) stimata	K_D (pM) di intervallo di confidenza superiore al 95%	K_D (pM) di intervallo di confidenza inferiore al 95%
33_640087-7B	0,03	0,142	non definito

Esempio 12 Attività di IL-33 ossidata

Studio pilota in vivo per esplorare attività di IL-33 ossidata

Nell'Esempio 4 (si veda anche Cohen, E. S. et al. Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. Nat. Commun. 6:8327 doi: 10.1038/ncomms9327 (2015)) descriviamo la scoperta di una forma ossidata e legata con disolfuro di IL-33 (DSB IL-33) e

abbiamo mostrato che questa forma non si lega a ST2. Per indagare se IL-33 ossidata avesse un'attività alternativa indipendente da ST2, i topi carenti di ST2 sono stati trattati per via intraperitoneale o intranasale con dosi ripetute di IL-33 umana per 2, 4 o 6 settimane. L'analisi istologica è stata eseguita su molteplici tessuti.

I topi con carenza di ST2 sono stati generati come descritto in precedenza (Townsend, M.J., Fallon, P.G., Matthews, D.J., Jolin, H.E., e McKenzie, A.N.J. (2000). I topi con carenza di T1/ST2 dimostrano l'importanza di T1/ST2 nello sviluppo di risposte primarie di cellule T helper di tipo 2. *J. Exp. Med.* 191, 1069-1076). Topi femmina con carenza di ST2 (12 settimane) sono stati anestetizzati brevemente con isofluorano e gli sono stati somministrati 10 µg di IL-33 His Avi N-terminale (IL33-01, SEQ ID NO 632; numero di lotto CCH168, livelli di endotossina 0,03 EU/mg), o veicolo (PBS) per via intranasale in un volume totale di 50 µl. In alternativa, l'IL-33 o veicolo è stato somministrato mediante iniezione i.p.. Questo processo è stato ripetuto 3 volte alla settimana per un totale di 18 trattamenti. Ai topi che hanno ricevuto solo 2 o 4 settimane di trattamento con IL-33 è stato somministrato PBS per le prime 4 o 2 settimane di dosaggio, prima di ricevere IL-33.

A 24 ore dall'ultimo trattamento, i topi sono stati alla fine anestetizzati con pentobarbitale sodico prima del dissanguamento e del lavaggio broncoalveolare (BAL). Il sangue è stato raccolto mediante sanguinamento cardiaco usando una siringa risciacquata con EDTA.

L'ematologia del sangue è stata eseguita usando l'analizzatore ematologico Sysmex XTVet. Il sangue rimanente è stato centrifugato ed estratto il plasma. Il liquido di lavaggio broncoalveolare (BALF) è stato raccolto mediante lavaggio (0,3 ml, 0,3 ml e 0,4 ml) tramite cannula tracheale. Sono state contate le cellule BAL (cellule totali BAL mediante citometria di flusso (MACSquant, Miltenye Biotec) e BALF è stato centrifugato per separare il surnatante, che è stato analizzato per le citochine mediante ELISA (Meso Scale Discovery, Rockville, MD). I conteggi differenziali delle cellule (200 cellule/vetrino) sono stati eseguiti su preparati di citospin colorati con Diff-Quik (Fisher Scientific, REGNO UNITO). A seguito di lavaggio con PBS i polmoni sono stati gonfiati con formalina tamponata neutra al 10% (NBF) tramite infusione tracheale per mantenere l'architettura polmonare e fissati in immersione in NBF per 24-48 ore. I campioni di polmone fissi sono stati quindi tagliati trasversalmente in 4 sezioni trasversali uguali prima di essere processati attraverso una serie di alcoli, xilene e cera di paraffina. Infine, le sezioni trasversali del polmone sono state quindi incorporate in blocchi di paraffina. Sezioni istologiche da 4 µm sono state tagliate e colorate con ematossilina ed eosina (H&E) per l'analisi e la valutazione del punteggio dell'infiammazione.

Tutto il lavoro è stato compiuto secondo gli standard etici e di allevamento del Ministero degli Interni del Regno Unito sotto l'autorità di una licenza di progetto appropriata.

Per indagare l'esposizione a IL-33 tramite vie intraperitoneali o intranasali, IL-33 umana è stata misurata in BALF e plasma usando il saggio di IL-33 umana Millipore (Cat # HTH17MAG-14K lotto 2159117) come descritto nell'Esempio 4. La capacità di sST2-Fc di ridurre il segnale di saggio è stata usata per determinare la presenza di ST2 legante (ridotto) rispetto a ST-2 non legante (ossidato) IL-33. A seguito di somministrazioni intranasali, IL-33 è stata rilevata in modo coerente nel BALF e nel plasma nei punti di estremità di 2, 4 e 6 settimane. La maggior parte dell'IL-33 rilevata è stata ossidata. A seguito di una singola somministrazione intraperitoneale, IL-33 è stata rilevata in modo transiente nel plasma 5 ore dopo la somministrazione, ma non è stata rilevabile entro 24 ore. A seguito di somministrazioni ripetute di IL-33, IL-33 umana non è stata rilevata in modo coerente nel BALF o nel plasma nei punti di estremità di 2, 4 o 6 settimane. Questi dati hanno indicato che la migliore esposizione sistemica a IL-33 ossidata si consegue attraverso il dosaggio intranasale.

Figura 53A. Progettazione sperimentale di studio pilota in vivo. I topi con carenza di ST2 sono stati trattati per via intraperitoneale o intranasale con somministrazione ripetuta di IL-33 umana o veicolo (PBS) per 6 settimane (n = 3-4 per gruppo). I tessuti, il BALF e il siero sono stati raccolti 24 ore dopo la somministrazione finale di IL-33.

Figura 53B. Analisi dell'esposizione a IL-33 umana nel fluido BAL a seguito di somministrazione ripetuta di IL-33 umana a topi BALB/c. IL-33 umana è stata misurata in BALF da topi trattati come

descritto nella Figura 53A, dove l'asse x mostra il gruppo di trattamento e l'asse y mostra il segnale di saggio di IL-33 umana in unità arbitrarie. IL-33 è stata rilevata solo in BALF a seguito di somministrazione intra-nasale. L'IL-33 rilevata è stato riscontrato fosse prevalentemente ossidata (ST2 non legante).

Figura 53C Analisi dell'esposizione a IL-33 nel plasma in seguito a una singola somministrazione intraperitoneale di IL-33 umana (10ug). IL-33 umana è stata misurata nel plasma a 2, 5, 24 e 48 ore a seguito di somministrazione, dove l'asse x mostra il punto temporale dell'analisi e l'asse y mostra il segnale di saggio di IL-33 umana in unità arbitrarie. IL-33 è stata rilevata in modo transiente nel plasma 5 ore dopo il dosaggio, ma non è stata rilevabile entro 24-48 ore.

Figura 53D Analisi dell'esposizione a IL-33 nel plasma a seguito di somministrazione ripetuta di IL-33 umana a topi BALB/c. IL-33 umana è stata misurata in plasma di topi trattati come descritto nella Figura 53A, in cui l'asse x mostra il gruppo di trattamento e l'asse y mostra il segnale di saggio di IL-33 umana in unità arbitrarie. IL-33 è stata rilevata solo nel plasma a seguito somministrazione intra-nasale. L'IL-33 rilevata è stato riscontrato fosse prevalentemente ossidata (ST2 non legante).

L'analisi istologica è stata eseguita su molteplici tessuti. Non si è manifestata alcuna anomalia rilevante nei topi umani trattati con IL-33 rispetto ai controlli nel fegato, cervello, milza, pelle, stomaco, linfonodi o cuore. Nel polmone, nei topi trattati con IL-33 era presente una

maggiore infiammazione perivascolare linfocitica rispetto ai controlli solo nel gruppo intranasale e solo dopo 6 settimane di trattamento. Ciò è coerente con la più alta esposizione a IL-33 ossidata (**Figura 53**). In conclusione, il trattamento dei topi KO ST2 con IL-33 aumenta la presenza di infiltrato linfocitico perivascolare nei polmoni dei topi trattati con IL-33 rispetto ai controlli. Questa patologia può essere mediata attraverso IL-33 ossidata.

La **Figura 54A** mostra sezioni rappresentative di paraffina colorata con H&E di tessuto polmonare di topi a cui è stato somministrato PBS per via nasale per 6 settimane (n = 3)

La **Figura 54B** mostra sezioni rappresentative di paraffina colorata con H&E di tessuto polmonare di topi a cui è stata somministrata IL-33 per via intranasale per 6 settimane (n = 4).

Analisi di via del polmone di topo trattato con IL-33

Per trarre approfondimenti sulle vie modulate da IL-33 ossidata nel polmone del topo che comportano la risposta infiammatoria osservata, è stata eseguita un'analisi di micromatrice sul tessuto polmonare di 6 settimane trattato con PBS rispetto a 6 settimane trattato con IL-33.

I tessuti polmonari di 7 topi KO ST2 (3 sottoposti a dosaggio di PBS e 4 sottoposti a dosaggio di IL33-01 come descritto sopra) sono stati raccolti e posti direttamente in 350uL di tampone RLT (Qiagen # 79216). Il tessuto è stato quindi disgregato usando un Qiagen TissueLyser (Qiagen # 85300) secondo il protocollo del fabbricatore e

l'RNA è stato purificato usando il kit per tessuti fibrosi RNeasy (Qiagen # 74704). L'RNA purificato di questo kit è stato quindi concentrato usando Micro colonne RNeasy (Qiagen # 74004) secondo il protocollo del fabbricatore. L'RNA è stato quindi amplificato in DNA a filamento singolo usando il kit di reagenti GeneChip WT Plus di Affymetrix (Affymetrix # 902513) e ibridato su gene-chip di trascrittoma di topo 1.0 (MTA1.0) (Affymetrix # 900720), lavato in stazione per fluidi Affymetrix e scansionato con Scanner Genechip Affymetrix 3000 7G. I dati sono stati quindi processati nella console Affymetrix Expression. I dati sono stati analizzati in Microsoft Excel e ordinati per geni in cui almeno 2 topi trattati con IL33 su 4 avevano una variazione di segnale maggiore di $\pm 1,2$ volte rispetto alla media del gruppo di controllo. L'elenco dei geni ordinati è stato convertito in ID KEGG usando Biological Database Network (BioDBnet v2.1) e analizzato nell'analisi di via KEGG (www.kegg.jp; KEGG Mapper v2.5). Gli stessi geni che sono stati analizzati nella via KEGG sono stati analizzati anche usando Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Qiagen). L'analisi IPA ha suggerito che le vie relative al ciclo cellulare risultavano modulate. Geni esemplificativi sono elencati nella **Tabella 38**.

Tabella 38. Geni modulati in topi carenti di ST2 mediante trattamento di IL-33 intranasale

	Simboli genici
Geni sovraregolati correlati al ciclo cellulare (cambiamento di	HSPA1A, CEBP, CDKN1A, JUNB, AHCY, SOX2, MYC, ID2, HRAS,

	Simboli genici
piega medio > 1,2)	EGR1, WT1, JUND, COX4I1
Geni sottoregolati correlati al ciclo cellulare (cambiamento di piega medio > 1,2)	ILIA, HGF, ERG, ZEB1, P10, DMTF1, ARHGAP18, PLA2R1, NSMCE2, CAV1

Segnalazione di IL-33 DSB in Huvec

Per accertare se una risposta a IL-33 umana ossidata (DSB) potesse essere osservata su cellule umane, è stata esplorata la stimolazione di cellule umane in vitro. L'analisi di micromatrice di topo ha indicato l'attivazione di vie relative al ciclo cellulare e pertanto sono stati studiati i segnali di p38 MAP Chinasi e JAK-STAT. Le cellule endoteliali della vena ombelicale umana (Huvec) sono state coltivate secondo le istruzioni del fabbricatore e stimulate con IL-33 ridotta o DSB. La traslocazione nucleare di p-p38 MAPK o p-STAT5 è stata rilevata mediante colorazione di immunofluorescenza. La formazione di immagini e la quantificazione dell'intensità di colorazione nucleare sono state eseguite su ArrayScan VTi HCS Reader (Cellomics). Il saggio era essenzialmente uguale a quello descritto per la traslocazione nucleare di NFkB p65/Re1A ma con le seguenti modificazioni.

Per il saggio p-p38 MAPK, Huvec sono state seminate a 1×10^4 /75 µl/pozzetto in terreni di coltura [EBM-2 (Lonza, # CC-3156) con Kit Suppl. EGM-2 SingleQuot e fattori di crescita (Lonza, # CC-4176)] in piastre rivestite di collagene I trasparente con fondo piatto e

pareti nere da 96 pozzetti (Greiner # 655956) e incubate a 37 °C, con CO₂ al 5% per 18-24 ore. Campioni di prova di IL-33 ridotta o DSB (in duplicato) sono stati diluiti alla concentrazione desiderata in terreni di coltura completi in piastre di polipropilene con fondo a U da 96 pozzetti (Greiner, 650201) e 75uL aggiunti alle piastre Huvec per iniziare la stimolazione. A seguito di 15 o 30 minuti di incubazione del saggio a 37 °C, le cellule sono state fissate per 15 minuti in una soluzione di formaldeide al 3,7% (mediante aggiunta di 50 uL di soluzione al 16% che era stata preriscaldata a 37 °C). Il fissativo è stato aspirato e le cellule sono state lavate due volte con 100 µl/pozzetto di PBS. Le cellule sono state colorate per p-p38 con l'anticorpo Phospho-p38 (segnalazione cellulare # 9211S) con diluizione 1:250. In breve, le cellule sono state permeabilizzate per 15 minuti a temperatura ambiente, bloccate per 15 minuti e colorate per 1 ora con una soluzione di anticorpo primario in un volume di 50 µl. Le piastre sono state lavate x 2 in tampone bloccante e colorate per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione di anticorpo secondario (IgG anti-coniglio di capra etichettata con DyLight 488; ThermoFisher Scientific # 35552 a diluizione 1:400) e colorazione nucleare di Hoechst (ThermoFisher Scientific # 62249 a diluizione 1:10000). Le piastre sono state lavate 2 volte in PBS. Le cellule sono state conservate in un volume finale di 150 µl/pozzetto di PBS e coperte con un sigillo nero bloccante la luce (Perkin Elmer, # 6005189) prima della lettura su ArrayScan VTi HCS Reader. L'intensità della colorazione nucleare è stata calcolata usando

un algoritmo idoneo. I dati sono stati analizzati usando il software Graphpad Prism.

Per il saggio pSTAT5, Huvec sono state seminate a 1×10^4 /75 μ L/pozzetto in terreni di coltura [EBM-2 (Lonza, # CC-3156) con Kit Suppl. EGM-2 SingleQuot e fattori di crescita (Lonza, # CC-4176)] in piastre rivestite di collagene I trasparente a fondo piatto e pareti nere da 96 pozzetti (Greiner, # 655956) e incubate a 37 °C, con CO₂ al 5% per 18-24 ore. A seguito di aspirazione di questo terreno completo, le cellule sono state lavate 2 x in 100 μ L di PBS/pozzetto, il PBS è stato aspirato e 75 μ L di terreno Starve [EBM-2 (Lonza, # CC-3156) con pen/streptococco] sono stati aggiunti a ciascun pozzetto. Le cellule sono state quindi incubate a 37 °C, con CO₂ al 5% per 18 ore. Campioni di prova di IL-33 ridotta o DSB (in duplicato) sono stati diluiti alla concentrazione desiderata in terreni Starve in piastre di polipropilene con fondo a U da 96 pozzetti (Greiner, 650201) e 75 μ L aggiunti alle piastre Huvec per iniziare la stimolazione. A seguito di 15 o 30 minuti di incubazione del saggio a 37 °C, le cellule sono state fissate per 15 minuti in una soluzione di formaldeide al 3,7% (mediante aggiunta di 50 μ L di soluzione al 16% che era stata preriscaldata a 37 °C). Il fissativo è stato aspirato e le cellule sono state lavate due volte con 100 μ L/pozzetto di PBS. Le cellule sono state colorate per p-STAT5 con l'anticorpo di coniglio Phospho-STAT5 C71E5 (Cell Signaling # 9314S) a diluizione 1:250, che è stata rilevata come descritto sopra.

IL-33 ridotta ha innescato la segnalazione MAPK p-p38, che è stata persa in seguito all'ossidazione nella forma DSB (**Figura 55A**), simile a quella precedentemente descritta per la segnalazione di NFkB (Esempi 4-6). Tuttavia, IL-33 DSB, ma non IL-33 ridotta, ha innescato la segnalazione di p-STAT5 (**Figura 55B**). Quindi, è stata osservata una chiara commutazione nell'attivazione della via di segnalazione in seguito alla conversione dell'IL-33 umana dalla forma ridotta a quella DSB, suggerendo che IL-33 DSB potrebbe avere un'attività distinta dalle vie IL-33 note.

Per confermare il risultato dei saggi di traslocazione nucleare, la segnalazione di IL-33 è stata determinata mediante analisi Western blot. Huvec sono state stimulate come sopra con IL-33 ridotta o DSB (3 ng/mL) per 15 minuti. Le cellule sono state quindi lavate due volte in PBS ghiacciato e lisate con 250 uL di tampone RIPA (Pierce # 89901) contenente inibitori della proteasi HALT (Pierce # 78430). I campioni sono stati sottoposti a SDS-PAGE in condizioni riducenti. I campioni sono stati miscelati 3:1 con tampone di caricamento di gel 4x NuPAGE (Invitrogen) e denaturati a 90 °C per 3 minuti. I campioni ridotti contenevano beta-mercaptoetanololo al 2%. I campioni sono stati fatti scorrere su mini gel Bis-Tris al 4-12% NuPAGE Novex (Invitrogen) con tampone di scorrimento MOPS (Invitrogen) secondo le istruzioni del fabbricatore. Le proteine sono state trasferite alle membrane di Nitrocellulosa (Invitrogen n. cat. IB3010-02) e rilevate mediante western blotting con anticorpo MAPK fosfo-p38 di coniglio (Segnalazione

cellulare # 9211S), anticorpo fosfo-STAT5 di coniglio C71E5 (segnalazione cellulare # 9314S) o anticorpo di coniglio p-JAK2 (Cell Signaling # 3771S). Gli anticorpi primari sono stati rilevati con anti-coniglio-HRP (Segnalazione cellulare # 7074) e visualizzati usando il reagente ECL (Thermo Scientific # 34096).

La **Figura 55A** mostra l'attività di traslocazione nucleare di p-p38 MAPK in Huvec in risposta a IL-33 ridotta o IL-33 DSB (IL33-01 pretrattata con terreni IMDM), dove l'asse x mostra la concentrazione di IL-33 e l'asse y mostra il segnale di traslocazione nucleare in unità arbitrarie. È stato osservato un segnale dipendente dalla concentrazione per IL-33 ridotta ma non ossidata.

La **Figura 55B** mostra la traslocazione nucleare di p-STAT5 in Huvec in risposta a IL-33 ridotta o IL-33 DSB (IL33-01 pretrattata con terreni IMDM), in cui l'asse x mostra la concentrazione di IL-33 e l'asse y mostra il segnale di traslocazione nucleare in unità arbitrarie. È stato osservato un segnale dipendente dalla concentrazione per DSB ma non IL-33 ridotta.

Figura 55C. Analisi Western blot di p-p38 MAPK, p-JAK2 e p-STAT5 in Huvec stimulate per 15 minuti con IL-33 ridotta o IL-33 DSB (IL33-01 pretrattata con terreni IMDM). L'attivazione di p-p38 MAPK è stata rilevata a seguito di stimolazione con IL-33 ridotta ma non DSB. L'attivazione di p-JAK2 e p-STAT5 è stata rilevata a seguito di stimolazione con IL-33 DSB ma non IL-33 ridotta.

La segnalazione di IL-33 DSB è mediata tramite il recettore per i prodotti finali della glicazione avanzata (RAGE)

Per trarre approfondimenti sulle vie modulate da IL-33 DSB in Huvec, le Huvec sono state coltivate come descritto in precedenza, piastrate a 1×10^6 cellule/pozzetto in una piastra trattata con coltura tissutale da 6 pozzetti (Nunc 140675). A seguito di incubazione di una notte, le cellule sono state stimulate con IL-33 DSB per 2 o 6 ore. Le cellule sono state raccolte in 350uL di tampone RLT (Qiagen # 79216). L'RNA è stato purificato usando il kit RNeasy Micro (Qiagen # 74004) secondo il protocollo del fabbricatore. L'RNA è stato quindi amplificato in DNA a singolo filamento usando il kit di reagenti GeneChip WT Plus di Affymetrix (Affymetrix # 902513) e ibridato su gene-chip del genoma umano U133A 2.0 (U133A 2.0) (Affymetrix # 900469), lavato in stazione di fluidi Affymetrix e scansionato con Scanner Genechip Affymetrix 3000 7G. I dati sono stati quindi processati nella console Affymetrix Expression e ordinati per geni con una variazione di segnale maggiore di $\pm 1,8$ volte rispetto al controllo non trattato. Sono stati osservati pochissimi cambiamenti di espressione genica (**Tabella 39**). Tuttavia, il panel genetico limitato è stato analizzato usando Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Qiagen), che ha suggerito la via di segnalazione EIF2 a 2 ore e la segnalazione AGER a 6 ore. Potenzialmente questi suggeriscono lo spazzamento/recettore per l'attivazione della via dei prodotti finali della glicazione avanzata (RAGE).

Tabella 39. Geni modulati in Huvec stimulate da IL-33 DSB.

Punto temporale	Simboli genici
	Geni regolati con cambiamento di piega $>\pm 1,8$
2 ore	EIF3F, RPL14, RPL38, RPL27A, RPL37A, RPS10, RPS27L
6 ore	IFIT1, S100A8

Il recettore per i prodotti finali della glicazione avanzata (RAGE) è un recettore multi-ligando che appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline e riconosce una varietà di ligandi, incluse la casella di gruppo 1 ad alta mobilità (HMGB-1), la famiglia di proteine S100, prodotti finali della glicazione (AGE) e materiali fibrillari a β -foglietto. Si ritiene che sia coinvolto nello stress ossidativo ed è stato collegato alla patogenesi di numerose malattie.

Per valutare se DSB abbia interagito direttamente con RAGE, è stato usato un formato ELISA per esplorare il legame di RAGE a IL-33 ridotta rispetto a IL-33 DSB (**Figura 56A**). IL-33 n-terminale His Avi ridotta o DSB (IL33-01, SEQ ID NO 632) sono state biotinilate come descritto nell'Esempio 7. Le piastre di streptavidina (Thermo Scientific, AB-1226) sono state rivestite con antigene biotinilato a 50 $\mu\text{g/ml}$ in PBS e incubate a temperatura ambiente per 1 ora. Le piastre sono state lavate 3 volte con PBS-T (PBS + Tween-20 all'1% (v/v)) e bloccate con 300 μl di tampone bloccante (PBS con BSA all'1% (Sigma, A9576)) per

1 ora. Le piastre sono state lavate 3 volte con PBS-T. RAGE-Fc (R&D Systems # 1145-RG) è stato diluito in tampone bloccante, aggiunto ai pozzetti rivestiti con IL-33 o di controllo (senza IL-33) e incubato a temperatura ambiente per 1 ora. RAGE-Fc è stato rilevato con HRP di anti-IgG umana (Sigma, A0170) diluito 1:5000 in tampone bloccante, 50 µl/pozzetto per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate 3 volte con PBS-T e sviluppate con TMB, 50 µl/pozzetto (Sigma, T0440). La reazione è stata spenta con 50 µl/pozzetto di 0,1 M di H₂SO₄ prima della lettura su un lettore di piastre EnVision™, o un'apparecchiatura simile, a 450 nm.

Per confermare ulteriormente l'interazione di IL-33 DSB con RAGE, è stata valutata la capacità degli anticorpi RAGE-Fc o anti-RAGE di inibire la segnalazione pSTAT5 indipendente da ST2 in Huvec. A tale scopo, sono state usate concentrazioni variabili di IL-33 DSB (IL33-01 trattata con IMDM) per stimolare Huvec secondo il protocollo sopra descritto in presenza o in assenza di RAGE-Fc (R&D Systems # 1145-RG), ST2- Fc (R&D Systems # 523-ST), mAb anti-RAGE (da WO 2008137552) o reagenti di controllo. La neutralizzazione di IL-33 DSB con RAGE-Fc (**Figura 56B**), o la neutralizzazione del recettore con mAb anti-RAGE (**Figura 56C**) sono state in grado di inibire completamente il segnale pSTAT5.

Figura 56A. Legame di RAGE-Fc alla superficie della piastra di IL-33 ridotta o DSB mediante ELISA, dove l'asse x mostra la concentrazione di RAGE-Fc e l'asse y mostra l'assorbanza a 450 nM. I

dati hanno mostrato un maggiore legame di RAGE con IL-33 DSB rispetto a IL-33 ridotta.

La **Figura 56B** mostra la risposta pSTAT5 a IL-33 DSB in Huvec in presenza di RAGE-Fc (50 ug/mL), ST2-Fc (50 ug/mL) o anticorpo di controllo negativo anti-NIP IgG1, NIP228 (50ug/mL). La segnalazione di pSTAT5 è stata completamente inibita da RAGE-Fc ma non da ST2-Fc o NIP228.

La **Figura 56C** mostra la risposta pSTAT5 a IL-33 DSB in Huvec in presenza di anticorpo mAb anti-RAGE, m4F4 (10ug/mL) o anticorpo di controllo negativo di **IgG1** di topo (10ug/mL). La segnalazione pSTAT5 è stata completamente inibita da m4F4 ma non da mAb di controllo.

Prevenzione dell'attività di IL-33 DSB con anticorpi anti-IL-33

Come descritto nell'Esempio 8, gli anticorpi che legano IL-33 possono impedire l'ossidazione di IL-33 nella forma DSB (**Figura 43A**). È stata valutata la capacità degli anticorpi IL-33 di prevenire la segnalazione di pSTAT5 in Huvec.

Concentrazioni fisse di 33_640087-7B (SEQ ID N. 616 e 618), Anti-ST2 (da WO 2013/173761 Ab2; SEQ ID 85 e SEQ ID 19) e mAb di controllo dell'isotipo sono state preparate in IMDM e quindi combinate (100 uL con 100 uL) con una titolazione di IL-33 WT (preparata anche in IMDM) in piastre con fondo a U da 96 pozzetti. Le piastre sono state incubate a 37 °C e con CO₂ al 5% per una notte. 75 ul da ciascun

pozzetto di queste piastre di "trattamento di preincubazione" sono stati aggiunti a cellule "a digiuno" preparate come descritto sopra per il saggio pSTAT5 e incubate a 37 °C per 15 minuti. Le cellule sono state quindi lavate due volte in PBS ghiacciato e un tampone di lisi da 100 uL di eBioscience Phospho-STAT5A/B Instant One ELISA (eBioscience # 85-86112-11) è stato aggiunto a ciascun pozzetto. L'attività di pSTAT5 nei lisati cellulari è stata quindi misurata secondo le istruzioni del fabbricatore.

La **Figura 57** mostra la risposta pSTAT5 in Huvec a IL-33 trattata con IMDM in presenza di 33_640087-7B (10ug/mL) o mAb Anti-ST2, Ab2, (10ug/mL), in cui l'asse x è la concentrazione di IL-33 e l'asse y è il segnale pSTAT5. La segnalazione pSTAT5 è stata completamente inibita da 33_640087-7B ma non da anti-ST2, confermando che questa risposta è indipendente da ST2.

Gli anticorpi anti-IL-33 inibiscono la risposta dipendente da RAGE nelle cellule epiteliali

RAGE è altamente espresso nelle cellule epiteliali polmonari. Le linee cellulari epiteliali polmonari sono state valutate per le risposte dipendenti da IL-33 DSB. A tale scopo, le cellule A549 sono state coltivate in terreno F12K (Gibco # 21127022) integrato con penicillina/streptomicina all'1% e FBS al 10%. Le cellule sono state raccolte con tripsina-EDTA allo 0,5% (Gibco, # 15400-054), lavate e seminate in piastre da 96 pozzetti a 1×10^5 /cellule/pozzetto in terreni di coltura. Le cellule sono state quindi incubate a 37 °C, con CO₂ al 5%

per 24 ore. Il giorno successivo è stato rimosso il terreno completo, le cellule sono state lavate due volte in PBS e il terreno è stato sostituito con un terreno "Starve" (terreno F12K con Pen/Strep all'1%) e le piastre incubate per 24 ore a 37 °C e con CO₂ al 5%.

Sono state preparate concentrazioni fisse di 33_640087-7B (SEQ ID N. 616 e 618), Ab2 Anti-ST2 (WO 2013/173761 (SEQ ID 85 e SEQ ID 19)), m4F4 anti-RAGE (da WO 2008137552) e mAb di controllo di isotipo in IMDM e poi combinate (100 uL con 100 uL) con IL-33 WT (preparata anche in IMDM) in piastre con fondo a U da 96 pozzetti. Sia le piastre cellulari sia quelle di trattamento sono state incubate a 37 °C e con CO₂ al 5% per una notte. 75 ul da ciascun pozzetto di queste piastre di "trattamento di preincubazione" sono stati aggiunti a cellule "a digiuno" preparate come descritto sopra e le piastre sono state incubate per 24 ore a 37 °C e con CO₂ al 5%. Il sistema transwell a 96 pozzetti (Corning # CLS3422-48EA) viene quindi impostato aggiungendo una piastra transwell a 96 pozzetti a una piastra ricevente da 96 pozzetti a basso legame. 235 ul di terreno completo (terreno F12K integrato con FBS al 10% e Pen/Strep all'1%) sono stati aggiunti alla camera inferiore del sistema transwell. Ciascuna delle cellule A549 dei 96 pozzetti ben trattate è stata quindi lavata in PBS, tripsinizzata per staccarla, centrifugata a 1000 giri/minuto per 5 min, risospesa in terreni "Starve" da 75 ul e aggiunta alla camera superiore del sistema transwell. La piastra transwell è stata quindi incubata a 37 °C, con CO₂ al 5% per 16 ore. I terreni sono stati quindi rimossi dalle camere superiore e inferiore

e le cellule sono state rimosse dalla camera inferiore usando 235 uL di tripsina. 100 ul di tripsina/sospensione cellulare sono stati quindi aggiunti a 100 ul di Cell Titer Glo (Promega # G7571). Una titolazione di cellule A549 fresche viene preparata in tripsina e aggiunta 50:50 a Cell Titer Glo per creare una curva standard del numero di cellule. Le piastre sono state quindi incubate e lette secondo le istruzioni del fabbricatore.

La **Figura 58A** mostra la migrazione delle cellule A549 a seguito di trattamento con IL33-01 incubata in presenza di 33_640087-7B (10ug/mL), mAb Anti-ST2, Ab2, (10ug/mL) o mAb anti-RAGE 4F4, in cui l'asse x mostra le condizioni di pretrattamento delle cellule e l'asse y è il numero di cellule migrate. I dati dimostrano che il pretrattamento delle cellule A549 con IL-33 DSB riduce la successiva migrazione cellulare. Questa inibizione della migrazione è stata invertita da mAb anti-RAGE e 33_640087-7B ma non da anti-ST2.

La **Figura 58B** mostra la migrazione delle cellule A549 a seguito di trattamento con IL33-01 DSB incubata in presenza di 33_640087-7B (10ug/mL) o mAb Anti-ST2, Ab2, (10ug/mL), in cui l'asse x mostra le condizioni di pretrattamento delle cellule e l'asse y è il numero di cellule migrate. I dati dimostrano che il pretrattamento delle cellule A549 con IL-33 DSB riduce la successiva migrazione cellulare. Questa inibizione della migrazione non è stata annullata da 33_640087-7B o anti-ST2

Insieme, questi dati confermano che 33_640087-7B inibisce l'attività di DSB-IL_33 prevenendo la conversione di IL-33 ridotta in IL-

33 DSB anziché neutralizzare direttamente IL-33 DSB, coerentemente con la sua capacità di legare solo la forma ST2-attiva ridotta di IL-33.

ELENCO DELLE SEQUENZE

[0644]

```

<110> Medimmune Ltd
<120> UNA NUOVA FORMA DI IL33, FORME MUTATE DI IL33, ANTICORPI,
SAGGI E METODI D'USO DEGLI STESSI
<130> IL33-105W01
<140> US 62/140,913
<141> martedì 31 marzo 2015
<150> tbd
<151> 30 March 2016
<160> 650
<170> PatentIn versione 3.5
<210> 1
<211> 372
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330002
<400> 1
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagtcg      300
tattacgatt tttggagtgg ccaatattac tttgattact gggggcgggg gaccacggtc      360
accgtctcga gt                                                                372
<210> 2
<211> 124
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330002
<400> 2
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	Arg	Glu	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Phe	Trp	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Phe	Asp
			100					105						110	

Tyr	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120				

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330002
 <400> 3

Ser	Tyr	Ala	Met	Ser
1				5

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330002
 <400> 4

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

Gly

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330002
 <400> 5

Glu	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Phe	Trp	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5					10				15	

<210> 6
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330002
 <400> 6

tcctatgagc tgactcagcc accctcattg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
acctgctctg gagataaatt gggagataaa tatgtttcct ggtatcaaca gaagccaggc 120
cagtccccta tcctgggtcat ctatcacgat aacaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagtaacg ctggatatgt cttcggaact 300
gggaccaagg tcaccgtcct a 321

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VL Homo sapiensIL330002

<400> 7

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

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

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

His Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Asn Ala Gly Tyr
85 90 95

Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330002

<400> 8

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330002

<400> 9

```

His Asp Asn Lys Arg Pro Ser
1          5
<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330002
<400> 10
Gln Ala Trp Asp Ser Asn Ala Gly Tyr Val
1          5          10
<210> 11
<211> 372
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330004
<400> 11
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc      60
tctctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagtcg      300
tattacgatt tttggagtgg ccaatattac ttgattact ggggccaagg gacaatggtc      360
accgtctcga gt      372
<210> 12
<211> 124
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330004
<400> 12

```

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 Arg Glu Ser Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Gln Tyr Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330004

<400> 13

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330004

<400> 14

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

Gly

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330004

<400> 15

Glu Ser Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Gln Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 16
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330004
 <400> 16
 tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac tgccagcatc 60
 tcctgctctg gagataaatt gggggataaa tttgcttcct ggtatcagca aaagccaggc 120
 cagtcgccctg tcttgatcat ctatcaggat aggaagcggc cctcaggaat ccctgagcgg 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccagactacc 240
 gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacggcagcc tttatgtctt cggaactggg 300
 accaagctga ccgtccta 318
 <210> 17
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330004
 <400> 17
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Ser Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Phe Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Ile Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Arg Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Thr
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Gly Ser Leu Tyr Val
 85 90 95
 Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>

```

<223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330004
<400> 18
Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Phe Ala Ser
1          5          10
<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330004
<400> 19
Gln Asp Arg Lys Arg Pro Ser
1          5
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330004
<400> 20
Gln Ala Trp Asp Gly Ser Leu Tyr Val
1          5
<210> 21
<211> 369
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330020
<400> 21
caggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc agctacggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgatt accaggggta taaaaagtat 180
gcagagaagt tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgaa cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagactgtat 300
agcagtggtt ggatacgtca gtaccacttt gactattggg gccgaggcac cctggtcacc 360
gtctcgagt 369
<210> 22
<211> 123
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330020
<400> 22

```

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 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Leu Tyr Ser Ser Gly Trp Ile Arg Gln Tyr His Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330020

<400> 23

Ser Tyr Gly Ile Ser

1 5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330020

<400> 24

Trp Ile Ser Asp Tyr Gln Gly Tyr Thr Lys Tyr Ala Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330020

<400> 25

Leu Tyr Ser Ser Gly Trp Ile Arg Gln Tyr His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 26
 <211> 315
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330020
 <400> 26
 tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
 acctgctcag gagataattt gaaagataaa tatgtctcat ggtatcagca gaagccaggg 120
 caggcccctg tactggttct ctatcaagat agaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactcagg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actattattg tcaggcgtgg gacagcggca ctgccttcgg cggaggggacc 300
 aaggtcaccg tccta 315

<210> 27
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330020
 <400> 27
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Leu Lys Asp Lys Tyr Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Leu Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Arg Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gly Thr Ala Phe
 85 90 95
 Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330020
 <400> 28
 Ser Gly Asp Asn Leu Lys Asp Lys Tyr Val Ser

```

1             5             10
<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330020
<400> 29
Gln Asp Arg Lys Arg Pro Ser
1             5
<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330020
<400> 30
Gln Ala Trp Asp Ser Gly Thr Ala
1             5
<210> 31
<211> 357
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330071
<400> 31
gaggtgcagc tgggtggagtc tggagctgag gtgaagcagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat      180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac      240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaggggt      300
ttctatcatg atgcttttga tatctggggg cgagggacca cggtcaccgt ctcgagt      357
<210> 32
<211> 119
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330071
<400> 32

```

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330071

<400> 33

Ser Tyr Gly Ile Ser

1 5

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330071

<400> 34

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330071

<400> 35

Arg Gly Phe Tyr His Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 36
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330071
 <400> 36
 gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtca gggcattagc aattatttag cctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagtgc ctaagctcct gatctatgct gcattccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
 cggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctgtgac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321
 <210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330071
 <400> 37
 Ala Ile Gln Leu 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 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 Val
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330071
 <400> 38

```

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1           5           10
<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330071
<400> 39
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1           5
<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330071
<400> 40
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Val Thr
1           5
<210> 41
<211> 366
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330125
<400> 41
gaagtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgactgtc      60
tcctgcaagg cttctggata cagcttcacc gactactata tacactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag gtctctgagt gatgggatgg atcaacccta acagtgggtgt cacagacttt      180
gcgcagaagt ttctgggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac      240
atggagctga gcagactgac atctgacgac acggccttgt attattgtgc gagagttgcc      300
tttgtatact atgatagtag tgccttccaa tactggggca aaggaaccct ggtcaccgtc      360
tcgagt                                           366
<210> 42
<211> 122
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330125
<400> 42

```

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

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

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

Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Val	Thr	Asp	Phe	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				

Leu	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80

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

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

Gly	Lys	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120		

<210> 43
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330125
 <400> 43

Asp	Tyr	Tyr	Ile	His
1			5	

<210> 44
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330125
 <400> 44

Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Val	Thr	Asp	Phe	Ala	Gln	Lys	Phe	Leu
1				5					10					15	

Gly

<210> 45
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330125
 <400> 45

Val Ala Phe Val Tyr Tyr Asp Ser Ser Ala Phe Gln Tyr
 1 5 10
 <210> 46
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330125
 <400> 46
 ctgcctgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtttccc caggacagac agccaccatc 60
 acctgctctg cagataagtt gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcccctg tcctgggtcat ctatcaagat aggaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgatca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcaaca ctggccttta tgtcttcgga 300
 actgggacca agctgaccgt ccta 324
 <210> 47
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330125
 <400> 47
 Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Ala Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Arg Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Ile Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Asn Thr Gly Leu
 85 90 95
 Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 48
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330125
 <400> 48

```

Ser Ala Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
1           5           10
<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330125
<400> 49
Gln Asp Arg Lys Arg Pro Ser
1           5
<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330125
<400> 50
Gln Ala Trp Asp Ser Asn Thr Gly Leu Tyr Val
1           5           10
<210> 51
<211> 378
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330126
<400> 51
gaggtccagc tggtagctg tggggctgaa ctgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaaga cttctgggta cagttttaac acctatggta tcagttgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg gtcagtgggt acgatggtaa cataaattat      180
gcagagaagt tccagggcag agtcgccatg accacagaca catccacgac cacagcctac      240
atggagctgt ggagcctgac atctgacgac acggccgtct attactgtgc gagagtacgt      300
cgaggcagtg gctggtacaa gaactatcac tactacatgg acgtctgggg ccaagggaca      360
atggtcaccg tctcgagt                                     378
<210> 52
<211> 126
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330126
<400> 52

```


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

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

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

Gly Trp Val Ser Gly Asp Asp Gly Asn Ile Asn Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Val Arg Arg Gly Ser Gly Trp Tyr Lys Asn Tyr His Tyr Tyr
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330126

<400> 53

Thr Tyr Gly Ile Ser

1 5

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330126

<400> 54

Trp Val Ser Gly Asp Asp Gly Asn Ile Asn Tyr Ala Glu Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330126

<400> 55

Val	Arg	Arg	Gly	Ser	Gly	Trp	Tyr	Lys	Asn	Tyr	His	Tyr	Tyr	Met	Asp
1				5					10					15	

Val

<210> 56
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330126
 <400> 56
 cagtctgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcgtc 60
 acctgctctg gagatagatt gggggataaa tatgcttcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtccctcg tcttggtcat ctatcaagat aggaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actattattg tcaggcgtgg gacggcagta ctgcgctatt cggcggaggg 300
 accaagctga ccgtccta 318

<210> 57
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330126
 <400> 57
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr	Ala	Ser	Val	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Arg	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Ala
			20					25					30		

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

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

Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Met
65					70					75					80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100	105

<210> 58

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330126
 <400> 58
 Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
 1 5 10
 <210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330126
 <400> 59
 Gln Asp Arg Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330126
 <400> 60
 Gln Ala Trp Asp Gly Ser Thr Ala Leu
 1 5
 <210> 61
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiensIL330425
 <400> 61
 caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gaatatagta tgcaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gactggaata tgtttcaact attagtagta atggggctgg cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggcag agtcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 gttcaaatga gcagtctgag acctgaggac acggctgtct attactgtgt gaaatcccta 300
 actaaatacc cctatggtaa ctactttgac tactggggca gagggaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca 366
 <210> 62
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiensIL330425
 <400> 62

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

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

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

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

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

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

Val Lys Ser Leu Thr Lys Tyr Pro Tyr Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330425

<400> 63

Glu Tyr Ser Met His

1 5

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330425

<400> 64

Thr Ile Ser Ser Asn Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 65

<211> 13

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330425

<400> 65

Ser Leu Thr Lys Tyr Pro Tyr Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 66
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330425
 <400> 66
 tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
 acatgccaaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120
 caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180
 ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactagggc tcaggcggaa 240
 gatgaggctg actattactg taactccggg gacagcagtg gtaaccatgt ggtattcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324
 <210> 67
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330425
 <400> 67
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Arg Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330425
 <400> 68

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
 1 5 10
 <210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330425
 <400> 69
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330425
 <400> 70
 Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val
 1 5 10
 <210> 71
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiensIL330428
 <400> 71
 caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag acgaagaagt ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaaga cttctgggta cacctttgat aactttggta tcagttgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctggagtg gataggatgg atcagcattt acaatggaaa cacagattat 180
 gcacagaatc ttcggggcag actcaccttg accacagaca cgtccacgag tacagtccac 240
 atggaactga agagcctgag atctgacgac acggccattt attactgtgc gagaggaggg 300
 ggtattagca gcagctggac ccctgactac tactttgact actggggcca gggcaccctg 360
 gtcaccgtct cctca 375
 <210> 72
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiensIL330428
 <400> 72

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ile Tyr Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Gln Asn Leu
50 55 60

Arg Gly Arg Leu Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val His
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Gly Ile Ser Ser Ser Trp Thr Pro Asp Tyr Tyr Phe
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330428

<400> 73

Asn Phe Gly Ile Ser

1 5

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330428

<400> 74

Trp Ile Ser Ile Tyr Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Gln Asn Leu Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 75

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330428

<400> 75

Gly Gly Gly Ile Ser Ser Ser Trp Thr Pro Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 76
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330428
 <400> 76
 tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct cgggacagac agtccgtctc 60
 acatgccaag gagacactct cagaaattat tattcaaact ggtaccaaca gaggccagga 120
 caggcccccg ttcttgtcct ctacgggaac aacaggcggc ccccggaat ccagctcga 180
 ttctctggct cccactcagg aaacacaggt tccctgatca tctctggggc tcaggcgga 240
 gatgaggctg agtatcactg tgccgcccg gatagcagtg gcgaccatgt tgtcttcggt 300
 ggtgggacca aggtcaccgt ccta 324

<210> 77
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330428
 <400> 77
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Ser Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Leu Thr Cys Gln Gly Asp Thr Leu Arg Asn Tyr Tyr Ser
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Leu Tyr
 35 40 45
 Gly Asn Asn Arg Arg Pro Pro Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 His Ser Gly Asn Thr Gly Ser Leu Ile Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Glu Tyr His Cys Ala Ala Arg Asp Ser Ser Gly Asp His
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 78
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330428
 <400> 78
 Gln Gly Asp Thr Leu Arg Asn Tyr Tyr Ser Asn
 1 5 10

<210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330428
 <400> 79
 Gly Asn Asn Arg Arg Pro Pro
 1 5
 <210> 80
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330428
 <400> 80
 Ala Ala Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Val Val
 1 5 10
 <210> 81
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiensIL330065
 <400> 81
 gaggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggactgc agtgaagatc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactactaca ttcatctgggt ccaacaggcc 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggactt gttgatcctg aagacgggtga aacaaaatac 180
 gcagagaaat tccagggccg agtctccata accgcggaca cgtcgactga cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgac atctgaggac acggccgtgt atttctgcac aatgggggtgg 300
 gctcagtggg gccgaggaac cctggtcacc gtctcgagt 339
 <210> 82
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiensIL330065
 <400> 82

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

Ser
 <210> 83
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330065
 <400> 83

Asp Tyr Tyr Ile His

1				5

<210> 84
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330065
 <400> 84

Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Glu	Thr	Lys	Tyr	Ala	Glu	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly
 <210> 85
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330065
 <400> 85

Gly Trp Ala Gln

1

<210> 86
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330065
 <400> 86
 cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaattatg tatactggta ccagcaggtc 120
 ccaggaacgg cccccaaact cgtcatctat agggattttc agcggccctc aggggtccct 180
 gaccgatttt ccggctccaa gtctggcaac tcagcctccc tggtcacag tggcctccgg 240
 tccgaggatg aggggaata tgtctgtgca gcatgggatg acagcctgac tggccaaga 300
 ttccggcggag ggaccaaggt caccgtccta 330

<210> 87
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330065
 <400> 87
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Val
 35 40 45
 Ile Tyr Arg Asp Phe Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Gly Glu Tyr Val Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95
 Thr Gly Pro Arg Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 88
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330065
 <400> 88
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr
 1 5 10

<210> 89
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330065
 <400> 89
 Arg Asp Phe Gln Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 90
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330065
 <400> 90
 Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Thr Gly Pro Arg
 1 5 10
 <210> 91
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiensIL330099
 <400> 91
 caggtacagc tgcagcagtc aggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg catctggata caccttcacc agcttctata tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cccggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcagccctc gtggtggtac gacaagttac 180
 gcacagaact tccagggcag agtcacccatg accagggaca cgtccacaag cacagtctac 240
 atggagctga gtggcctgag atctgacgac acggccgtct attactgtgc gacagagtcc 300
 ttttactatg ggtcggggac ttattctggc gattattacc tctactccgg tatggccgac 360
 tggggcaaag gaaccctggt caccgtctcc tca 393
 <210> 92
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiensIL330099
 <400> 92

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

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

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

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

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

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

Ala Thr Glu Ser Phe Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Ser Gly Asp Tyr
 100 105 110

Tyr Leu Tyr Ser Gly Met Ala Asp Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr
 115 120 125

Val Ser Ser
 130

<210> 93

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330099

<400> 93

Ser Phe Tyr Met Asn

1 5

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330099

<400> 94

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

Gly

<210> 95

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330099

<400> 95

Glu Ser Phe Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Ser Gly Asp Tyr Tyr Leu
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Met Ala Asp
20

<210> 96

<211> 324

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> DNA VL Homo sapiensIL330099

<400> 96

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgcggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacgaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgg gacagcagt gtaaccatgt ggtattcggc 300

ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 97

<211> 108

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VL Homo sapiensIL330099

<400> 97

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

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

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

Gly Lys Asn Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 98

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330099
 <400> 98
 Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
 1 5 10
 <210> 99
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330099
 <400> 99
 Gly Lys Asn Asp Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 100
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330099
 <400> 100
 Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val
 1 5 10
 <210> 101
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiensIL330101
 <400> 101
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagagtgggtg 300
 gctggctact ttgactcctg gggccgggga accctggtca ccgtctcgag t 351
 <210> 102
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiensIL330101
 <400> 102

<210> 106
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330101
 <400> 106
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gcgatgcttt gccaaagcaa tatgctcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccctg cactgggtgat atataaagac actgagaggc cctcagggat tcctgagcga 180
 ttctctgggt ccagctcagg gacaacagtc acgctgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gatgaagctg actattactg tcaatcagca gacagtagtg gtgcttcacg ggtgttcggc 300
 ggagggacca aggtcaccgt ccta 324

<210> 107
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330101
 <400> 107
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ala Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ala Ser
 85 90 95
 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 108
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330101
 <400> 108
 Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala His
 1 5 10

<210> 109
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330101
 <400> 109
 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 110
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330101
 <400> 110
 Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ala Ser Arg Val
 1 5 10
 <210> 111
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiensIL330101_fgl
 <400> 111
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccagget 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagagtgggtg 300
 gctggctact ttgactcctg gggccgggga accctgggtca ccgtctcgag t 351
 <210> 112
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiensIL330101_fgl
 <400> 112

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 113

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330101_fgl

<400> 113

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 114

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330101_fgl

<400> 114

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

1 5 10 15

Gly

<210> 115

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330101_fgl

<400> 115

Val Val Ala Gly Tyr Phe Asp Ser
 1 5
 <210> 116
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330101_fgl
 <400> 116
 tcctatgagc tgatgcagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gcgatgcttt gccaaagcaa tatgctcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccctg tgctggtgat atataaagac actgagaggc cctcagggat tcctgagcga 180
 ttctctgggt ccagctcagg gacaacagtc acgctgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gatgaagctg actattactg tcaatcagca gacagtagtg gtgcttcacg ggtgttcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324
 <210> 117
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330101_fgl
 <400> 117
 Ser Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ala Ser
 85 90 95
 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 118
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330101_fgl
 <400> 118

```

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala His
1           5           10
<210> 119
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330101_fgl
<400> 119
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
1           5
<210> 120
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330101_fgl
<400> 120
Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ala Ser Arg Val
1           5           10
<210> 121
<211> 357
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330107
<400> 121
cagatgcagc tgggtgcagtc tgggggagggc gtgggtccagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaccgttc      300
cccagctact ggtacttcga tctctggggc aaaggcacc tggtcaccgt ctcgagt      357
<210> 122
<211> 119
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330107
<400> 122

```

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val 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 Pro Phe Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Lys Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 123

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330107

<400> 123

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 124

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330107

<400> 124

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

Gly

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330107

<400> 125

Pro Phe Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 126
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330107
 <400> 126
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gagatgcatt gccaaagcaa tatgcttatt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccctg tgctggatgat atataaagac agtgagaggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccagctcagg gacaacagtc acgttgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gacgaggctg actattactg tcaatcagca gacagcagtg gtacttatcg ggtgttcggc 300
 ggagggaccc agctcaccgt tttta 324

<210> 127
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330107
 <400> 127
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 128
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330107
 <400> 128
 Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala Tyr

```

1             5             10
<210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330107
<400> 129
Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser
1             5
<210> 130
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330107
<400> 130
Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr Arg Val
1             5             10
<210> 131
<211> 363
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330149
<400> 131
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggt      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgt aagaaccttg      300
gcttacagca cgagctggtt ctttgactac tggggcaggg gaaccctggt caccgtctcg      360
agt                                                    363
<210> 132
<211> 121
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330149
<400> 132

```


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

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

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 133

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330149

<400> 133

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 134

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330149

<400> 134

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

1 5 10 15

Gly

<210> 135

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330149

<400> 135

Thr Leu Ala Tyr Ser Thr Ser Trp Phe Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 136
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330149
 <400> 136
 tcctatgagc tgactcagcc acccgcggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60
 acctgctctg gagatgcatt gccaaaaaaa tatgcttatt ggtaccagca gaagtcaggc 120
 caggcccctg tgctggtcat ctatgaggac gccaaacgac cctccgggat ccctgagaga 180
 ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgactg taagtggggc ccaggtggag 240
 gatgaagctg actactactg ttactcaaca gacagcagtg gtctctgtatt cggcggaggg 300
 accaagctga ccgtccta 318
 <210> 137
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330149
 <400> 137
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ala Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Ala Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Val Ser Gly Ala Gln Val Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Pro Val
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 138
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330149
 <400> 138

```

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala Tyr
1           5           10
<210> 139
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330149
<400> 139
Glu Asp Ala Lys Arg Pro Ser
1           5
<210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330149
<400> 140
Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Pro Val
1           5
<210> 141
<211> 345
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330180
<400> 141
caggtacagc tgcagcagtc aggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcttgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat      180
gcacagaagt ttcagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac      240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagacggaac      300
gcttttgata tctggggcaa gggaaacctg gtcaccgtct cgagt                        345
<210> 142
<211> 115
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330180
<400> 142

```

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 143

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330180

<400> 143

Gly Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 144

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330180

<400> 144

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 145

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330180

<400> 145

Arg Asn Ala Phe Asp Ile
 1 5
 <210> 146
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330180
 <400> 146
 cagcctgtgc tgactcagcc accctcgggtg tctgaagccc ccaggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgttctg gaagcagctc caacatcgga aataatgctg taaactggta ccagcagctc 120
 ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat aggaataatc agcggccctc aggggtccct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg 240
 tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcattgggatg acagcctgag tgggtgggtg 300
 ttccggcggag ggaccaaggt caacgtccta 330
 <210> 147
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330180
 <400> 147
 Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Glu Ala Pro Arg Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30
 Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95
 Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asn Val Leu
 100 105 110
 <210> 148
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330180
 <400> 148

```

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn
1          5          10
<210> 149
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330180
<400> 149
Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1          5
<210> 150
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330180
<400> 150
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val
1          5          10
<210> 151
<211> 351
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330259
<400> 151
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagcg agcaccacct ggcagggtag cacatactac      180
gcgactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagagtgggtg      300
gctggctact ttgactcctg gggccgggga accctggtca ccgtctcgag t      351
<210> 152
<211> 117
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330259
<400> 152

```

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 Ser Thr Pro Trp Gln 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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 153

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330259

<400> 153

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 154

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330259

<400> 154

Ala Ser Thr Pro Trp Gln Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 155

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330259

<400> 155

Val Val Ala Gly Tyr Phe Asp Ser

1 5

<210> 156
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330259
 <400> 156
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gcgatgcttt gccaaagcaa tatgctcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccctg cactggatgat atataaagac actgagaggc cctcagggat tcctgagcga 180
 ttctctgggt ccagctcagg gacaacagtc acgctgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gatgaagctg actattactg tcaatcagca gacagtagtg gtgcttcacg ggtgttcggc 300
 ggagggacca aggtcaccgt ccta 324

<210> 157
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330259
 <400> 157
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ala Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ala Ser
 85 90 95
 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 158
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330259
 <400> 158
 Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala His
 1 5 10

```

<210> 159
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330259
<400> 159
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
1             5
<210> 160
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330259
<400> 160
Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ala Ser Arg Val
1             5             10
<210> 161
<211> 351
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330259_fgl
<400> 161
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagcg agcaccacct ggcagggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagagtgggtg      300
gctggctact ttgactcctg gggccgggga accctggtca ccgtctcgag t                351
<210> 162
<211> 117
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330259_fgl
<400> 162

```

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 Ser Thr Pro Trp Gln 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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 163

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330259_fgl

<400> 163

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 164

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330259_fgl

<400> 164

Ala Ser Thr Pro Trp Gln Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 165

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330259_fgl

<400> 165

Val Val Ala Gly Tyr Phe Asp Ser
 1 5
 <210> 166
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330259_fgl
 <400> 166
 tcctatgagc tgatgcagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gcgatgcttt gccaaagcaa tatgctcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccctg tgctggtgat atataagac actgagaggc cctcagggat tcctgagcga 180
 ttctctgggt ccagctcagg gacaacagtc acgctgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gatgaagctg actattactg tcaatcagca gacagtagtg gtgcttcacg ggtgttcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324
 <210> 167
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330259_fgl
 <400> 167
 Ser Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ala Ser
 85 90 95
 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 168
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330259_fgl
 <400> 168

```

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala His
1           5           10
<210> 169
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330259_fg1
<400> 169
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
1           5
<210> 170
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330259_fg1
<400> 170
Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ala Ser Arg Val
1           5           10
<210> 171
<211> 351
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensH338L293
<400> 171
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtcccc gggaggggtg gcagtactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagagtgggtg      300
gctggctact ttgactcctg gggccgggga accctggtca ccgtctcgag t      351
<210> 172
<211> 117
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensH338L293
<400> 172

```

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 Pro Arg Glu Gly Trp Gln 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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 173

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensH338L293

<400> 173

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 174

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensH338L293

<400> 174

Ala Ile Ser Pro Arg Glu Gly Trp Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 175

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensH338L293

<400> 175

Val Val Ala Gly Tyr Phe Asp Ser
 1 5
 <210> 176
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensH338L293
 <400> 176
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gcgatgcttt gccaaagcaa tatgctcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccctg cactggtgat atataaagac actgagaggc cctcagggat tcctgagcga 180
 ttctctgggt ccagctcagg gacaacagtc acgctgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gatgaagctg actattactg tatgagcagc gaccccagcg gtgcttcacg ggtgttcggc 300
 ggagggacca aggtcaccgt ccta 324
 <210> 177
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensH338L293
 <400> 177
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ala Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ser Ser Asp Pro Ser Gly Ala Ser
 85 90 95
 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105
 <210> 178
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensH338L293

```

<400> 178
Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala His
1           5           10
<210> 179
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensH338L293
<400> 179
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
1           5
<210> 180
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensH338L293
<400> 180
Met Ser Ser Asp Pro Ser Gly Ala Ser Arg Val
1           5           10
<210> 181
<211> 351
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensH338L293_fgl
<400> 181
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt cgcgcaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtcccc gggaggggtg gcagtactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagagtgggt      300
gctggctact ttgactcctg gggccggggc accctggtca ccgtctcgag t                  351
<210> 182
<211> 117
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensH338L293_fgl
<400> 182
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 Pro Arg Glu Gly Trp Gln 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
Val Arg Val Val Ala Gly Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu		
100	105	110
Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 183		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> Sequenza artificiale		
<220>		
<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensH338L293_fgl		
<400> 183		
Ser Tyr Ala Met Ser		
1 5		
<210> 184		
<211> 17		
<212> PRT		
<213> Sequenza artificiale		
<220>		
<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensH338L293_fgl		
<400> 184		
Ala Ile Ser Pro Arg Glu Gly Trp Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
1 5 10 15		
Gly		
<210> 185		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> Sequenza artificiale		
<220>		
<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensH338L293_fgl		
<400> 185		
Val Val Ala Gly Tyr Phe Asp Ser		
1 5		
<210> 186		
<211> 324		
<212> DNA		
<213> Sequenza artificiale		
<220>		
<223> DNA VL Homo sapiensH338L293_fgl		
<400> 186		


```

tcctatgagc tgatgcagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc      60
acctgctctg gcgatgcttt gccaaagcaa tatgctcatt ggtaccagca gaagccaggc      120
caggccccctg tgctggtgat atataaagac actgagaggc cctcagggat tcctgagcga      180
ttctctgggt ccagctcagg gacaacagtc acgctgacca tcagtggagt ccaggcagaa      240
gatgaagctg actattactg tatgtcctcg gacccgagcg gtgcttcacg ggtgttcggc      300
ggagggacca agctgaccgt ccta                                              324

```

<210> 187

<211> 108

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VL Homo sapiensH338L293_fgl

<400> 187

```

Ser Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1           5           10          15

```

```

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
          20          25          30

```

```

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

```

```

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

```

```

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65          70          75          80

```

```

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ser Ser Asp Pro Ser Gly Ala Ser
          85          90          95

```

```

Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

```

100 105

<210> 188

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VL Homo sapiensH338L293_fgl

<400> 188

```

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala His
1           5           10

```

<210> 189

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

```

<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensH338L293_fgl
<400> 189
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
1          5
<210> 190
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensH338L293_fgl
<400> 190
Met Ser Ser Asp Pro Ser Gly Ala Ser Arg Val
1          5          10
<210> 191
<211> 351
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330377
<400> 191
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagcg tccgacatgc tctacggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgttc ccagaacatc      300

ctgggctact ttgactcctg gggccgggga accctggtca ccgtctcgag t                  351
<210> 192
<211> 117
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330377
<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 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 Ser Asp Met Leu Tyr 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

Ser Gln Asn Ile Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 193
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330377
 <400> 193

Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 194
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330377
 <400> 194

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

Gly

<210> 195
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330377
 <400> 195

Asn Ile Leu Gly Tyr Phe Asp Ser
 1 5
 <210> 196
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330377
 <400> 196
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gcgatgcttt gccaaagcaa tatgctcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccctg cactggtgat atataagac actgagaggc cctcagggat tcctgagcga 180
 ttctctgggt ccagctcagg gacaacagtc acgctgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gatgaagctg actattactg tcaatcagca gacagtacgg ggtaccaccg ggtgttcggc 300
 ggagggacca aggtcaccgt cttta 324
 <210> 197
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330377
 <400> 197
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ala Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Thr Gly Tyr His
 85 90 95
 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105
 <210> 198
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330377
 <400> 198

```

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala His
1           5           10
<210> 199
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330377
<400> 199
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
1           5
<210> 200
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330377
<400> 200
Gln Ser Ala Asp Ser Thr Gly Tyr His Arg Val
1           5           10
<210> 201
<211> 351
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330377_fgl
<400> 201
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagcg tccgacatgc tctacggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgttc ccagaacatc      300
ctgggctact ttgactcctg gggccgggga accctggtca ccgtctcgag t      351
<210> 202
<211> 117
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330377_fgl
<400> 202

```


<210> 206
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330377_fgl
 <400> 206
 tcctatgagc tgatgcagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gcgatgcttt gccaaagcaa tatgctcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggccccctg tgctggtgat atataaagac actgagaggc cctcagggat tcctgagcga 180
 ttctctgggt ccagctcagg gacaacagtc acgctgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gatgaagctg actattactg tcaatcagca gacagtacgg ggtaccaccg ggtgttcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324
 <210> 207
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330377_fgl
 <400> 207
 Ser Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Thr Gly Tyr His
 85 90 95
 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 208
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330377_fgl
 <400> 208

```

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala His
1           5           10
<210> 209
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330377_fgl
<400> 209
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
1           5
<210> 210
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330377_fgl
<400> 210
Gln Ser Ala Asp Ser Thr Gly Tyr His Arg Val
1           5           10
<210> 211
<211> 351
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330388
<400> 211
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct agcaccacct ggcaaggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagatggtag      300
tgggggtgga tcgactcctg gggccgggga accctggtca ccgtctcgag t              351
<210> 212
<211> 117
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330388
<400> 212
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 Ser Thr Pro Trp Gln 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

Val Arg Trp Tyr Trp Gly Trp Ile Asp Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 213

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330388

<400> 213

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 214

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330388

<400> 214

Ala Ser Thr Pro Trp Gln Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 215

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330388

<400> 215

Trp Tyr Trp Gly Trp Ile Asp Ser

1 5

<210> 216

<211> 324

<212> DNA

```

<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VL Homo sapiensIL330388
<400> 216
tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc      60
acctgctctg gcgatgcttt gccaaagcaa tatgctcatt ggtaccagca gaagccaggc      120
caggcccctg cactgggtgat atataaagac actgagaggc cctcagggat tcctgagcga      180
ttctctgggt ccagctcagg gacaacagtc acgctgacca tcagtggagt ccaggcagaa      240
gatgaagctg actattactg tatgtcctcg gacccgagcg gtgcttcacg ggtgttcggc      300
ggagggacca aggtcaccgt ccta                                             324
<210> 217
<211> 108
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VL Homo sapiensIL330388
<400> 217
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1          5          10          15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
          20          25          30

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

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

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65          70          75          80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ser Ser Asp Pro Ser Gly Ala Ser
          85          90          95

Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
          100          105
<210> 218
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330388
<400> 218
Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala His
1          5          10
<210> 219
<211> 7
<212> PRT

```

```

<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330388
<400> 219
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
1          5
<210> 220
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330388
<400> 220
Met Ser Ser Asp Pro Ser Gly Ala Ser Arg Val
1          5          10
<210> 221
<211> 351
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330388_fgl
<400> 221
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct agcaccacct ggcaaggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagatggtag      300
tggggggtgga tcgactcctg gggccgggga accctggtca ccgtctctc a      351
<210> 222
<211> 117
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330388_fgl
<400> 222

```

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 Ser Thr Pro Trp Gln 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

Val Arg Trp Tyr Trp Gly Trp Ile Asp Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 223

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330388_fgl

<400> 223

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 224

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330388_fgl

<400> 224

Ala Ser Thr Pro Trp Gln Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 225

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330388_fgl

<400> 225

Trp Tyr Trp Gly Trp Ile Asp Ser
 1 5
 <210> 226
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330388_fgl
 <400> 226
 tcctatgagc tgatgcagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gcgatgcttt gccaaagcaa tatgctcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccctg tgctggtgat atataaagac actgagaggc cctcagggat tcctgagcga 180
 ttctctgggt ccagctcagg gacaacagtc acgctgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gatgaagctg actattactg tatgtcctcg gacccgagcg gtgcttcacg ggtgttcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324
 <210> 227
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330388_fgl
 <400> 227
 Ser Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ser Ser Asp Pro Ser Gly Ala Ser
 85 90 95
 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 228
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330388_fgl
 <400> 228

```

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala His
1           5           10
<210> 229
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330388_fgl
<400> 229
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
1           5
<210> 230
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330388_fgl
<400> 230
Met Ser Ser Asp Pro Ser Gly Ala Ser Arg Val
1           5           10
<210> 231
<211> 351
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330396
<400> 231
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct agcaccacct ggcaaggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagatggtag      300
tggggggtgga tcgactcctg gggccgggga accctggtca ccgtctcgag t      351
<210> 232
<211> 117
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330396
<400> 232

```

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	Ser	Thr	Pro	Trp	Gln	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	

Val	Arg	Trp	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Asp	Ser	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu
		100						105					110		

Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115		

<210> 233

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330396

<400> 233

Ser	Tyr	Ala	Met	Ser

1				5

<210> 234

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330396

<400> 234

Ala	Ser	Thr	Pro	Trp	Gln	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys

1				5					10					15	

Gly

<210> 235

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330396

<400> 235

Trp	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Asp	Ser

1					5		

<210> 236
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330396
 <400> 236
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gcgatgcttt gccaaagcaa tatgctcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccctg cactgggtgat atataaagac actgagaggc cctcagggat tcctgagcga 180
 ttctctgggt ccagctcagg gacaacagtc acgctgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gatgaagctg actattactg tatgagcagc gacgacacgg gtgcttcacg ggtgttcggc 300
 ggagggacca aggtcaccgt ccta 324

<210> 237
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330396
 <400> 237
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ala Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ser Ser Asp Asp Thr Gly Ala Ser
 85 90 95
 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 238
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330396
 <400> 238
 Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala His
 1 5 10

```

<210> 239
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330396
<400> 239
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
1 5
<210> 240
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330396
<400> 240
Met Ser Ser Asp Asp Thr Gly Ala Ser Arg Val
1 5 10
<210> 241
<211> 351
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330396_fgl
<400> 241
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct agcaccacct ggcaaggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagatggtag 300
tggggggtgga tcgactcctg gggccgggga accctggtca ccgtctcgag t 351
<210> 242
<211> 117
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330396_fgl
<400> 242

```

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 Ser Thr Pro Trp Gln 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

Val Arg Trp Tyr Trp Gly Trp Ile Asp Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 243

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330396_fgl

<400> 243

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 244

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330396_fgl

<400> 244

Ala Ser Thr Pro Trp Gln Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 245

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330396_fgl

<400> 245

Trp Tyr Trp Gly Trp Ile Asp Ser

1 5

<210> 246
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330396_fgl
 <400> 246
 tcctatgagc tgatgcagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gcgatgcttt gccaaagcaa tatgctcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccctg tgctgggtgat atataaagac actgagaggc cctcagggat tcctgagcga 180
 ttctctgggt ccagctcagg gacaacagtc acgctgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gatgaagctg actattactg tatgagcagc gacgacacgg gtgcttcacg ggtgttcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 247
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330396_fgl
 <400> 247
 Ser Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ser Ser Asp Asp Thr Gly Ala Ser
 85 90 95
 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 248
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330396_fgl
 <400> 248

```

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala His
1           5           10
<210> 249
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330396_fgl
<400> 249
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
1           5
<210> 250
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330396_fgl
<400> 250
Met Ser Ser Asp Asp Thr Gly Ala Ser Arg Val
1           5           10
<210> 251
<211> 351
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiensIL330398
<400> 251
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct agcaccacct ggcaaggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagatggtag      300
tggggggtgga tcgactcctg gggccgggga accctggtca ccgtctcgag t      351
<210> 252
<211> 117
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiensIL330398
<400> 252

```

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 Ser Thr Pro Trp Gln 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

Val Arg Trp Tyr Trp Gly Trp Ile Asp Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 253

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330398

<400> 253

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 254

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330398

<400> 254

Ala Ser Thr Pro Trp Gln Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 255

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330398

<400> 255

Trp Tyr Trp Gly Trp Ile Asp Ser
 1 5
 <210> 256
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330398
 <400> 256
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gcgatgcttt gccaaagcaa tatgctcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccctg cactggtgat atataagac actgagaggc cctcagggat tcctgagcga 180
 ttctctgggt ccagctcagg gacaacagtc acgctgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gatgaagctg actattactg tttgtccagc gaagcctcgg gtgcttcacg ggtgttcggc 300
 ggagggacca aggtcaccgt ccta 324
 <210> 257
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330398
 <400> 257
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ala Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Ser Asp Ala Ser Gly Ala Ser
 85 90 95
 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105
 <210> 258
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330398
 <400> 258

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala His
 1 5 10

<210> 259

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330398

<400> 259

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 260

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330398

<400> 260

Leu Ser Ser Asp Ala Ser Gly Ala Ser Arg Val

1 5 10

<210> 261

<211> 351

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> DNA VH Homo sapiensIL330398_fgl

<400> 261

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct agcaccacct ggcaaggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagatgggtac 300

tgggggtgga tcgactcctg gggccgggga accctggtca ccgtctcgag t 351

<210> 262

<211> 117

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VH Homo sapiensIL330398_fgl

<400> 262

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 Ser Thr Pro Trp Gln 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

Val Arg Trp Tyr Trp Gly Trp Ile Asp Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 263

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiensIL330398_fgl

<400> 263

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 264

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiensIL330398_fgl

<400> 264

Ala Ser Thr Pro Trp Gln Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 265

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiensIL330398_fgl

<400> 265

Trp Tyr Trp Gly Trp Ile Asp Ser

1 5

<210> 266
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiensIL330398_fgl
 <400> 266
 tcctatgagc tgatgcagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gcgatgcttt gccaaagcaa tatgctcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccctg tgctggatgat atataaagac actgagaggc cctcagggat tcctgagcga 180
 ttctctgggt ccagctcagg gacaacagtc acgctgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gatgaagctg actattactg tttgtccagc gacgcctcgg gtgcttcacg ggtgttcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 267
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiensIL330398_fgl
 <400> 267
 Ser Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Ser Asp Ala Ser Gly Ala Ser
 85 90 95
 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 268
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiensIL330398_fgl
 <400> 268
 Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala His
 1 5 10

```

<210> 269
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiensIL330398_fgl
<400> 269
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
1 5
<210> 270
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiensIL330398_fgl
<400> 270
Leu Ser Ser Asp Ala Ser Gly Ala Ser Arg Val
1 5 10
<210> 271
<211> 378
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiens33v20064
<400> 271
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
tggatacagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
atggtcaccg tctcgagt 378
<210> 272
<211> 126
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiens33v20064
<400> 272

```

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 Arg Asp Leu Trp Ile Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
 100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 273

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33v20064

<400> 273

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 274

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiens33v20064

<400> 274

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

1 5 10 15

Gly

<210> 275

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33v20064

<400> 275

Asp Leu Trp Ile Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 276
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33v20064
 <400> 276
 ctgcctgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagaa ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcaccta tactggcat ctatcaagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggacatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacagcagca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 277
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33v20064
 <400> 277

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Lys Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Asp Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 278
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33v20064
 <400> 278
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 279
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33v20064
 <400> 279
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 280
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33v20064
 <400> 280
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Gly Val
 1 5
 <210> 281
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640001
 <400> 281
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 tggatacagc tatggggggg gggcttgcgt tacccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcgagt 378
 <210> 282
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640001
 <400> 282

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 Arg Asp Leu Trp Ile Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 283

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33_640001

<400> 283

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 284

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiens33_640001

<400> 284

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

Gly

<210> 285

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33_640001

<400> 285

Asp Leu Trp Ile Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 286
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640001
 <400> 286
 tcctacgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcaagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacagcagca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 287
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640001
 <400> 287

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 288
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640001
 <400> 288
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 289
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640001
 <400> 289
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 290
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640001
 <400> 290
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Gly Val
 1 5
 <210> 291
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640027
 <400> 291
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagac ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attggtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 tggatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcgagt 378
 <210> 292
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640027
 <400> 292

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Asp	Leu	Trp	Met	Gln	Leu	Trp	Gly	Gly	Gly	Leu	Arg	Tyr	Pro
			100					105					110		
Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125			

<210> 293
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33_640027
 <400> 293
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 294
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VH Homo sapiens33_640027
 <400> 294
 Ala Ile Gly Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly
 <210> 295
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33_640027
 <400> 295

Asp Leu Trp Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 296
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640027
 <400> 296
 ctgcctgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagaa ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat aggggataaa tatgccgcct ggtatcagca gaagccgggc 120
 cagtcaccta tactggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggacatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacagcagca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 297
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640027
 <400> 297

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

Lys Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Ile Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Asp Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 298
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>

```

<223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640027
<400> 298
Ser Gly Glu Arg Ile Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
1             5             10
<210> 299
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640027
<400> 299
Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
1             5
<210> 300
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640027
<400> 300
Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Gly Val
1             5
<210> 301
<211> 378
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiens33_640050
<400> 301
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc tgcctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtcc gaggcacaag 300
ttcatgcagc tatggggggg gggcttgctg tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
atggtcaccg tctcgagt 378
<210> 302
<211> 126
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiens33_640050
<400> 302

```

<400> 305

His Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 306
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640050
 <400> 306
 tcctacgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcaagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacagcagca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 307
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640050
 <400> 307

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 308
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640050
 <400> 308
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 309
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640050
 <400> 309
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 310
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640050
 <400> 310
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Gly Val
 1 5
 <210> 311
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640047
 <400> 311
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtac gaggctcaag 300
 ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcgagt 378
 <210> 312
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640047
 <400> 312

Leu Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 316
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640047
 <400> 316
 tcctacgtgc tgactcagcc accctcagtgc tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcaagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacagcagca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 317
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640047
 <400> 317

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 318
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>


```

<223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640047
<400> 318
Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
1          5          10
<210> 319
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640047
<400> 319
Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
1          5
<210> 320
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640047
<400> 320
Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Gly Val
1          5
<210> 321
<211> 384
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiens33_640166
<400> 321
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc tgcgtgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attaatggtg atggtgatgg tgggcgcca      180
tactacgcag actccgtgaa ggcccggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg      240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcgaga      300
gatctgtgga tacagctatg gggggggggc ttgcgttatc ccttcggcta ctggggccaa      360
gggacaatgg tcaccgtctc gagt      384
<210> 322
<211> 128
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiens33_640166
<400> 322

```

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 Asn Gly Asp Gly Asp Gly Gly Arg Pro Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Trp Ile Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg
 100 105 110

Tyr Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 323

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33_640166

<400> 323

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 324

<211> 19

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiens33_640166

<400> 324

Ala Ile Asn Gly Asp Gly Asp Gly Gly Arg Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 325

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33_640166

<400> 325

Asp Leu Trp Ile Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 326
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640166
 <400> 326
 tcctacgtgc tgactcagcc accctcagtgc tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcaagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacagcagca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 327
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640166
 <400> 327

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 328
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640166
 <400> 328
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 329
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640166
 <400> 329
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 330
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640166
 <400> 330
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Gly Val
 1 5
 <210> 331
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640169
 <400> 331
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta tcgacacaag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 tggatacagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcgagt 378
 <210> 332
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640169
 <400> 332
 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 Gly Ile Ser Gly Ile Asp Thr 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 Leu Trp Ile Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 333

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33_640169

<400> 333

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 334

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiens33_640169

<400> 334

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

Gly

<210> 335

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33_640169

<400> 335

Asp Leu Trp Ile Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
1 5 10 15

Tyr

<210> 336
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640169
 <400> 336
 tcctacgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcaagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacagcagca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 337
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640169
 <400> 337
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Gly Val
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 338
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640169
 <400> 338
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10

<210> 339
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640169
 <400> 339
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 340
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640169
 <400> 340
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Gly Val
 1 5
 <210> 341
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640170
 <400> 341
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggc atttctgcaa tagaccaaag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 tggatacagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcgagt 378
 <210> 342
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640170
 <400> 342

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 Gly Ile Ser Ala Ile Asp Gln 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 Leu Trp Ile Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 343

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33_640170

<400> 343

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 344

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiens33_640170

<400> 344

Gly Ile Ser Ala Ile Asp Gln Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 345

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33_640170

<400> 345

Asp Leu Trp Ile Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 346
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640170
 <400> 346
 tcctacgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcaagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacagcagca ctgggggtatt cggcggaggg 300

accaaggtca ccgtccta 318

<210> 347
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640170
 <400> 347

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 348
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640170
 <400> 348
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 349
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640170
 <400> 349
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 350
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640170
 <400> 350
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Gly Val
 1 5
 <210> 351
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640036
 <400> 351
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 tggatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcgagt 378
 <210> 352
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640036
 <400> 352

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 Arg Asp Leu Trp Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
 100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 353

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33_640036

<400> 353

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 354

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiens33_640036

<400> 354

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

Gly

<210> 355

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33_640036

<400> 355

Asp Leu Trp Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 356
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640036
 <400> 356
 tcctacgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacagcagca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 357
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640036
 <400> 357

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 358
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640036
 <400> 358
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 359
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640036
 <400> 359
 Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 360
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640036
 <400> 360
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Gly Val
 1 5
 <210> 361
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640117
 <400> 361
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc tgcagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtac gaggctcaag 300
 ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcgagt 378
 <210> 362
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640117
 <400> 362

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	
Thr	Arg	Leu	Lys	Phe	Met	Gln	Leu	Trp	Gly	Gly	Gly	Leu	Arg	Tyr	Pro
			100					105					110		
Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125			

<210> 363
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33_640117
 <400> 363
 Ser Tyr Ala Met Ser

1															5
<210>	364														
<211>	17														
<212>	PRT														
<213>	Sequenza artificiale														
<220>															
<223>	PRT CDR2 VH Homo sapiens33_640117														
<400>	364														
Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly
 <210> 365
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33_640117
 <400> 365

Leu Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 366
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640117
 <400> 366
 tcctacgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgtgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacagcagca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 367
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640117
 <400> 367

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 368
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640117
 <400> 368
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 369
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640117
 <400> 369
 Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 370
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640117
 <400> 370
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Gly Val
 1 5
 <210> 371
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640076
 <400> 371
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc tgcagctgggt ccgccgggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 tggatggaga actgggtggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcgagt 378
 <210> 372
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640076
 <400> 372

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

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

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

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

Ala	Arg	Asp	Leu	Trp	Met	Glu	Asn	Trp	Val	Gly	Gly	Leu	Arg	Tyr	Pro
			100					105					110		

Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125			

<210> 373

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33_640076

<400> 373

Ser	Tyr	Ala	Met	Ser											
1				5											

<210> 374

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiens33_640076

<400> 374

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

Gly															

<210> 375

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33_640076

<400> 375

Asp	Leu	Trp	Met	Glu	Asn	Trp	Val	Gly	Gly	Leu	Arg	Tyr	Pro	Phe	Gly
1				5					10					15	

Tyr

<210> 376
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640076
 <400> 376
 tcctacgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtcac caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcaagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccata 240
 gatgaggccg actattactg tgaggtaag aagtcgaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 377
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640076
 <400> 377
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Ile
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Val Lys Lys Ser Asp Thr Gly Val
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 378
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640076

```

<400> 378
Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
1             5             10
<210> 379
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640076
<400> 379
Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
1             5
<210> 380
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640076
<400> 380
Glu Val Lys Lys Ser Asp Thr Gly Val
1             5
<210> 381
<211> 378
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiens33_640081
<400> 381
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc tcggtacagc ctgggggggc cctgagactc      60
tctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc tgaactgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacacactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgg ccggggccaag      300
ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatccctcg gctactgggg ccaagggaca      360
atggtcaccg tctcgagt                                     378
<210> 382
<211> 126
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiens33_640081
<400> 382

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Ser 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 Asn 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 His 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

Gly Arg Ala Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
100 105 110

Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 383

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33_640081

<400> 383

Ser Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 384

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiens33_640081

<400> 384

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 385

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33_640081

<400> 385

Ala Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Leu Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 386
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640081
 <400> 386
 tcctacgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcaagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccacg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gcggccgacg aactgggggt attcggcgga 300
 gggaccaagg tcaccgtcct a 321

<210> 387
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640081
 <400> 387

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Ala Ala Asp Asp Thr Gly
 85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 388
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640081
 <400> 388
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 389
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640081
 <400> 389
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 390
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640081
 <400> 390
 Gln Val Trp Ala Ala Asp Asp Thr Gly Val
 1 5 10
 <210> 391
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640082
 <400> 391
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtg gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccggcagaag 300
 ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcgagt 378
 <210> 392
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640082
 <400> 392

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 Arg Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 393

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33_640082

<400> 393

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 394

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiens33_640082

<400> 394

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

1 5 10 15

Gly

<210> 395

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33_640082

<400> 395

Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 396
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640082
 <400> 396
 tcctacgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc cagggcagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgtgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcaagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatt 240
 gatgaggctg actattactg tggcgtgttg aagcaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 397
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640082
 <400> 397

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Ile
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 398
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640082
 <400> 398
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 399
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640082
 <400> 399
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 400
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640082
 <400> 400
 Gly Val Leu Lys Gln Asp Thr Gly Val
 1 5
 <210> 401
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640084
 <400> 401
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgctg cctctggatt cgccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccggcagaag 300
 ttcatgcagc tatggggggg gggcttgctg tatccctttg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcgagt 378
 <210> 402
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640084
 <400> 402

Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 406
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640084
 <400> 406
 tcttacgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcaagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccgtg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg cgggacgaca gcccctctt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 407
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640084
 <400> 407

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Val
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 408
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>

```

<223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640084
<400> 408
Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
1          5          10
<210> 409
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640084
<400> 409
Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
1          5
<210> 410
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640084
<400> 410
Gln Val Trp Arg Asp Asp Ser Pro Ile
1          5
<210> 411
<211> 378
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiens33_640086
<400> 411
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggtgggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc tgcgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc accagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccgcgacaag 300
ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
atggtcaccg tctcgagt 378
<210> 412
<211> 126
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiens33_640086
<400> 412

```

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 Thr 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 Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 413

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33_640086

<400> 413

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 414

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiens33_640086

<400> 414

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

Gly

<210> 415

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33_640086

<400> 415

Asp Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 416
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640086
 <400> 416
 tcctacgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctggtcat ctatcaagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaagccatg 240
 gatgaggctg actattactg tgaggtcaag gtgaaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 417
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640086
 <400> 417

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Val Lys Val Lys Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 418
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640086
 <400> 418
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 419
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640086
 <400> 419
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 420
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640086
 <400> 420
 Glu Val Lys Val Lys Asp Thr Gly Val
 1 5
 <210> 421
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640087
 <400> 421
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtgatag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccggcagaag 300
 ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaggggaca 360
 atggtcaccg tttcgagt 378
 <210> 422
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640087
 <400> 422

<400> 425

Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
1 5 10 15

Tyr

<210> 426

<211> 318

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> DNA VL Homo sapiens33_640087

<400> 426

tcctacgtgc	tgactcagcc	accctcagt	g	tccgtgtccc	caggacaggc	ggccagcatc	60
acctgctctg	gagaaggaat	gggggataaa	t	tatgctgcct	ggtatcagca	gaagccaggc	120
cagtcacctg	tgctgggtcat	ctatcaagat	a	caaagcggc	cctcagggat	ccctgagcga	180
ttctctggct	ccaactctgg	gaacacagcc	a	cgttgacca	tcagcgggac	ccaggctatg	240
gatgaggctg	actattactg	tggggtgatc	c	aggacaaca	ctggggtatt	cggcggaggg	300
accaaggtca	ccgtccta						318

<210> 427

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VL Homo sapiens33_640087

<400> 427

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

Ala Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Gly Met Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 428

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640087
 <400> 428
 Ser Gly Glu Gly Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 429
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640087
 <400> 429
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 430
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640087
 <400> 430
 Gly Val Ile Gln Asp Asn Thr Gly Val
 1 5
 <210> 431
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640076-1
 <400> 431
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc tgcagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 tggatggaga actgggtggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctctca 378
 <210> 432
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640076-1
 <400> 432

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	Arg	Asp	Leu	Trp	Met	Glu	Asn	Trp	Val	Gly	Gly	Leu	Arg	Tyr	Pro
			100					105					110		

Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser

115		120		125

<210> 433

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 Homo sapiens33_640076-1

<400> 433

Ser Tyr Ala Met Ser

1				5

<210> 434

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 Homo sapiens33_640076-1

<400> 434

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

Gly

<210> 435

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 Homo sapiens33_640076-1

<400> 435

Asp Leu Trp Met Glu Asn Trp Val Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 436
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640076-1
 <400> 436

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtcac caggacagac ggccagcatc	60
acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc	120
cagtcacctg tgctggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga	180
ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg	240
gatgaggccg actattactg tgaggtcaag aagtcgcaca ctgggggtatt cggcggaggg	300
accaaggtca ccgtccta	318

<210> 437
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640076-1
 <400> 437

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Val Lys Lys Ser Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 438
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VLHomo sapiens33_640076-1
 <400> 438
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 439
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VLHomo sapiens33_640076-1
 <400> 439
 Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 440
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VLHomo sapiens33_640076-1
 <400> 440
 Glu Val Lys Lys Ser Asp Thr Gly Val
 1 5
 <210> 441
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640081-A
 <400> 441
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacacactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgg ccggggccaag 300
 ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatccctcgc gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctctca 378
 <210> 442
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640081-A
 <400> 442

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 Asn 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 His 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

Gly Arg Ala Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
100 105 110

Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 443

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33_640081-A

<400> 443

Ser Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 444

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiens33_640081-A

<400> 444

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 445

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33_640081-A

<400> 445

Ala Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Leu Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 446
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640081-A
 <400> 446
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtgc tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gcggccgacg aactgggggt attcggcgga 300
 gggaccaagg tcaccgtcct a 321

<210> 447

<211> 107

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VL Homo sapiens33_640081-A

<400> 447

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Ala Ala Asp Asp Thr Gly
 85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 448

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

```

<223> PRT CDR1 VLHomo sapiens33_640081-A
<400> 448
Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
1             5             10
<210> 449
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VLHomo sapiens33_640081-A
<400> 449
Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
1             5
<210> 450
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VLHomo sapiens33_640081-A
<400> 450
Gln Val Trp Ala Ala Asp Asp Thr Gly Val
1             5             10
<210> 451
<211> 378
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiens33_640082-2
<400> 451
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccggcagaag      300
ttcatgcagc tatggggggg gggttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca      360
atggtcaccg tctcgagt                                     378
<210> 452
<211> 126
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiens33_640082-2
<400> 452

```


Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 456
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640082-2
 <400> 456
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc cagggcagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tggcgtgttg aagcaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 457
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640082-2
 <400> 457

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 458
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VLHomo sapiens33_640082-2
 <400> 458
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 459
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VLHomo sapiens33_640082-2
 <400> 459
 Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 460
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VLHomo sapiens33_640082-2
 <400> 460
 Gly Val Leu Lys Gln Asp Thr Gly Val
 1 5
 <210> 461
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640084-2
 <400> 461
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgctg cctctggatt cgccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccggcagaag 300
 ttcatgcagc tatggggggg gggcttgctg tatccctttg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcgagt 378
 <210> 462
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640084-2
 <400> 462
 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 Ala Phe Ser Ser Tyr

	20		25		30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45		
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	50	55	60		
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	65	70	75	80	
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95		
Ala Arg Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro	100	105	110		
Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	115	120	125		

<210> 463
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 Homo sapiens33_640084-2
 <400> 463
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 464
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 Homo sapiens33_640084-2
 <400> 464
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly
 <210> 465
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 Homo sapiens33_640084-2
 <400> 465
 Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr
 <210> 466

<211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640084-2
 <400> 466
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctgggt ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg cgggacgaca gcccctctt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318
 <210> 467
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640084-2
 <400> 467
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Arg Asp Asp Ser Pro Ile
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105
 <210> 468
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VLHomo sapiens33_640084-2
 <400> 468
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10

```

<210> 469
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VLHomo sapiens33_640084-2
<400> 469
Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
1             5
<210> 470
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VLHomo sapiens33_640084-2
<400> 470
Gln Val Trp Arg Asp Asp Ser Pro Ile
1             5
<210> 471
<211> 378
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiens33_640086-2
<400> 471
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggtgggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc agcagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccgcgacaag      300
ttcatgcagc tatggggggg gggcttgctg tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca      360
atggtcaccg tctcctca
<210> 472
<211> 126
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiens33_640086-2
<400> 472

```

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 Arg Asp Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 473

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 Homo sapiens33_640086-2

<400> 473

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 474

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 Homo sapiens33_640086-2

<400> 474

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

Gly

<210> 475

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 Homo sapiens33_640086-2

<400> 475

Asp Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 476
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640086-2
 <400> 476
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaagccatg 240
 gatgaggctg actattactg tgagggtcaag gtgaaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 477
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640086-2
 <400> 477

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Val Lys Val Lys Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 478
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VLHomo sapiens33_640086-2
 <400> 478
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 479
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VLHomo sapiens33_640086-2
 <400> 479
 Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 480
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VLHomo sapiens33_640086-2
 <400> 480
 Glu Val Lys Val Lys Asp Thr Gly Val
 1 5
 <210> 481
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640087-2
 <400> 481
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtggtgatag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccggcagaag 300
 ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaggggaca 360
 atggtcaccg tttcgagt 378
 <210> 482
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640087-2
 <400> 482

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 Asp 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 Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 483

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 Homo sapiens33_640087-2

<400> 483

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 484

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 Homo sapiens33_640087-2

<400> 484

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

1 5 10 15

Gly

<210> 485

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 Homo sapiens33_640087-2

<400> 485

Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 486
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640087-2
 <400> 486
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaggaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actattactg tggggtgatc caggacaaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 487
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640087-2
 <400> 487
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Gly Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 488
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>

```

<223> PRT CDR1 VLHomo sapiens33_640087-2
<400> 488
Ser Gly Glu Gly Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
1           5           10
<210> 489
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VLHomo sapiens33_640087-2
<400> 489
Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
1           5
<210> 490
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VLHomo sapiens33_640087-2
<400> 490
Gly Val Ile Gln Asp Asn Thr Gly Val
1           5
<210> 491
<211> 378
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiens33_640076-4
<400> 491
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc ttagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagggc atttctgcaa tagaccaaag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg      300
tggtatggaga actgggtggg gggcttgctg tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca      360
atggtcaccg tctctca                                     378
<210> 492
<211> 126
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiens33_640076-4
<400> 492

```


Asp Leu Trp Met Glu Asn Trp Val Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 496
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640076-4
 <400> 496
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtcac caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggccg actattactg tgaggtcaag aagtcgaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 497
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640076-4
 <400> 497
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Val Lys Lys Ser Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 498
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VLHomo sapiens33_640076-4
 <400> 498
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 499
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VLHomo sapiens33_640076-4
 <400> 499
 Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 500
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VLHomo sapiens33_640076-4
 <400> 500
 Glu Val Lys Lys Ser Asp Thr Gly Val
 1 5
 <210> 501
 <211> 384
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640082-4
 <400> 501
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccg tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attaatgggtg atggtgatgg tgggcgcca 180
 tactacgcag actccgtgaa gggccgggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcccgg 300
 cagaagttca tgcagctatg gggggggggc ttgcgttata ccttcggcta ctggggccaa 360
 gggacaatgg tcaccgtctc ctca 384
 <210> 502
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640082-4
 <400> 502

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 Asn Gly Asp Gly Asp Gly Gly Arg Pro Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg
100 105 110

Tyr Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 503

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 Homo sapiens33_640082-4

<400> 503

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 504

<211> 19

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 Homo sapiens33_640082-4

<400> 504

Ala Ile Asn Gly Asp Gly Asp Gly Gly Arg Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 505

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 Homo sapiens33_640082-4

<400> 505

Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
1 5 10 15

Tyr
 <210> 506
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640082-4
 <400> 506
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc cagggcagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tggcgtgttg aagcaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318
 <210> 507
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640082-4
 <400> 507
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Leu Lys Gln Asp Thr Gly Val
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105
 <210> 508
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VLHomo sapiens33_640082-4

```

<400> 508
Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
1             5             10
<210> 509
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VLHomo sapiens33_640082-4
<400> 509
Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
1             5
<210> 510
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VLHomo sapiens33_640082-4
<400> 510
Gly Val Leu Lys Gln Asp Thr Gly Val
1             5
<210> 511
<211> 378
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiens33_640082-6
<400> 511
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc ttagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta tcgacacaag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccggcagaag      300
ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca      360

atggtcaccg tctcctca                                     378
<210> 512
<211> 126
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiens33_640082-6
<400> 512

```


Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 516
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640082-6
 <400> 516
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc cagggcagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tggcgtgttg aagcaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 517
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640082-6
 <400> 517
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 518
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VLHomo sapiens33_640082-6
 <400> 518
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 519
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VLHomo sapiens33_640082-6
 <400> 519
 Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 520
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VLHomo sapiens33_640082-6
 <400> 520
 Gly Val Leu Lys Gln Asp Thr Gly Val
 1 5
 <210> 521
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640082-7
 <400> 521
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggc atttctgcaa tagaccaaag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccggcagaag 300
 ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctctca 378
 <210> 522
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640082-7
 <400> 522

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 Gly Ile Ser Ala Ile Asp Gln 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 Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
 100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 523

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 Homo sapiens33_640082-7

<400> 523

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 524

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 Homo sapiens33_640082-7

<400> 524

Gly Ile Ser Ala Ile Asp Gln Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 525

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 Homo sapiens33_640082-7

<400> 525

Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 526
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640082-7
 <400> 526
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc cagggcagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tggcgtgttg aagcaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 527
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640082-7
 <400> 527

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 528
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VLHomo sapiens33_640082-7
 <400> 528
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 529
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VLHomo sapiens33_640082-7
 <400> 529
 Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 530
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VLHomo sapiens33_640082-7
 <400> 530
 Gly Val Leu Lys Gln Asp Thr Gly Val
 1 5
 <210> 531
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640086-6
 <400> 531
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggtgggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc tgcagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta tcgacacaag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc agcagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccgcgacaag 300
 ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctctca 378
 <210> 532
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640086-6
 <400> 532

Asp Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 536
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640086-6
 <400> 536
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaagccatg 240
 gatgaggctg actattactg tgaggtcaag gtgaaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 537
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640086-6
 <400> 537

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Val Lys Val Lys Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 538
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>

```

<223> PRT CDR1 VLHomo sapiens33_640086-6
<400> 538
Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
1             5             10
<210> 539
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VLHomo sapiens33_640086-6
<400> 539
Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
1             5
<210> 540
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VLHomo sapiens33_640086-6
<400> 540
Glu Val Lys Val Lys Asp Thr Gly Val
1             5
<210> 541
<211> 378
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiens33_640087-7
<400> 541
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc ttagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggc atttctgcaa tagaccaaag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccggcagaag 300
ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaggggaca 360
atggtcaccg tctctca 378
<210> 542
<211> 126
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiens33_640087-7
<400> 542

```

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	Gly	Ile	Ser	Ala	Ile	Asp	Gln	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	Gln	Lys	Phe	Met	Gln	Leu	Trp	Gly	Gly	Gly	Leu	Arg	Tyr	Pro
			100					105						110	

Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120					125	

<210> 543

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 Homo sapiens33_640087-7

<400> 543

Ser	Tyr	Ala	Met	Ser
1				5

<210> 544

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 Homo sapiens33_640087-7

<400> 544

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

Gly

<210> 545

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 Homo sapiens33_640087-7

<400> 545

Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 546
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640087-7
 <400> 546
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaggaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actattactg tgggggtgac caggacaaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 547
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640087-7
 <400> 547

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Gly Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 548
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VLHomo sapiens33_640087-7
 <400> 548
 Ser Gly Glu Gly Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 549
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VLHomo sapiens33_640087-7
 <400> 549
 Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 550
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VLHomo sapiens33_640087-7
 <400> 550
 Gly Val Ile Gln Asp Asn Thr Gly Val
 1 5
 <210> 551
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640201
 <400> 551
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tctctgtcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc tgcagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagt ggtctcatca attgacgcc ttagttcaag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgttc ccgccagaag 300
 ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcgagt 378
 <210> 552
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640201
 <400> 552

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	Ser	Ile	Asp	Ala	Ile	Ser	Ser	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	
Ser	Arg	Gln	Lys	Phe	Met	Gln	Leu	Trp	Gly	Gly	Gly	Leu	Arg	Tyr	Pro	100	105	110	
Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	115	120	125			

<210> 553
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33_640201
 <400> 553
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 554
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VH Homo sapiens33_640201
 <400> 554
 Ser Ile Asp Ala Ile Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly
 <210> 555
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33_640201
 <400> 555

Gln	Lys	Phe	Met	Gln	Leu	Trp	Gly	Gly	Gly	Leu	Arg	Tyr	Pro	Phe	Gly
1				5					10					15	

Tyr

<210> 556
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640201
 <400> 556

tcctacgtgc	tgactcagcc	accctcagt	g	tccgtgtccc	caggacagac	ggccagcatc	60
acctgctctg	gagaaagaat	gggggataaa	t	tatgctgcct	ggtatcagca	gaagccaggc	120
cagtcacctg	tgctgggtcat	ctatcaagat	a	caaaagcggc	cctcagggat	ccctgagcga	180
ttctctggct	ccaactctgg	gaacacagcc	a	cggttgacca	tcagcgggac	ccaggccgtg	240
gatgaggctg	actattactg	tggcgtgttg	a	agcaggaca	ctgggggtatt	cggcggaggg	300
accaaggtca	ccgtccta						318

<210> 557
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640201
 <400> 557

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

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Glu	Arg	Met	Gly	Asp	Lys	Tyr	Ala
		20					25						30		

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

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

Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Val
65					70					75				80	

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

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu
			100				105		

<210> 558
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>


```

<223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640201
<400> 558
Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
1             5             10
<210> 559
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640201
<400> 559
Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
1             5
<210> 560
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640201
<400> 560
Gly Val Leu Lys Gln Asp Thr Gly Val
1             5
<210> 561
<211> 378
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> DNA VH Homo sapiens33_640237
<400> 561
gaggtgcagc tgttggaatc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagggc attgcagacg atttcaccag cacatactac 180
gcagaccccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
tg gatgatga actacgcggg cggtctgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
acggtcaccg tctcgagt 378
<210> 562
<211> 126
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> PRT VH Homo sapiens33_640237
<400> 562

```

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 Gly Ile Ala Asp Asp Phe Thr Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Pro 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 Leu Trp Met Met Asn Tyr Ala Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
 100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 563

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR1 VH Homo sapiens33_640237

<400> 563

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 564

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR2 VH Homo sapiens33_640237

<400> 564

Gly Ile Ala Asp Asp Phe Thr Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Pro Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 565

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT CDR3 VH Homo sapiens33_640237

<400> 565

Asp Leu Trp Met Met Asn Tyr Ala Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 566
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640237
 <400> 566
 tcctacgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatt 240
 gatgaggctg actattactg tggcgtgttg aagcaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 567
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640237
 <400> 567

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Ile
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 568
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VL Homo sapiens33_640237
 <400> 568
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 569
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VL Homo sapiens33_640237
 <400> 569
 Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 570
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VL Homo sapiens33_640237
 <400> 570
 Gly Val Leu Lys Gln Asp Thr Gly Val
 1 5
 <210> 571
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640201-2
 <400> 571
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcatca attgacgccca ttagttcaag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgttc ccgccagaag 300
 ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcgagt 378
 <210> 572
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640201-2
 <400> 572
 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 Ser Ile Asp Ala Ile Ser Ser 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

Ser Arg Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
 100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 573
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 Homo sapiens33_640201-2
 <400> 573

Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 574
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 Homo sapiens33_640201-2
 <400> 574

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

Gly
 <210> 575
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 Homo sapiens33_640201-2
 <400> 575

Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 576
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640201-2
 <400> 576
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtgc tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tggcgtgttg aagcaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 577
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>

<223> PRT VL Homo sapiens33_640201-2

<400> 577
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 578
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR1 VLHomo sapiens33_640201-2
 <400> 578
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 579
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VLHomo sapiens33_640201-2
 <400> 579
 Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 580
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VLHomo sapiens33_640201-2
 <400> 580
 Gly Val Leu Lys Gln Asp Thr Gly Val
 1 5
 <210> 581
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640237-2
 <400> 581
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagt ggtctcaggc attgcagacg attcaccag cacatactac 180
 gcagaccccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 tggatgatga actacgcggg cggcttgctg tacccttcg gctactgggg ccaagggacc 360
 atggtcaccg tctctca 378
 <210> 582
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640237-2
 <400> 582

Asp Leu Trp Met Met Asn Tyr Ala Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Tyr

<210> 586
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VL Homo sapiens33_640237-2
 <400> 586
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60
 acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcacctg tgctggtcac ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240
 gatgaggctg actattactg tggcgtgttg aagcaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 587
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VL Homo sapiens33_640237-2
 <400> 587
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 588
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale

<220>
 <223> PRT CDR1 VLHomo sapiens33_640237-2
 <400> 588
 Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10
 <210> 589
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR2 VLHomo sapiens33_640237-2
 <400> 589
 Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 590
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT CDR3 VLHomo sapiens33_640237-2
 <400> 590
 Gly Val Leu Lys Gln Asp Thr Gly Val
 1 5
 <210> 591
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> DNA VH Homo sapiens33_640076-4B
 <400> 591
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggc atttctgcaa tagaccaag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 tggatggaga actgggtggg gggcttgctg tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctctca 378
 <210> 592
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> PRT VH Homo sapiens33_640076-4B
 <400> 592
 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 Gly Ile Ser Ala Ile Asp Gln 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 Leu Trp Met Glu Asn Trp Val Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 593

<211> 318

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> DNA VL Homo sapiens33_640076-4B

<400> 593

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtcac caggacagac ggccagcatc 60

acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120

cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240

gatgaggccg actattactg tgaggtcaag aagtccgaca ctgggggtatt cggcggaggg 300

accaagctca ccgtccta 318

<210> 594

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VL Homo sapiens33_640076-4B

<400> 594

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala

	20		25		30	
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr						
	35		40		45	
Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser						
	50		55		60	
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met						
	65		70		75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Val Lys Lys Ser Asp Thr Gly Val						
		85		90		95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu						
		100		105		
<210> 595						
<211> 378						
<212> DNA						
<213> Sequenza artificiale						
<220>						
<223> DNA VH Homo sapiens33_640081-AB						
<400> 595						
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc						60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgaactgggt ccgccaggct						120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacacactac						180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat						240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgg ccggggccaag						300
ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatccctcgc gctactgggg ccaagggaca						360
atggtcaccg tctctca						378
<210> 596						
<211> 126						
<212> PRT						
<213> Sequenza artificiale						
<220>						
<223> PRT VH Homo sapiens33_640081-AB						
<400> 596						
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 Asn 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 His 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

Gly Arg Ala Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
100 105 110

Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 597

<211> 321

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> DNA VL Homo sapiens33_640081-AB

<400> 597

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60

acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120

cagtcacctg tgctggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240

gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gcggccgacg aactgggggt attcggcgga 300

gggaccaagc tcaccgtcct a 321

<210> 598

<211> 107

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VL Homo sapiens33_640081-AB

<400> 598

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ile Asp Thr 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 Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 601

<211> 318

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> DNA VL Homo sapiens33_640082-6B

<400> 601

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc cagggcagac ggccagcatc 60

acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120

cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240

gatgaggctg actattactg tggcgtgttg aagcaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300

accaagctca ccgtccta 318

<210> 602

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VL Homo sapiens33_640082-6B

<400> 602

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala

	20		25		30	
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr						
	35		40		45	
Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser						
	50		55		60	
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met						
	65		70		75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Leu Lys Gln Asp Thr Gly Val						
		85		90		95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu						
		100		105		
<210> 603						
<211> 378						
<212> DNA						
<213> Sequenza artificiale						
<220>						
<223> DNA VH Homo sapiens33_640082-7B						
<400> 603						
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc						60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct						120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggc atttctgcaa tagaccaaag cacatactac						180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat						240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccggcagaag						300
ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatcccttcg gctactgggg ccaagggaca						360
atggtcaccg tctctca						378
<210> 604						
<211> 126						
<212> PRT						
<213> Sequenza artificiale						
<220>						
<223> PRT VH Homo sapiens33_640082-7B						
<400> 604						
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 Gly Ile Ser Ala Ile Asp Gln 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 Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
 100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 605

<211> 318

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> DNA VL Homo sapiens33_640082-7B

<400> 605

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc cagggcagac ggccagcatc 60

acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120

cagtcacctg tgctggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240

gatgaggctg actattactg tggcgtgttg aagcaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300

accaagctca ccgtccta 318

<210> 606

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VL Homo sapiens33_640082-7B

<400> 606

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala

	20		25		30	
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr						
	35		40		45	
Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser						
	50		55		60	
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met						
	65		70		75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Leu Lys Gln Asp Thr Gly Val						
		85		90		95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu						
		100		105		
<210> 607						
<211> 378						
<212> DNA						
<213> Sequenza artificiale						
<220>						
<223> DNA VH Homo sapiens33_640084-2B						
<400> 607						
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc						60
tcctgtgcgg cctctggatt cgcctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct						120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac						180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat						240
ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccggcagaag						300
ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tatccctttg gctactgggg ccaagggaca						360
atggtcaccg tctcgagt						378
<210> 608						
<211> 126						
<212> PRT						
<213> Sequenza artificiale						
<220>						
<223> PRT VH Homo sapiens33_640084-2B						
<400> 608						
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 Ala Phe Ser Ser Tyr						
	20		25		30	

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

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

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

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

Ala Arg Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
 100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 609

<211> 318

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> DNA VL Homo sapiens33_640084-2B

<400> 609

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60

acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120

cagtcacctg tgctggatcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240

gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg cgggacgaca gcccattctt cggcggaggg 300

accaagctca ccgtccta 318

<210> 610

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VL Homo sapiens33_640084-2B

<400> 610

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ile Asp Thr 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 Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
 100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 613

<211> 318

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> DNA VL Homo sapiens33_640086-6B

<400> 613

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60

acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120

cagtcacctg tgctggtcac ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaagccatg 240

gatgaggctg actattactg tgaggtaag gtgaaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300

accaagctca ccgtccta 318

<210> 614

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VL Homo sapiens33_640086-6B

<400> 614

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala

	20		25		30	
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr						
	35		40		45	
Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser						
	50		55		60	
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met						
	65		70		75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Val Lys Val Lys Asp Thr Gly Val						
		85		90		95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu						
		100		105		
<210> 615						
<211> 378						
<212> DNA						
<213> Sequenza artificiale						
<220>						
<223> DNA VH Homo sapiens33_640087-7B						
<400> 615						
gaggtgcagc tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc						60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc ttagctgggt ccgccaggct						120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcaggc atttctgcaa tagaccaaag cacatactac						180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat						240
ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ccggcagaag						300
ttcatgcagc tatggggggg gggcttgcgt tacccttcg gctactgggg ccaggggaca						360
atggtcaccg tctctca						378
<210> 616						
<211> 126						
<212> PRT						
<213> Sequenza artificiale						
<220>						
<223> PRT VH Homo sapiens33_640087-7B						
<400> 616						
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 Gly Ile Ser Ala Ile Asp Gln 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 Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
 100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 617

<211> 318

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> DNA VL Homo sapiens33_640087-7B

<400> 617

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60

acctgctctg gagaaggaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120

cagtcacctg tgctggatcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggctatg 240

gatgaggctg actattactg tggggtgatc caggacaaca ctgggggtatt cggcggaggg 300

accaagctca ccgtccta 318

<210> 618

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VL Homo sapiens33_640087-7B

<400> 618

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Gly Met Gly Asp Lys Tyr Ala

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

Ser Ser Ile Asp Ala Ile Ser Ser 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

Ser Arg Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
 100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 621

<211> 318

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> DNA VL Homo sapiens33_640201-2B

<400> 621

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60

acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120

cagtcacctg tgctgggtcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240

gatgaggctg actattactg tggcgtgttg aagcaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300

accaagctca ccgtccta 318

<210> 622

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VL Homo sapiens33_640201-2B

<400> 622

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala

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

Ser Gly Ile Ala Asp Asp Phe Thr Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Pro 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 Leu Trp Met Met Asn Tyr Ala Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
 100 105 110

Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 625

<211> 318

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> DNA VL Homo sapiens33_640237-2B

<400> 625

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac ggccagcatc 60

acctgctctg gagaaagaat gggggataaa tatgctgcct ggtatcagca gaagccaggc 120

cagtcacctg tgctggatcat ctatcgagat acaaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc acgttgacca tcagcgggac ccaggccatg 240

gatgaggctg actattactg tggcgtgttg aagcaggaca ctgggggtatt cggcggaggg 300

accaagctca ccgtccta 318

<210> 626

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> PRT VL Homo sapiens33_640237-2B

<400> 626

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Met Gly Asp Lys Tyr Ala

	20		25		30
Ala Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro	Gly Gln Ser Pro	Val Leu Val	Ile Tyr	
	35	40	45		
Arg Asp Thr	Lys Arg Pro Ser	Gly Ile Pro Glu	Arg Phe Ser	Gly Ser	
	50	55	60		
Asn Ser Gly	Asn Thr Ala Thr	Leu Thr Ile Ser	Gly Thr Gln	Ala Met	
	65	70	75	80	
Asp Glu Ala	Asp Tyr Tyr Cys	Gly Val Leu Lys	Gln Asp Thr	Gly Val	
	85	90	95		
Phe Gly Gly	Gly Thr Lys Leu	Thr Val Leu			
	100	105			
<210>	627				
<211>	191				
<212>	PRT				
<213>	Sequenza artificiale				
<220>					
<223>	FLAG 10His c-terminale	112-270 di IL-33 aa umana matura			
<400>	627				
Ser Ile Thr	Gly Ile Ser Pro	Ile Thr Glu Tyr	Leu Ala Ser	Leu Ser	
	1	5	10	15	
Thr Tyr Asn	Asp Gln Ser Ile	Thr Phe Ala	Leu Glu Asp	Glu Ser Tyr	
	20	25	30		
Glu Ile Tyr	Val Glu Asp	Leu Lys Lys	Asp Glu Lys	Lys Asp	Lys Val
	35	40	45		
Leu Leu Ser	Tyr Tyr Glu Ser	Gln His Pro Ser	Asn Glu Ser	Gly Asp	
	50	55	60		
Gly Val Asp	Gly Lys Met	Leu Met Val	Thr Leu Ser	Pro Thr	Lys Asp
	65	70	75	80	
Phe Trp Leu	His Ala Asn	Asn Lys Glu	His Ser Val	Glu Leu	His Lys
	85	90	95		
Cys Glu Lys	Pro Leu Pro	Asp Gln Ala Phe	Phe Val Leu	His Asn	Met
	100	105	110		
His Ser Asn	Cys Val Ser	Phe Glu Cys	Lys Thr Asp	Pro Gly	Val Phe
	115	120	125		

Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser
 130 135 140

Glu Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr Asn
 145 150 155 160

Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Gly Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp
 165 170 175

Asp Asp Lys Ala Ala His His His His His His His His His His
 180 185 190

<210> 628

<211> 190

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> FLAG 10His c-terminale 109-266 di IL-33 aa di topo matura

<400> 628

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

Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Val Ser Phe Val Leu Glu Asn Gly Cys Tyr
 20 25 30

Val Ile Asn Val Asp Asp Ser Gly Lys Asp Gln Glu Gln Asp Gln Val
 35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Tyr Glu Ser Pro Cys Pro Ala Ser Gln Ser Gly Asp
 50 55 60

Gly Val Asp Gly Lys Lys Leu Met Val Asn Met Ser Pro Ile Lys Asp
 65 70 75 80

Thr Asp Ile Trp Leu His Ala Asn Asp Lys Asp Tyr Ser Val Glu Leu
 85 90 95

Gln Arg Gly Asp Val Ser Pro Pro Glu Gln Ala Phe Phe Val Leu His
 100 105 110

Lys Lys Ser Ser Asp Phe Val Ser Phe Glu Cys Lys Asn Leu Pro Gly
 115 120 125

Thr Tyr Ile Gly Val Lys Asp Asn Gln Leu Ala Leu Val Glu Glu Lys
 130 135 140

Asp Glu Ser Cys Asn Asn Ile Met Phe Lys Leu Ser Lys Ile Asn Pro
 145 150 155 160

Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Gly Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
 165 170 175

Asp Lys Ala Ala His His His His His His His His His His
 180 185 190

<210> 629

<211> 191

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> FLAG 10His c-terminale 112-270 di IL-33 aa di cynomolgus
 matura

<400> 629

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

Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr
 20 25 30

Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Lys Lys Lys Asp Lys Val
 35 40 45

Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Ser Glu Ser Gly Asp
 50 55 60

Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp
 65 70 75 80

Phe Trp Leu Gln Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys
 85 90 95

Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Arg
 100 105 110

Ser Phe Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe
 115 120 125

Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Tyr Ser
 130 135 140

Glu Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Ile Asn
 145 150 155 160

Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Gly Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp
165 170 175

Asp Asp Lys Ala Ala His His His His His His His His His His
180 185 190

<210> 630

<211> 577

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> ECD-Fc/His6 di ST2 umano

<400> 630

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	Asp	Pro	Ala	Phe	Leu	Tyr	Lys	Val
				325					330					335	
Val	Gly	Ala	Ala	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
			340					345					350		
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
		355					360					365			
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
	370					375					380				
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
385					390					395					400
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
				405					410					415	
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
			420					425					430		

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
435 440 445

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
450 455 460

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
465 470 475 480

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
485 490 495

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
500 505 510

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
515 520 525

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
530 535 540

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
545 550 555 560

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys His His His His His
565 570 575

His
<210> 631
<211> 581
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> ECD-Fc/His di ST2 di topo
<400> 631

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 Asp Pro Ala Phe
 325 330 335
 Leu Tyr Lys Val Val Gly Ala Ala Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 340 345 350
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 355 360 365
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 370 375 380
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 385 390 395 400
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 405 410 415
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 420 425 430
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 435 440 445
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 450 455 460
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 465 470 475 480
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 485 490 495
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 500 505 510
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 515 520 525
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 530 535 540
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 545 550 555 560

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys His
565 570 575

His His His His His
580

<210> 632

<211> 193

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> IL33-01 - IL33 umana con N-terminale 10His, avitag, sito di scissione della proteasi Fattore-Xa

<400> 632

Met His His His His His His His His His Ala Ala Gly Leu Asn
1 5 10 15

Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ala Ala Ile Glu
20 25 30

Gly Arg Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser
35 40 45

Leu Ser Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu
50 55 60

Ser Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp
65 70 75 80

Lys Val Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser
85 90 95

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

Lys Asp Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu
115 120 125

His Lys Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His
130 135 140

Asn Met His Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly
145 150 155 160

Val Phe Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp
165 170 175

Ser Ser Glu Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu
180 185 190

Thr

<210> 633
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33 umana con 6His tag N-terminale e sito di scissione della proteasi TEV
 <400> 633

Met	Gly	His	His	His	His	His	His	Gly	Gly	Gly	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe
1				5					10					15	
Gln	Gly	Ser	Ser	Ile	Thr	Gly	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu	Ala
			20					25					30		
Ser	Leu	Ser	Thr	Tyr	Asn	Asp	Gln	Ser	Ile	Thr	Phe	Ala	Leu	Glu	Asp
		35					40					45			
Glu	Ser	Tyr	Glu	Ile	Tyr	Val	Glu	Asp	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Lys
	50					55					60				
Asp	Lys	Val	Leu	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Gln	His	Pro	Ser	Asn	Glu
65						70				75					80
Ser	Gly	Asp	Gly	Val	Asp	Gly	Lys	Met	Leu	Met	Val	Thr	Leu	Ser	Pro
				85					90					95	
Thr	Lys	Asp	Phe	Trp	Leu	His	Ala	Asn	Asn	Lys	Glu	His	Ser	Val	Glu
			100					105					110		
Leu	His	Lys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	Gln	Ala	Phe	Phe	Val	Leu
		115					120					125			
His	Asn	Met	His	Ser	Asn	Cys	Val	Ser	Phe	Glu	Cys	Lys	Thr	Asp	Pro
	130					135					140				
Gly	Val	Phe	Ile	Gly	Val	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Val
145					150					155					160
Asp	Ser	Ser	Glu	Asn	Leu	Cys	Thr	Glu	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys	Leu	Ser
				165					170					175	

Glu Thr

<210> 634
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33-02
 <400> 634

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

Thr

<210> 635

<211> 193

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> IL33-03

<400> 635

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

Thr
 <210> 636
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33-04
 <400> 636

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

Thr
 <210> 637
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33-05
 <400> 637

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

Thr
 <210> 638
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33-06
 <400> 638

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

Thr
 <210> 639
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33-07
 <400> 639

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

Thr
 <210> 640
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33-08
 <400> 640

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

Thr
 <210> 641
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33-09
 <400> 641

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

Thr
 <210> 642
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33-10
 <400> 642

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

Thr
 <210> 643
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33-11
 <400> 643

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

Thr
 <210> 644
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33-12
 <400> 644

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

Thr
 <210> 645
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33-13
 <400> 645

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

Thr
 <210> 646
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33-14
 <400> 646

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

Thr
 <210> 647
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33-15
 <400> 647

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

Thr
 <210> 648
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> IL33-16
 <400> 648

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

Thr
 <210> 649
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Sequenza artificiale
 <220>
 <223> HisAvi_IL-33 di Cyno
 <400> 649

Met His His His His His His His His His His His Ala Ala Gly Leu Asn
1 5 10 15

Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ala Ala Ile Glu
20 25 30

Gly Arg Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser
35 40 45

Leu Ser Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu
50 55 60

Ser Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Lys Lys Lys Asp
65 70 75 80

Lys Val Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Ser Glu Ser
85 90 95

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

Lys Asp Phe Trp Leu Gln Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu
115 120 125

His Lys Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His
130 135 140

Asn Arg Ser Phe Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly
145 150 155 160

Val Phe Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp
165 170 175

Tyr Ser Glu Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu
180 185 190

Ile
<210> 650
<211> 360
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale
<220>
<223> ECD-Flag-his10 di ST2 umano

<400> 650

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

618

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	Asp	Pro	Ala	Phe	Leu	Tyr	Lys	Val	
				325					330					335		
Val	Gly	Ala	Ala	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ala	Ala	His	His	
			340					345					350			
His	His	His	His	His	His	His	His	His								
		355						360								

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo isolato che si lega a redIL-33, o a un relativo frammento di legame all'antigene, in cui l'anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene comprende una VHCDR1 avente la sequenza di SEQ ID NO: 543, una VHCDR2 avente la sequenza di SEQ ID NO: 544, una VHCDR3 avente la sequenza di SEQ ID NO: 545, una VLCDR1 avente la sequenza di SEQ ID NO: 548, una VLCDR2 avente la sequenza di SEQ ID NO: 549, e una VLCDR3 avente la sequenza di SEQ ID NO: 550.

2. Anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene della rivendicazione 1, che è selezionato tra un anticorpo umano, un anticorpo chimerico e un anticorpo umanizzato.

3. Anticorpo isolato, o relativo frammento di legame all'antigene, di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 2, che è selezionato da un frammento scFv, un frammento Fab, un frammento F(ab')₂, un minibody, un diabody, un triabody, un tetrabody e un anticorpo a catena singola.

4. Anticorpo isolato, o relativo frammento di legame all'antigene, secondo la rivendicazione 1, in cui la VH e la VL di detto anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene comprendono sequenze amminoacidiche almeno del 95%, 90% o 85% identiche a SEQ ID NO: 542 e SEQ ID NO: 547, rispettivamente.

5. Anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene secondo la rivendicazione 4, comprendente una VH avente la sequenza di SEQ ID NO: 542, e una VL avente la sequenza di SEQ ID NO: 547.

6. Anticorpo isolato o relativo frammento di legame all'antigene secondo la rivendicazione 1, comprendente una VH avente la sequenza di SEQ ID NO: 616, e una VL avente la sequenza di SEQ ID NO: 618.

7. Anticorpo isolato, o relativo frammento di legame all'antigene, di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, che è un anticorpo monoclonale.

8. Uno o più polinucleotidi codificanti per l'anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7.

9. Uno o più vettori comprendenti l'uno o più nucleotidi della rivendicazione 8.

10. Composizione comprendente l'uno o più polinucleotidi della rivendicazione 8, o l'uno o più vettori della rivendicazione 9.

11. Cellula ospite comprendente l'uno o più polinucleotidi della rivendicazione 8, o l'uno o più vettori della rivendicazione 9.

12. Metodo per produrre un anticorpo anti-IL33, o relativo frammento di legame all'antigene, comprendente la coltura della cellula ospite della rivendicazione 11, e il recupero di detto anticorpo o relativo frammento di legame all'antigene.

13. Metodo per rilevare l'espressione di redIL-33 in un campione comprendente:

(a) mettere a contatto un campione contenente una cellula isolato con l'anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7; e

(b) rilevare il legame di detto anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, in detto campione.

14. Composizione farmaceutica comprendente l'anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7 e un trasportatore.

15. Prodotto di combinazione comprendente l'anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, e un agente terapeutico.

16. Anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7 o composizione farmaceutica della rivendicazione 14 o prodotto di combinazione della rivendicazione 15 per l'uso in terapia.

17. Anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7 o composizione della rivendicazione 14 per l'uso nel trattamento di un soggetto con una condizione infiammatoria comprendente somministrare al soggetto una quantità efficace di detto anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, o composizione.

18. Anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, per l'uso secondo la rivendicazione 17, in cui detta condizione infiammatoria è un disturbo allergico.

19. Anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, per l'uso secondo la rivendicazione 17, in cui detta condizione infiammatoria è asma o BPCO.

20. Anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, per l'uso secondo la rivendicazione 17, in cui detta condizione infiammatoria è nelle vie aeree di detto soggetto.

21. Anticorpo, o relativo frammento di legame all'antigene, per l'uso secondo la rivendicazione 18, in cui detta condizione infiammatoria è eczema o dermatite.

Si conferma la perfetta conformità della traduzione precedente.

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLE 2-58/58

Figure 2-58

“FIGURE” = FIGURA

TAVOLA 1/58

Figura 1

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Total binding” = Legame totale

“Non-specific binding” = Legame aspecifico

“Well B04” = Pozzetto B04

TAVOLA 2/58

Figura 2A

“ScFv tested in the human” = ScFv provato nell’essere umano

“IL-33: human ST2 HTRF® assay” = Saggio HTRF® IL-33:ST2 umano

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control scFv” = scFv di controllo

Figura 2B

“ScFv tested in the cyno” = ScFv provato nella cyno

“IL-33: human ST2 HTRF® assay” = Saggio HTRF® IL-33:ST2 umano

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

TAVOLA 3/58

Figura 3A

“IgGs tested in the human” = IgG provate nell’essere umano

“IL-33: human ST2 HTRF® assay” = Saggio HTRF® IL-33:ST2 umano

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control IgG” = IgG di controllo

Figura 3B

“IgGs tested in the cynomolgus” = IgG provata nella cynomolgus

“IL-33: human ST2 HTRF® assay” = Saggio HTRF® IL-33:ST2 umano

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control IgG” = IgG di controllo

TAVOLA 4/58

Figura 4A

“IgGs tested in the human” = IgG provate nell’essere umano

“L-33 NFkB reporter assay” = Saggio di reporter NFkB L-33

“% Specific Response” = Risposta specifica in %

“Control IgG” = IgG di controllo

Figura 4B

“IgGs tested in the human” = IgG provate nell’essere umano

“NFkB Translocation assay” = Saggio di traslocazione di NFkB

“% Maximal Response” = Risposta massima in %

“Control IgG1” = IgG1 di controllo

TAVOLA 6/58

Figura 6

“Human IL-33” = IL-33 umana

“Cyno IL-33 FH” = FH di IL-33 di cyno

“Insulin” = Insulina

TAVOLA 7/58

Figura 7A

“TF-1 proliferation assay” = Saggio di proliferazione di TF-1

“IL-33 (Alexis@100ng/ml)” = IL-33 (Alexis@100ng/ml)

“% Maximal response” = Risposta massima in %

Figura 7B

“HUVEC IL-6 Release” = Rilascio di IL-6 di HUVEC

“IL-33 (Adipogen@30ng/ml)” = IL-33 (Adipogen@30ng/ml)

“% Maximal Response” = Risposta massima in %

“Control mAb” = mAb di controllo

TAVOLA 8/58

Figura 8A

“Human CBMC” = CBMC umano

“Inhibition of Adipogen IL-33 (30ng/mL) by IgG” = Inibizione di IL-33

Adipogen (30 ng/mL)

“Log [Antibody] M” = Log [Anticorpo] M

“Control hlgG1 mAb” = mAb hlgG1 di controllo

Figure 8B-8F

“Human CBMC” = CBMC umano

“Inhibition of Adipogen IL-33 (30ng/mL) by IgG” = Inibizione di IL-33

Adipogen (30 ng/mL) mediante IgG

“Log [Antibody] M” = Log [Anticorpo] M

“Control mAb IgG1” = mAb IgG1 di controllo

TAVOLA 9/58

Figura 9

“Polyclonal” = Policlonale

“Isotype” = Isotipo

“magic mark XP” = magic mark XP

“mock transfected HEK-EBNA” = HEK-ENBA trasfettato di simulazione
“FL HuIL33 transfected HEK-EBNA” = HEK-EBNA trasfettato HuIL33 FL
“FL HuIL33 predicted MW” = MW HuIL33 FL previsto
“Caspase3 cleaved IL33 predicted 10kDa and 20kDa fragments” = La caspasi 3 ha scisso IL 33 prevista frammenti di 10kDa e 20kDa

TAVOLA 10/58

Figura 10A

“% Maximal IL-6 Release” = Rilascio di IL-6 massimo in %

“Control mAb” = mAb di controllo

Figura 10B

“% Maximal IL-13 Release” = Rilascio di IL-13 massimo in %

“Control mAb” = mAb di controllo

TAVOLA 11/58

Figura 11A

“Competition Assay” = Saggio di competizione

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

Figura 11B

“HUVEC NFkB Translocation” = Traslocazione di NFkB di HUVEC

“IL-33 (Adipogen@1 ng/mL)” = IL-33 (Adipogen@1 ng/mL)

“% Maximal Response” = Risposta massima in %

“Control mAb” = mAb di controllo

TAVOLA 12/58

Figura 12A

“IL330101 Epitope” = Epitopo IL330101

“Competition Assay” = Saggio di competizione

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

Figura 12B

“IL330180 Epitope” = Epitopo IL330180

“Competition Assay” = Saggio di competizione

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Irrelevant scFv” = scFv irrilevante

TAVOLA 13/58

Figura 13

“IL330101 - Bio IL-33” = IL330101 - Bio IL-33

“Epitope Competition Assay” = Saggio di competizione di epitopo

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control ScFv” = ScFv di controllo

TAVOLA 14/58

Figura 14A

“IL330101 - Bio IL-33” = IL330101 - Bio IL-33

“Epitope Competition Assay” = Saggio di competizione di epitopo

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control IgG” = IgG di controllo

Figura 14B

“H338L293 Epitope Competition Assay” = Saggio di competizione di epitopo H338L293

“Human IL-33” = IL-33 umana

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control” = Controllo

TAVOLA 15/58

Figura 15A

“IL-6 Response” = Risposta di IL-6

“% Maximal IL-6 release” = Rilascio di IL-6 massimo in %

“Control mAb” = mAb di controllo

Figura 15B

“Human Mast Cell” = Mastocita umano

“IL-6 production” = Produzione di IL-6

“% Maximal IL-6 release” = Rilascio di IL-6 massimo in %

“Control mAb” = mAb di controllo

TAVOLA 16/58

Figura 16

“Combined data” = Dati combinati

“Normalised response” = Risposta normalizzata

“Human CBMC” = CBMC umana

“Schild Analysis” = Analisi di Schild

“IL-6 (Europium Counts)” = IL-6 (Conteggi di Europio)

“Schild plot” = Grafico di Schild

“log (Dose Ratio-1)” = log (Rapporto di dose-1)

“log [Antagonist]” = log [Antagonista]

TAVOLA 17/58

Figura 17A

“IL-33 potency” = Potenza di IL-33

“30min vs. 24 hours” = 30 minuti rispetto a 24 ore

“Normalised Response” = Risposta normalizzata

“IL-6-24hr” = IL-6-24 ore

Figura 17B

“biotinIL-33 potency” = Potenza di IL-33 biotinilata

“30min vs. 24 hours” = 30 minuti rispetto a 24 ore

“Normalised Response” = Risposta normalizzata

“IL-6-24hr” = IL-6-24 ore

Figura 17C

“NFkB Translocation” = Traslocazione di NFkB

“Signal (Nuclear localization)” = Segnale (localizzazione nucleare)

“Media pre-treatment” = Pre-trattamento di terreno

“No Treatment” = Nessun trattamento

TAVOLA 18/58

Figura 18A

“IMDM media” = Terreno IMDM

“Non-reducing conditions” = Condizioni non riducenti

“Reducing conditions” = Condizioni riducenti

Figura 18B

“BiotinIL-33” = IL-33 biotinilata

“Non-reducing conditions” = Condizioni non riducenti

Figura 18C

“IMDM media” = Terreno IMDM

“Reduced” = Ridotto

“Oxidized” = Ossidato

“Non-reducing conditions” = Condizioni non riducenti

“Reducing conditions” = Condizioni riducenti

TAVOLA 19/58

Figura 19

“Preparation of oxidised IL-33 for mass-spec analysis” = Preparazione di IL-33 ossidata per analisi di spettrometria di massa

“Untagged IL-33” = IL-33 priva di tag

“18 hour incubation of IL-33 (300ug/ml) in 60% IMDM or PBS” = 18 ore di incubazione di IL-33 (300 ug/ml) in IMDM al 60% o PBS

“SEC of alternative IL-33 preps” = SEC di preparazioni IL-33 alternative

“Overlay” = Sovrapposizione

“Media” = Terreno

“Media components” = Componenti di terreno

“Monomer IL-33” = IL-33 di monomero

“Aggregate IL-33” = IL-33 aggregata

“Mass spectrometry analysis” = Analisi di spettrometria di massa

TAVOLA 20/58

Figura 20

“Mass Spec analysis - intact mass” = Analisi di spettrometria di massa

“Media-treated” = Trattato con terreno

“PBS-treated” = Trattato con PBS

TAVOLA 21/58

Figura 21A

“Peptide Map” = Mappa di peptidi

“Intensity (counts)” = Intensità (conteggi)

“mass (DA)” = massa (DA)

Figura 21B

“Cysteine containing peptides” = Cisteina contenente peptidi

“Intensity (counts)” = Intensità (conteggi)

“mass (DA)” = massa (DA)

Figura 21C

“Peptides” = Peptidi

“Sequence” = Sequenza

“Non-reduced Lys-C peptide map” = Mappa di peptidi Lys-C non ridotta

“Cys oxidation status” = Stato di ossidazione Cys

“Reduced Lys-C peptide map” = Mappa di peptidi Lys-C ridotta

TAVOLA 22/58

Figura 22A

“Pre-conc. Non Reduced” = Pre-conc. Non ridotta

“Pre-conc. Reduced” = Pre-conc. ridotta

“Post-conc. Non Reduced” = Post-conc. Non ridotta

“Post-conc. Reduced” = Post-conc. ridotta

Figura 22B

“red-IL-33” = red-IL-33

Figura 22C

“Molar Ellipticity ($\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$)” = Ellitticità molare ($\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$)

“Wavelength” = Lunghezza d'onda

“Red-IL-33” = Red-IL-33

Figura 22D

“ST2 binding site 1” = Sito di legame ST2 1

“ST2 binding site 2” = Sito di legame ST2 2

Figura 22E

“MRE (deg x cm² x dmol⁻¹)” = MRE (deg x cm² x dmol⁻¹)

“Wavelength” = Lunghezza d'onda

“Red-IL-33” = Red-IL-33

TAVOLA 23/58

Figura 23A

“Hydrogen Exchange” = Scambio di idrogeno

Figura 23B

“ST2 binding site 1” = Sito di legame ST2 1

“ST2 binding site 2” = Sito di legame ST2 2

“Red-IL-33” = Red-IL-33

“Hydrogen Exchange” = Scambio di idrogeno

TAVOLA 24/58

Figura 24A

“Reduced IL33 binding to ST2” = Legame di IL33 ridotta a ST2

“Sensorgrams from 7.8nM to 0.24nM are shown giving a K_D of 0.2nM” =

Sensogrammi da 7,8 a 0,24 nM sono mostrati come apportanti una K_D di 0,2 nM

Figura 24B

“DSB IL33 binding to ST2” = Legame di IL33 DBS a ST2

“Sensorgrams from 500nM to 0.24nM with no obvious binding” =

Sensogrammi da 500 nM a 0,24 nM senza legami evidenti

TAVOLA 25/58

Figura 25A

“RnD Systems - human IL-33” = Sistemi RnD – IL-33 umana

“Goat polyclonal capture” = Agente di cattura policlonale di capra

“Goat polyclonal detection” = Rilevamento policlonale di capra

“Signal Intensity ” = Intensità di segnale

“Red-IL-33” = RED-IL-33

“IL-33 alone” = IL-33 da sola

Figura 25B

“Luminex-human IL-33” = Luminex-IL-33 umana

“Signal Intensity ” = Intensità di segnale

“Red-IL-33” = Red-IL-33

“IL-33 alone” = IL-33 da sola

Figura 25C

“RnD Systems - mouse IL-33” = Sistemi RnD – IL-33 di topo

“Goat polyclonal capture” = Agente di cattura policlonale di capra

“Goat polyclonal detection” = Rilevamento policlonale di capra

“Signal Intensity ” = Intensità di segnale

“Oxidised-IL-33” = IL-33 ossidata

“Red-IL-33” = Red-IL-33

“mouse IL-33” = IL-33 di topo

“Signal vs Molar ratio ST2” = Segnale rispetto a rapporto molare di ST2

“Signal Ratio” = Rapporto di segnale

“Molar ratio ST2/IL-33” = Rapporto molare ST2/IL-33

TAVOLA 26/58

Figura 26A

“Medl Assay 1” = Saggio Medl 1

“IL330004 capture” = Agente di cattura di IL330004

“IL330425 detection” = Rilevamento di IL330425

“Signal Intensity ” = Intensità di segnale

“Red-IL-33” = Red-IL-33

Figura 26B

“Medl Assay 2” = Saggio Medl 2

“IL330425 capture” = Agente di cattura di IL330425

“ST2biotin detection” = Rilevamento di ST2 biotinilato

“Signal Intensity ” = Intensità di segnale

TAVOLA 27/58

Figura 27A

“Red IL-33” = Red-IL-33

“Signal Intensity ” = Intensità di segnale

“Log Time (hrs)” = Tempo log (ore)

“Serum alone” = Siero da solo

“Serum” = Siero

Figura 27B

“Serum” = Siero

“Media” = Terreno

“Non-reduced” = Non ridotto

“Reduced” = Ridotto

“Marker” = Marcatore

“Serum No IL33” = IL33 senza siero

“Red IL-33” = Red ILL-33

TAVOLA 28/58

Figura 28A

“Millipore human IL-33 assay” = Saggio di IL-33 umana Millipore

“Time (min)” = Tempo (minuti)

“IL-33 forms (calculated)” = Forme di IL-33 (calcolate)

“Reduced IL-33” = IL-33 ridotta

Figura 28B

“R&D human IL-33 assay” = Saggio di IL-33 umana R&D

“Time (min)” = Tempo (minuti)

“Reduced IL-33 (calculated)” = IL-33 ridotta (calcolata)

Figura 28C

“‘Free’ IL-33 assay in-house” = Saggio di IL-33 “Free” di laboratorio

“Capture IL330425 - detection sST2” = Agente di cattura di IL330425 –
rilevamento di ST2

“Time (min)” = Tempo (minuti)

“Specific signal (calculated)” = Segnale specifico (calcolato)

TAVOLA 29/58

Figura 29A

“R&D mouse IL-33 assay” = Saggio di IL-33 di topo R&D

“Time post Alternaria (min)” = Tempo post Alternaria (minuti)

“ALT WT” = ALT WT

“Trap” = Trappola

Figura 29B

“R&D mouse IL-33 assay” = Saggio di IL-33 di topo R&D

“IL33 forms (calculated)” = Forme di IL33 (calcolate)

“Time post Alternaria (min)” = Tempo post Alternaria (min)

“Reduced IL-33” = IL-33 ridotta

TAVOLA 30/58

Figura 30A

“sypro orange binding” = Legame di sypro orange

“RFU at 100 min” = RFU a 100 minuti

Figura 30B

“sypro orange binding” = legame di sypro orange

“Time (min)” = Tempo (minuti)

Figura 30C

“Control” = Controllo

“Reduced” = Ridotto

“Non-reduced” = Non ridotto

TAVOLA 31/58

Figura 31

“Signal” = Segnale

“6 Hours” = 6 ore

TAVOLA 32/58

Figura 32

“IL33-ST2 Binding Assay” = Saggio di legame di IL33-ST2

“Anti FLAG Cryptate” = Criptato Anti FLAG

“Biotinylated ST2-Fc” = ST2-Fc biotinilato

“Streptavidin XL^{ent}” = Streptavidina XL^{ent}

“Competition” = Competizione

“% specific binding” = Legame specifico in %

“IL-33:mAb pre-incubation” = pre-incubazione di IL-33:mAb

“Isotype control” = Controllo di isotropo

TAVOLA 33/58

Figura 33A

“MALDI-TOF MS-MS fragmentation analysis of 3,206 Da precursor ion” =

Frammentazione di MALDI-TOF MS-MS di ione precursore di 3,206 Da

“% Intensity” = Intensità %

“Mass” = Massa

TAVOLA 34/58

Figura 34

“Translocation Signal” = Segnale di traslocazione

“WT” = WT

“Pre-Inc” = Pre-Inc

TAVOLA 35/58

Figura 35A

“Human Mast Cell” = Mastocita umano

Figura 35B

“Concentration (µg/mouse)” = Concentrazione ((µg/topo)

TAVOLA 37/58

Figura 37A

“IL-33:ST2 Competition Assay” = Saggio di competizione IL-33:ST2

“Wild Type IL-33” = IL-33 di tipo selvatico

“1 hour Incubation” = Incubazione di 1 ora

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control scFv” = scFv di controllo

Figura 37B

“IL-33:ST2 Competition Assay” = Saggio di competizione di IL-33:ST2

“Mutant IL-33” = IL-33 mutante

“1 hour Incubation” = Incubazione di 1 ora

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control scFv” = scFv di controllo

Figura 37C

“IL-33:ST2 Competition Assay” = Saggio di competizione di IL-33:ST2

“Wild Type IL-33” = IL-33 di tipo selvatico

“Overnight Incubation” = Incubazione di una notte

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control scFv” = scFv di controllo

Figura 37D

“IL-33:ST2 Competition Assay” = Saggio di competizione di IL-33:ST2

“Mutant IL-33” = IL-33 mutante

“Overnight Incubation” = Incubazione di una notte

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control scFv” = scFv di controllo

TAVOLA 38/58

Figura 38A

“IL-33:ST2 Competition Assay” = Saggio di competizione di IL-33:ST2

“Wild Type IL-33” = IL-33 di tipo selvatico

“1 hour Incubation” = Incubazione di 1 ora

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control IgG” = IgG di controllo

Figura 38B

“IL-33:ST2 Competition Assay” = Saggio di competizione di IL-33:ST2

“Wild Type IL-33” = IL-33 di tipo selvatico

“Overnight Incubation” = Incubazione di una notte

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control IgG” = IgG di controllo

TAVOLA 39/58

Figura 39A

“HUVEC IL-6 Release” = Rilascio di IL-6 di HUVEC

“His-Avi-IL33 WT@30ng/ml” = His-Avi-IL33 WT@30ng/ml

“% Maximal Response” = Risposta massima in %

“Control mAb” = mAb di controllo

Figura 39B

“HUVEC IL-6 Release” = Rilascio di IL-6 di HUVEC

“His-Avi-IL33-11@30ng/ml” = His-Avi-IL33 WT@30ng/ml

“% Maximal Response” = Risposta massima in %

“Control mAb” = mAb di controllo

TAVOLA 40/58

Figura 40A

“33v20064 Epitope Competition Assay” = Saggio di competizione di epitopo 33v20064

“Human Wild Type IL-33” = IL-33 di tipo selvatico umana

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“B7H3 avi his” = B7H3 avi his

“Mouse IL-33 FH” = FH IL-33 di topo

“Cyno IL-33 FH” = FH IL-33 di Cyno

“Human IL-33 FH” = FH IL-33 umana

Figura 40A

“33v20064 Epitope Competition Assay” = Saggio di competizione di epitopo 33v20064

“Human Wild Type IL-33” = IL-33 di tipo selvatico umana

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Human IL-33 FH” = FH IL-33 umana

“Human IL-1 beta” = IL-1 beta umana

“Human IL-1 alpha” = IL-1 alfa umana

“B7H3 avi his” = B7H3 avi his

TAVOLA 41/58

Figura 41A

“IL-33:ST2 Competition Assay” = Saggio di competizione di IL-33:ST2

“Wild Type IL-33” = IL-33 di tipo selvatico

“1 hour Incubation” = Incubazione di 1 ora

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control scFv” = scFv di controllo

Figura 41B

“IL-33:ST2 Competition Assay” = Saggio di competizione di IL-33:ST2

“Wild Type IL-33” = IL-33 di tipo selvatico

“Overnight Incubation” = Incubazione di una notte

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control scFv” = scFv di controllo

TAVOLA 42/58

Figura 42A

“Huvec IL-8 Release” = Rilascio di IL-8 di HUVEC

“His-Avi-IL-33 WT @2ng/ml” = His-Avi-IL-33 WT @2ng/ml

“% inhibition” = % di inibizione

“Antibody concentration (M)” = Concentrazione di anticorpo (M)

“Control mAb” = mAb di controllo

Figura 42B

“Huvec IL-8 Release” = Rilascio di IL-8 di Huvec

“FL IL-33 lysate (1:1000 dilution)” = Lisato di IL-33 FL (diluzione 1:1000)

“% Maximal Response” = Risposta massima in %

“Control mAb” = mAb di controllo

TAVOLA 43/58

Figura 43A

“Samples incubated in IMDM +1 % BSA” = Campioni incubati in IMDM +
BSA all'1%

“Time (hours)” = Tempo (ore)

“Control mAb” = mAb di controllo

“none” = nessuno

Figura 43B

“Samples incubated in PBS +1 % BSA” = Campioni incubati in IMDM +
BSA all'1%

“Time (hours)” = Tempo (ore)

“Control mAb” = mAb di controllo

“none” = nessuno

TAVOLA 44/58

Figura 44

“33_640117 - Bio IL-33 WT” = 33_640117 - IL-33 WT Bio

“Epitope Competition Assay (1 hour)” = Saggio di competizione di epitopo
(1 ora)

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control IgG” = IgG di controllo

“Epitope Competition Assay (Overnight)” = Saggio di competizione di epitopo (una notte)

“33_640117 - Bio IL-33 Cyno” = 33_640117 - IL-33 Cyno Bio

TAVOLA 45/58

Figura 45A

“Huvec IL-8 Release” = Rilascio di IL-8 di Huvec

“His-Avi-IL-33 WT @2ng/ml” = His-Avi-IL-33 WT @2ng/ml”

“% Maximal Response” = Risposta massima in %

“Control mAb” = mAb di controllo

Figura 45B

“Huvec IL-8 Release” = Rilascio di IL-6 di Huvec

“FL IL-33 lysate (1:1000 dilution)” = Lisato IL-33 FL (diluizione 1:1000)

“% Maximal Response” = Risposta massima in %

“Control mAb” = mAb di controllo

TAVOLA 46/58

Figura 46A

“WT mouse” = Topo WT

Figura 46B

“Eosinophils” = Eosinofili

“Control mAb” = mAb di controllo

“mIL Trap” = Trappola mIL

“Trap control” = Controllo di trappola

TAVOLA 47/58

Figura 47

“Humanized IL-33 mouse” = Topo IL-33 umanizzato

“Control mAb” = mAb di controllo

“IL33 Trap” = Trappola IL33

“50µL i.n.” = 50µL i.n.

“Alternaria” = Alternaria

TAVOLA 48/58

Figura 48

“Humanized IL-33 mouse” = Topo IL-33 umanizzato

“Control mAb” = mAb di controllo

“i.p.” = i.p.

“One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test.” = ANOVA

unidirezionale con molteplici prove di confronto Bonferroni

TAVOLA 49/58

Figura 49A

“IL-33:ST2 Competition Assay” = Saggio di competizione IL-33:ST2

“Wild Type IL-33” = IL-33 di tipo selvatico

“Overnight Incubation” = Incubazione di una notte

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Control IgG” = IgG di controllo

Figura 49B

“Huvec IL-8 Release” = Rilascio di IL-8 di Huvec

“His-Avi-IL-33 WT @2ng/ml” = His-Avi-IL-33 WT @2ng/ml

“% Maximal Response” = Risposta massima in %

“Control mAb” = mAb di controllo

TAVOLA 50/58

Figure 50A-50B

“Cross-reactivity and Selectivity” = Reattività crociata e selettività

“% Specific Binding” = Legame specifico in %

“Human IL-33 FH” = FH IL-33 umana

“Cyno IL-33 FH” = FH IL-33 cyno

“Mouse IL-33 FH” = FH IL-33 di topo

“Rat IL-33” = IL-33 di ratto

“Human IL-1 alpha” = alfa IL-1 umana

“Human IL-1 beta” = beta IL-1 umana

TAVOLA 51/58

Figura 51

“Huvec IL-8 release” = Rilascio di IL-8 di Huvec

“Human lung homogenate supernatant” = Surnatante omogenato
polmonare umano

“% Maximal Response” = Risposta massima in %

“Control mAb = mAb di controllo

TAVOLA 52/58

Figura 52

“Humanized IL-33 mouse” = Topo IL-33 umanizzato

“Control mAb” = mAb di controllo

“i.p.” = i.p.

“One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test.” = ANOVA
unidirezionale con molteplici prove di confronto Bonferroni

TAVOLA 53/58

Figura 53A

“PBS or” = PBS o

“IL-33 (10ug) i.n. or i.p. 3 times per week” = i.n. IL-33 (10 ug) 3 volte a settimana

“Endpoint 6 weeks” = Punto di estremità a 6 settimane

Figura 53B

“*wk” = settimana

“IL-33 10ug 3x per week” = 10 ug IL-33 3x a settimana

“Reduced (i.n.)” = Ridotta (i.n.)

“Oxidised (i.n.)” = Ossidata (i.n.)

“Reduced (i.p.)” = Ridotta (i.p.)

“Oxidised (i.p.)” = Ossidata (i.p.)

Figura 53C

“Time post IL-33 (10ug i.p.)” = Tempo post IL-33 (10 ug i.p.)

“*hr” = ora*

“Reduced” = Ridotta

“Oxidised” = Ossidata

Figura 53D

“*wk” = settimana

“IL-33 10ug 3x per week” = 10 ug IL-33 3x a settimana

“Reduced (i.n.)” = Ridotta (i.n.)

“Oxidised (i.n.)” = Ossidata (i.n.)

“Reduced (i.p.)” = Ridotta (i.p.)

“Oxidised (i.p.)” = Ossidata (i.p.)

TAVOLA 54/58

Figura 54B

“6 week intranasal dosing of IL-33 to ST2-deficient mice leads to perivascular inflammation” = La somministrazione intranasale di 6 settimane di IL-33 a topi con deficit di ST2 comporta infiammazione perivascolare

TAVOLA 55/58

Figure 55A-55B

“Signal (arbitrary units)” = Segnale (unità arbitrarie)

“IL-33 titration” = Titolazione di IL-33

“Red IL-33” = Red IL-33

Figura 55C

“WT” = WT

TAVOLA 56/58

Figura 56A

“IL-33 binding assay” = Saggio di legame IL-33

“Absorbance” = Assorbanza

“WT-IL33” = IL-33 WT

Figura 56B

“pSTAT5 Translocation” = Traslocazione di pSTAT5

“Signal (arbitrary units)” = Segnale (unità arbitrarie)

“IL-33 titration” = Titolazione di IL-33

Figura 56C

“pSTAT5 Translocation” = Traslocazione di pSTAT5

“Signal (arbitrary units)” = Segnale (unità arbitrarie)

“IL-33 titration” = Titolazione di IL-33

“late IL33” = IL33 iate

“isotype” = isotopo

TAVOLA 57/58

Figura 57

“pSTAT5 (arbitrary units)” = pSTAT5 (unità arbitrarie)

“No Antibody” = Nessun anticorpo

TAVOLA 58/58

Figure 58A-58B

“Cell migrated” = Cella migrata

“No Ab” = Nessun Ab

“Control mAb” = mAb di controllo

“Media” = Terreno

FIG. 1

% Specific Binding												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	108	108	98	98	102	100	101	104	101	107	96	98
B	109	102	96	81	91	100	97	98	104	101	102	102
C	100	105	96	99	106	106	97	97	107	107	102	100
D	105	107	109	107	104	106	100	105	102	98	100	0
E	107	101	108	91	110	108	112	105	104	107	99	-0
F	108	105	104	96	100	106	101	107	98	105	99	0
G	98	106	105	102	105	105	100	104	96	97	105	132
H	102	104	114	108	104	110	102	100	107	100	107	132

} Total binding
 } Non-specific binding

Well B04 = IL330004

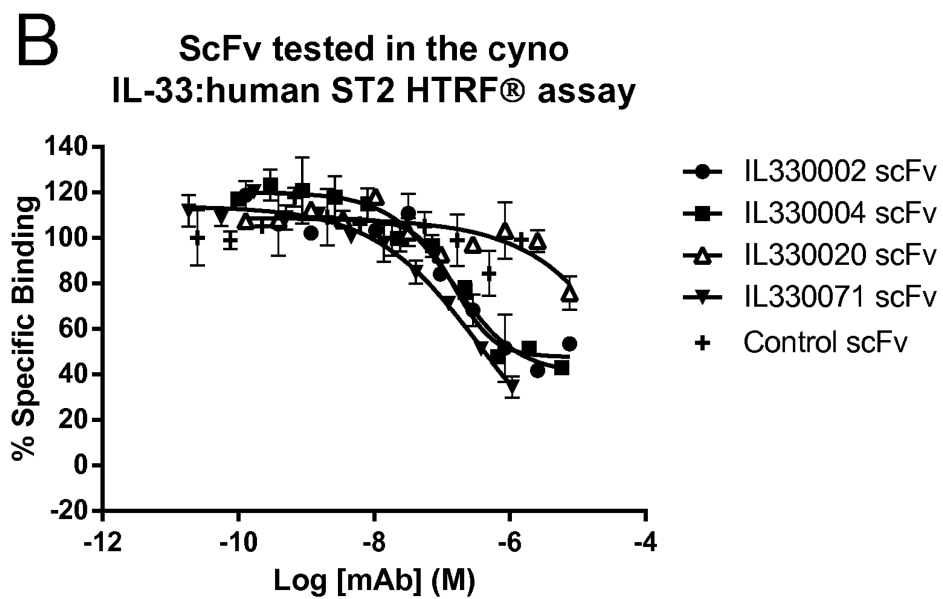
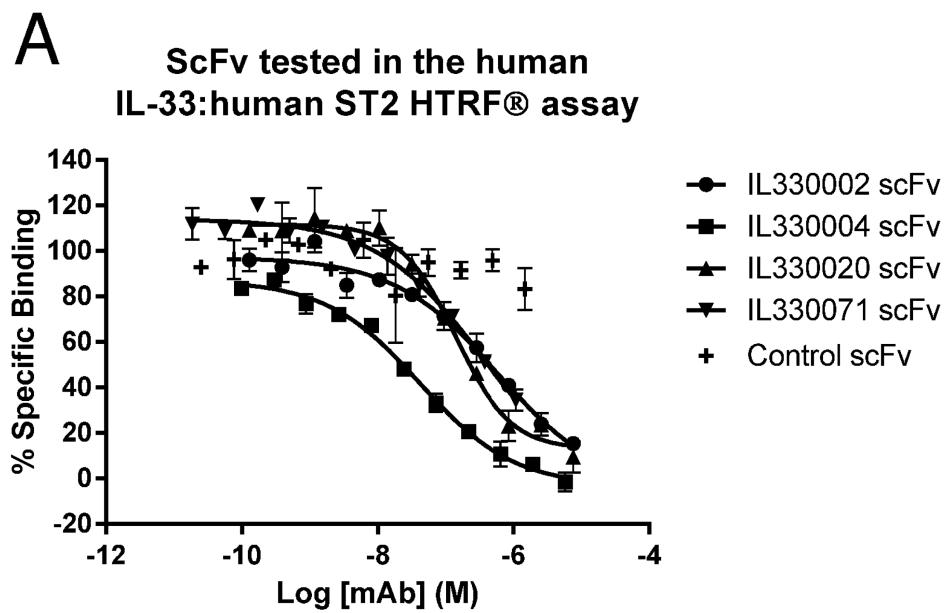


FIGURE 2

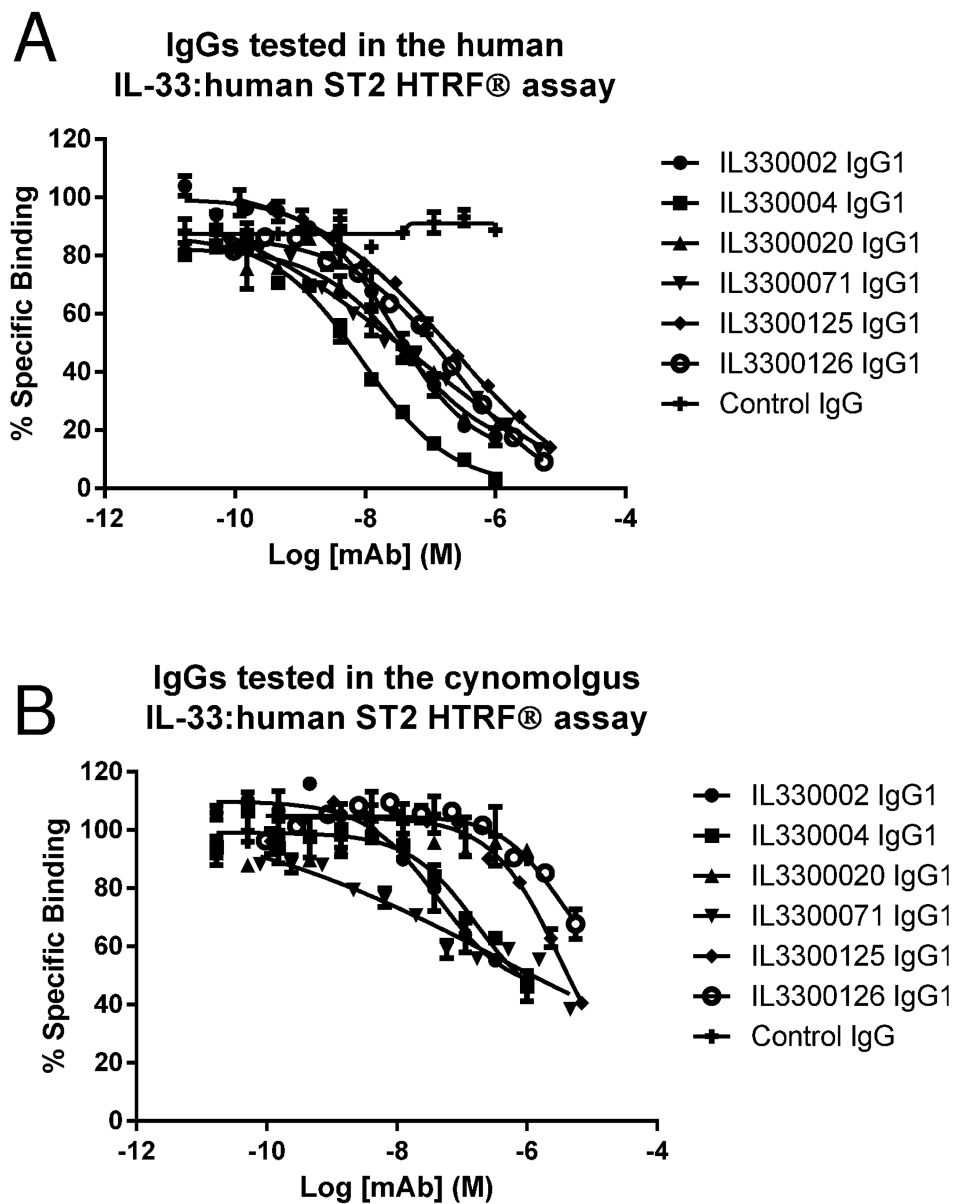


FIGURE 3

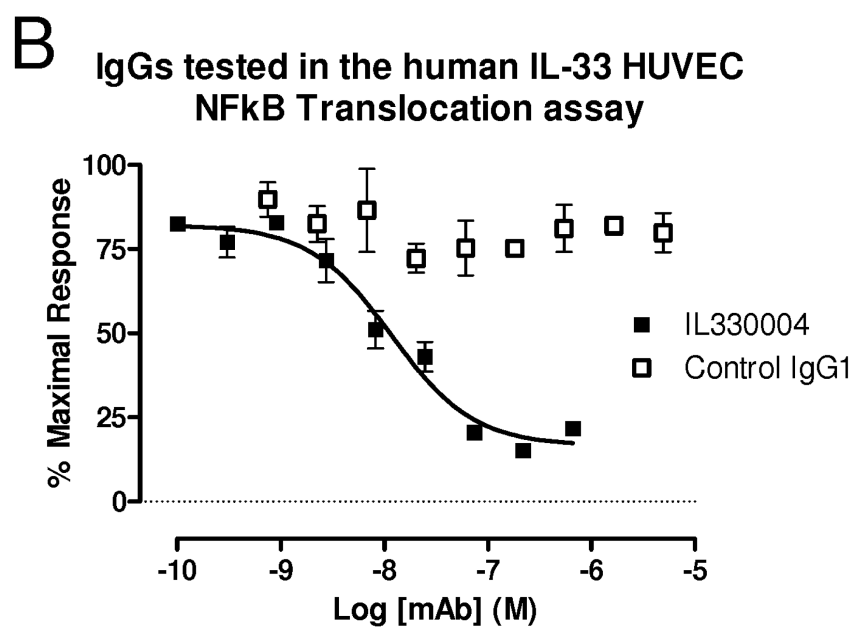
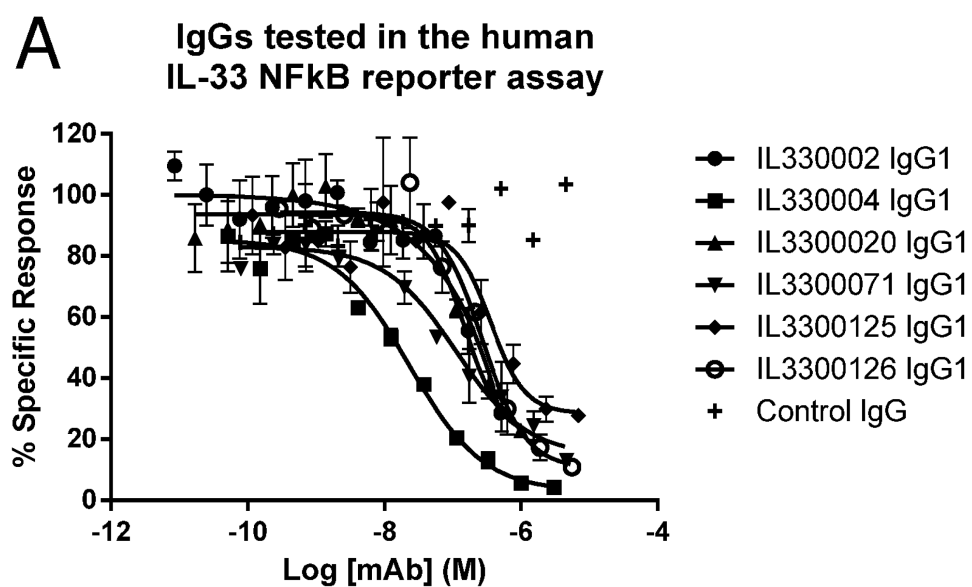


FIGURE 4

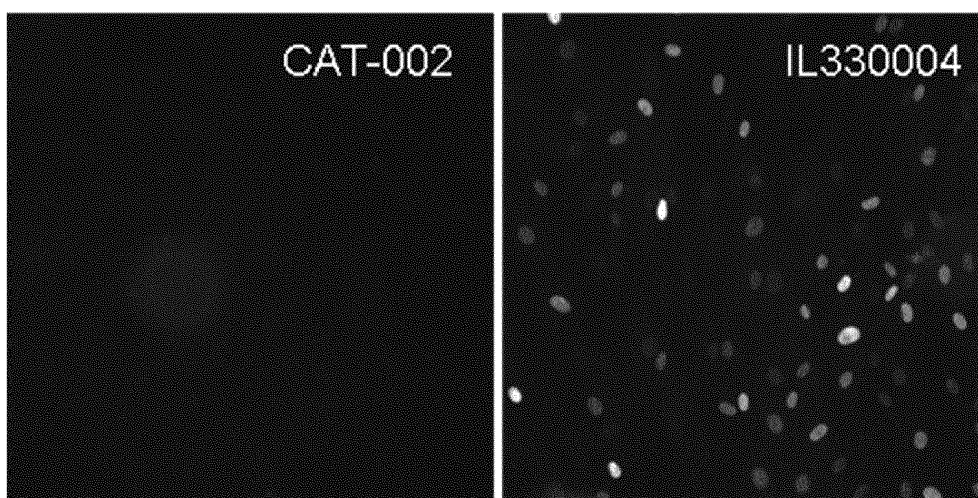


FIGURE 5

Human IL-33

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.059	0.046	0.041	0.042	0.046	0.043	0.045	0.046	0.047	0.056	0.054	1.246
B	0.056	0.042	0.039	0.045	0.046	0.049	0.045	0.047	0.048	0.048	0.043	0.921
C	0.045	0.041	0.041	1.27	0.044	0.044	0.043	0.069	0.044	0.041	0.042	0.044
D	0.051	0.039	0.038	0.039	0.039	0.041	0.04	0.04	0.041	0.04	0.043	0.033
E	0.042	0.039	0.038	0.039	0.039	0.038	0.038	0.039	0.038	0.038	0.042	0.038
F	0.05	0.039	0.038	0.045	0.039	0.039	0.04	0.041	0.039	0.039	0.263	0.035
G	0.037	0.04	0.04	0.04	0.04	0.039	0.04	0.043	0.04	0.042	0.052	0.037
H	0.051	0.052	0.046	0.053	0.049	0.048	0.048	0.051	0.041	0.05	0.07	0.04

Cyno IL-33 FH

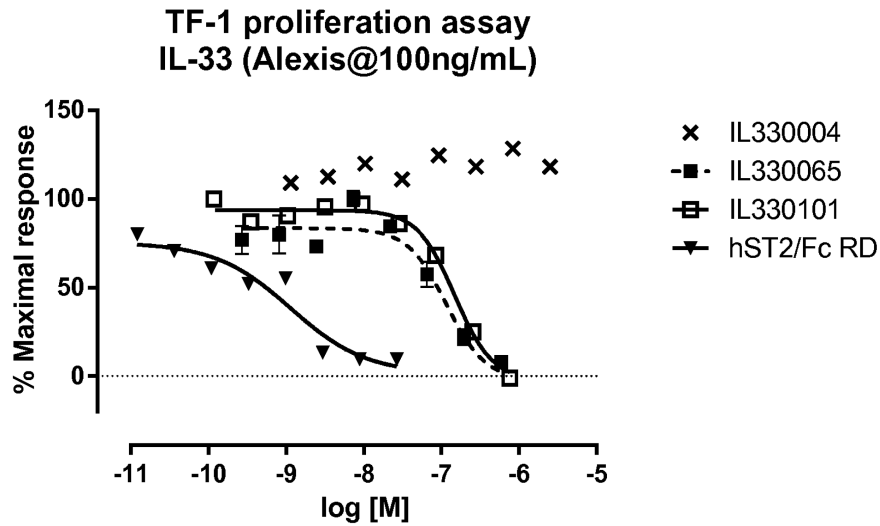
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.072	0.059	0.061	0.081	0.048	0.041	0.038	0.041	0.044	0.041	0.044	0.148
B	0.072	0.094	0.071	0.055	0.053	0.046	0.057	0.042	0.045	0.041	0.041	0.115
C	0.074	0.098	0.076	1.193	0.08	0.042	0.041	0.066	0.1	0.062	0.045	0.064
D	0.054	0.06	0.061	0.051	0.048	0.043	0.05	0.056	0.06	0.052	0.043	0.067
E	0.087	0.067	0.059	0.065	0.045	0.063	0.095	0.039	0.073	0.043	0.061	0.072
F	0.072	0.065	0.085	0.064	0.065	0.058	0.058	0.075	0.05	0.057	0.276	0.058
G	0.068	0.054	0.074	0.065	0.049	0.045	0.052	0.042	0.059	0.04	0.073	0.092
H	0.117	0.065	0.064	0.057	0.058	0.069	0.063	0.059	0.06	0.061	0.058	0.056

Insulin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.069	0.043	0.056	0.046	0.057	0.046	0.045	0.055	0.084	0.093	0.073	0.087
B	0.076	0.044	0.046	0.06	0.07	0.05	0.064	0.053	0.07	0.062	0.07	0.055
C	0.071	0.079	0.074	0.052	0.058	0.059	0.066	0.059	0.079	0.062	0.065	0.056
D	0.069	0.075	0.074	0.072	0.067	0.061	0.058	0.07	0.048	0.064	0.04	0.049
E	0.049	0.072	0.058	0.065	0.065	0.064	0.054	0.061	0.046	0.089	0.039	0.051
F	0.1	0.058	0.06	0.052	0.065	0.061	0.076	0.069	0.057	0.043	0.375	0.061
G	0.069	0.076	0.06	0.076	0.048	0.048	0.058	0.059	0.053	0.064	0.086	0.058
H	0.099	0.089	0.105	0.099	0.056	0.081	0.093	0.087	0.089	0.071	0.074	0.08

FIGURE 6

A



B

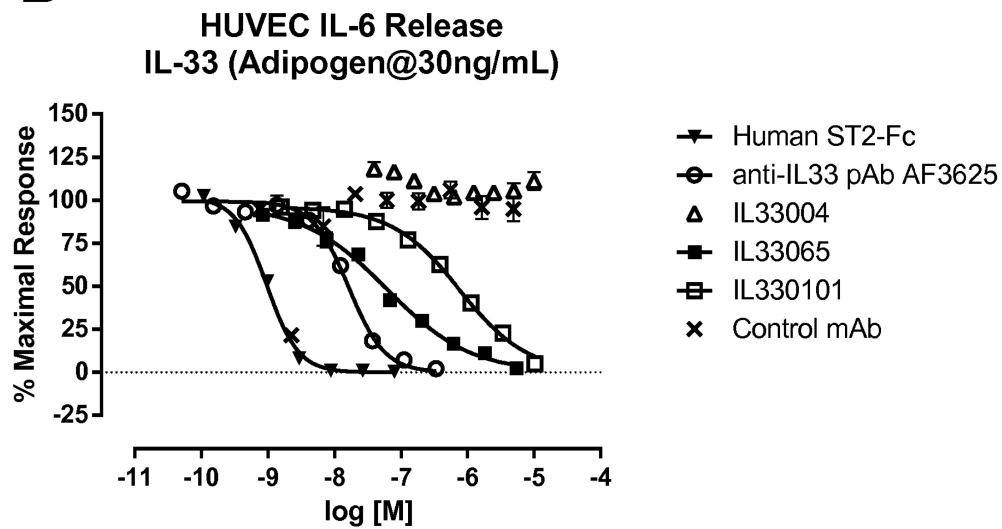


FIGURE 7

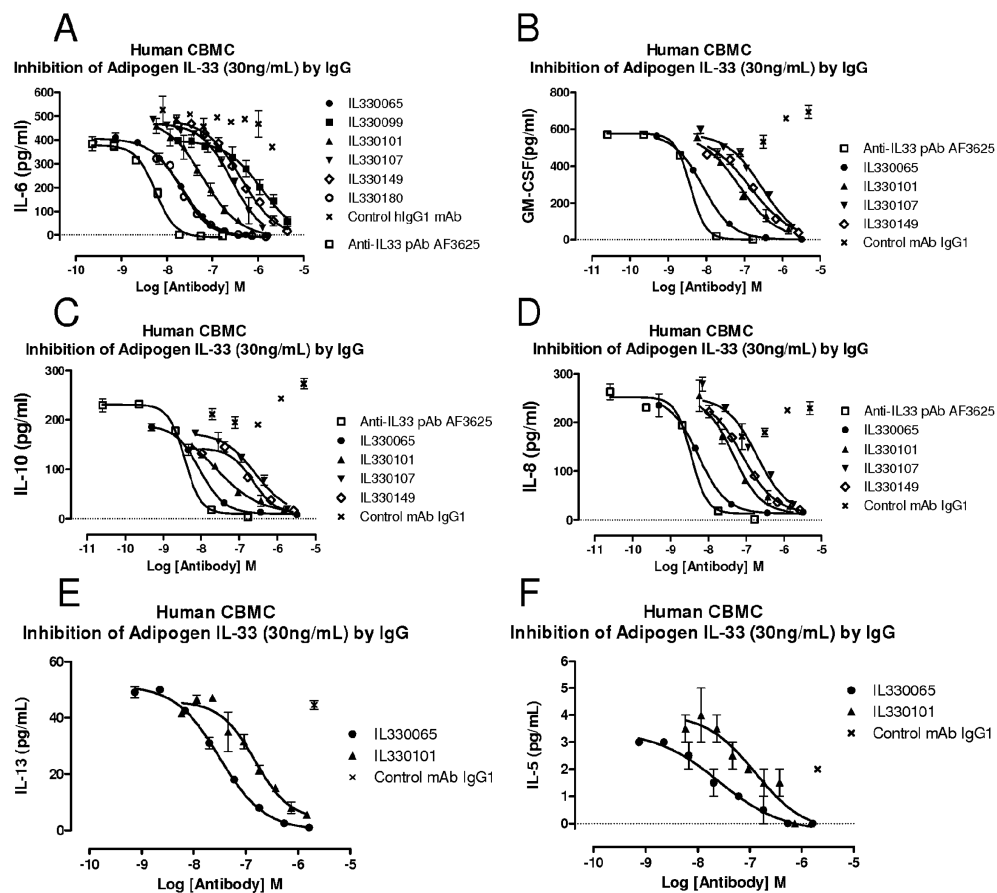
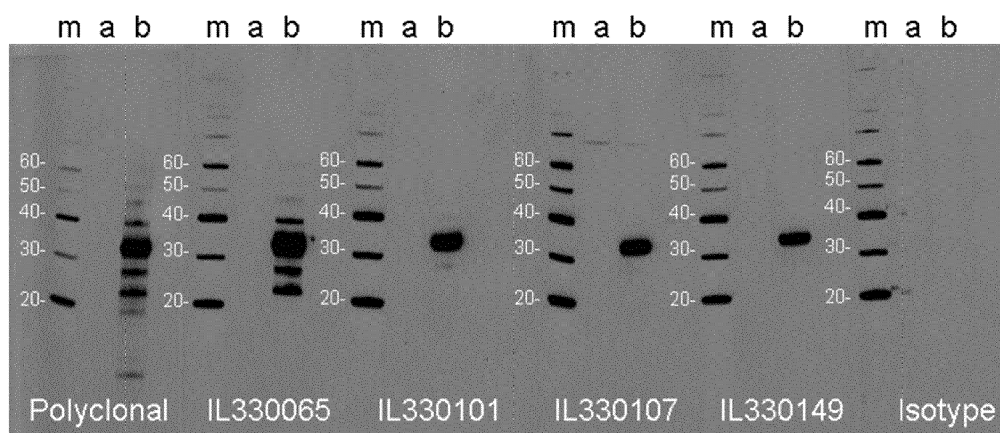


FIGURE 8



m = magic mark XP
a = mock transfected HEK-EBNA
b = FL HuIL33 transfected HEK-EBNA

FL HuIL33 predicted MW = 30kDa
Caspase3 cleaved IL33 predicted 10kDa and 20kDa fragments

FIGURE 9

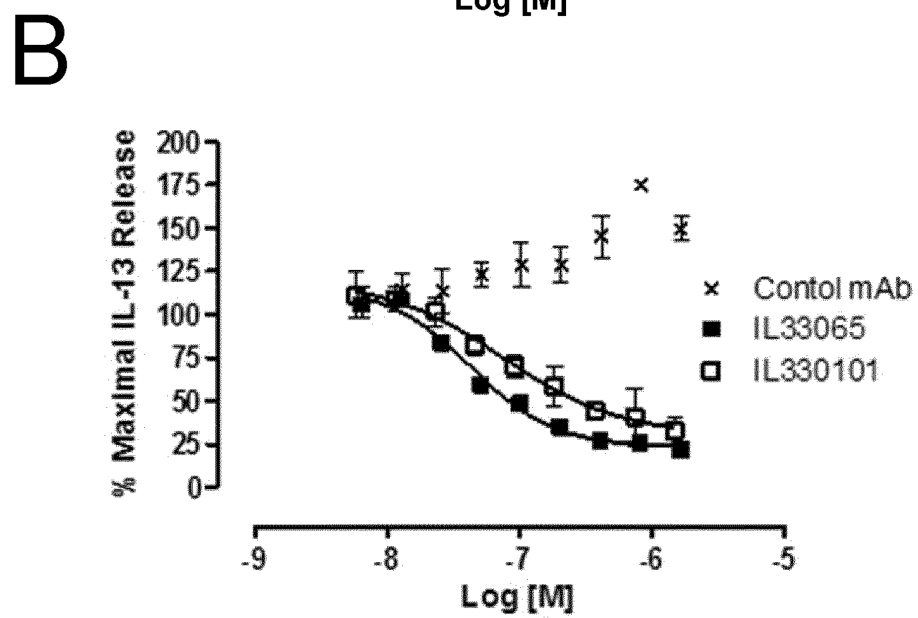
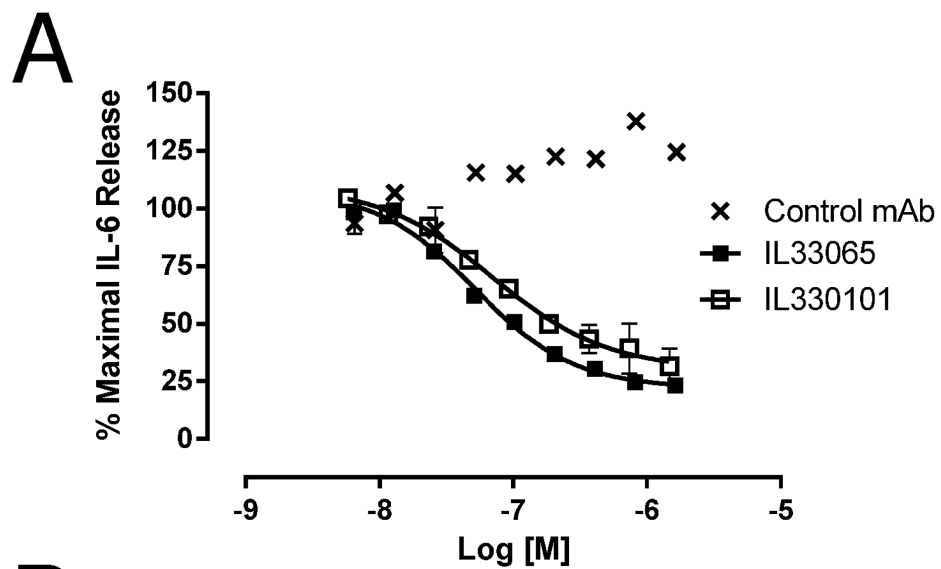


FIGURE 10

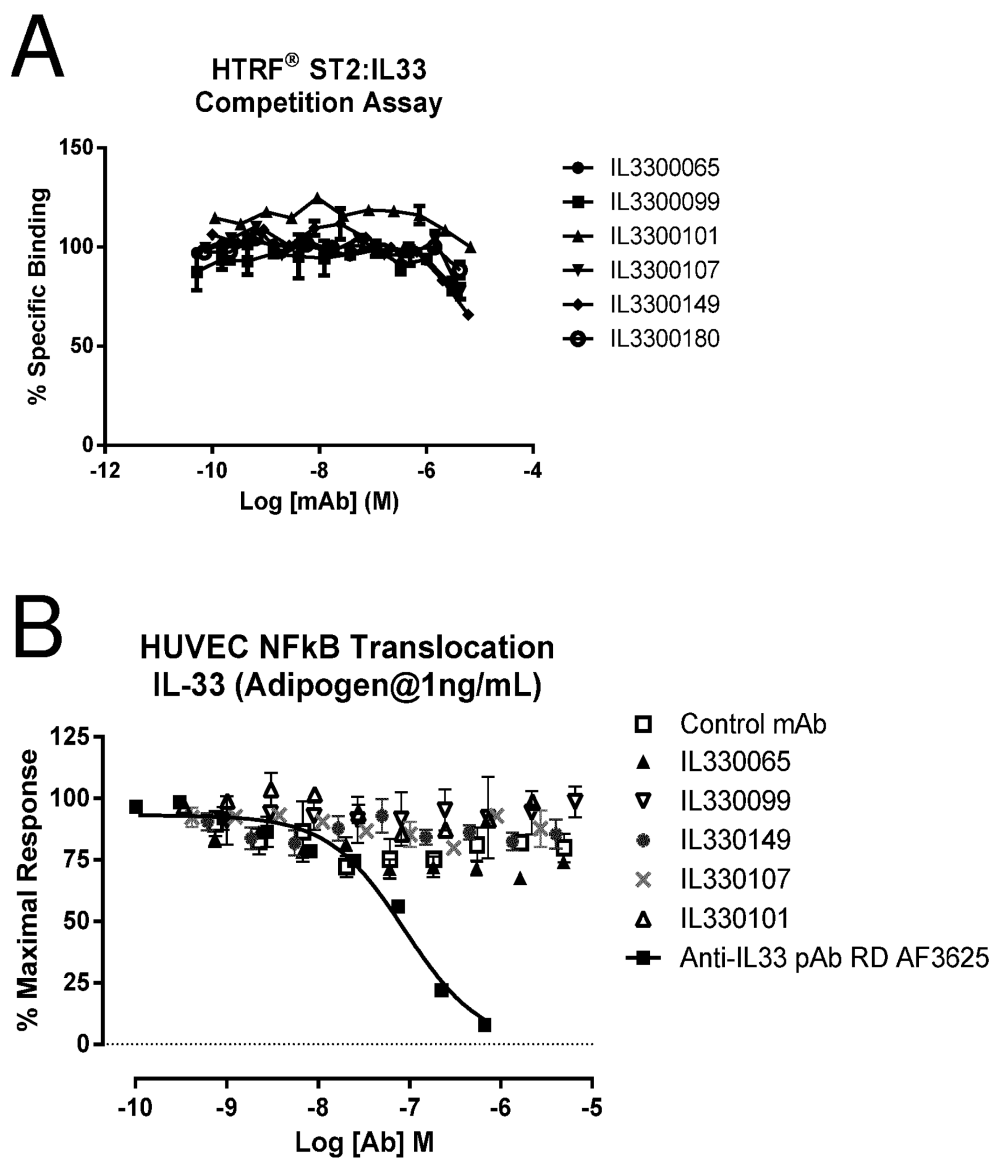


FIGURE 11

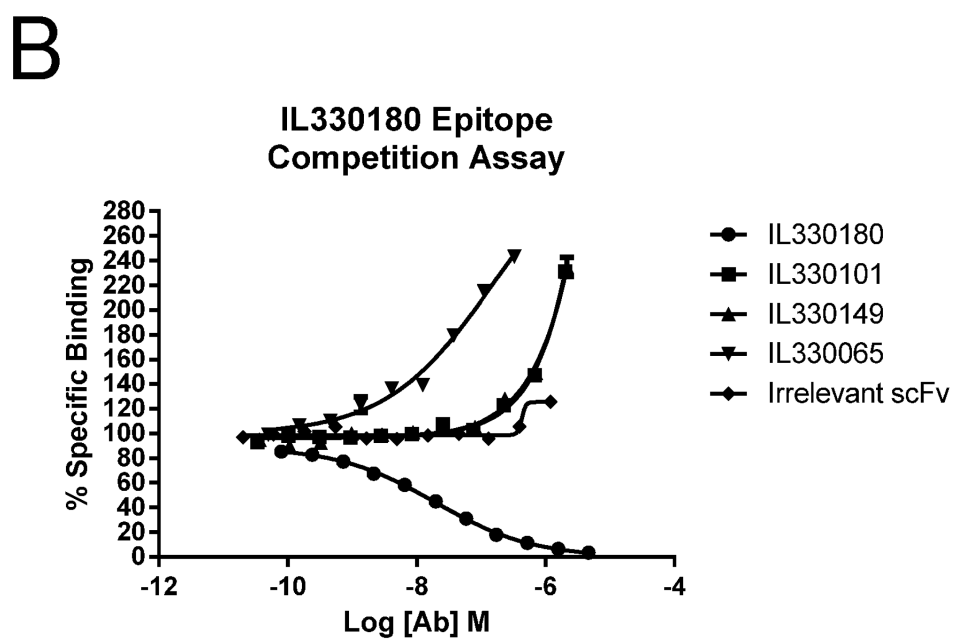
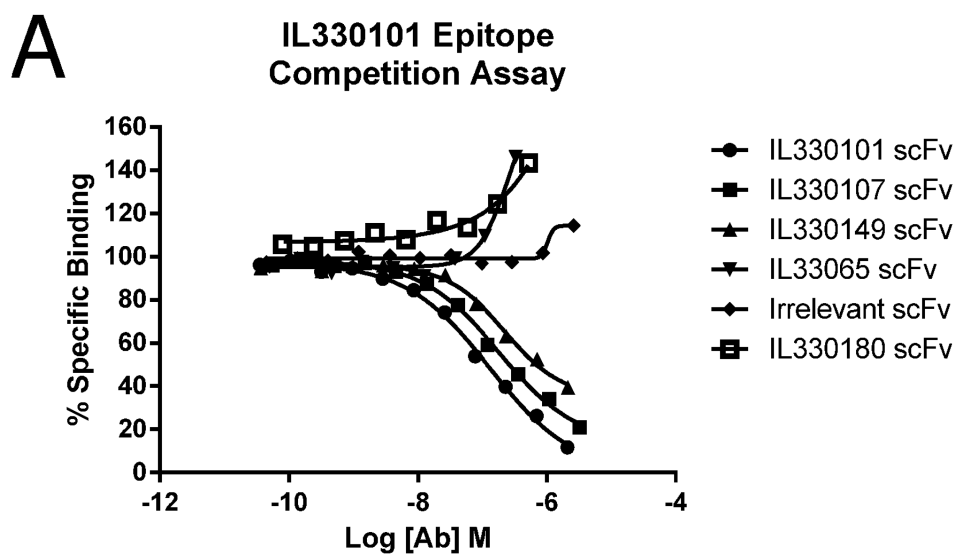


FIGURE 12

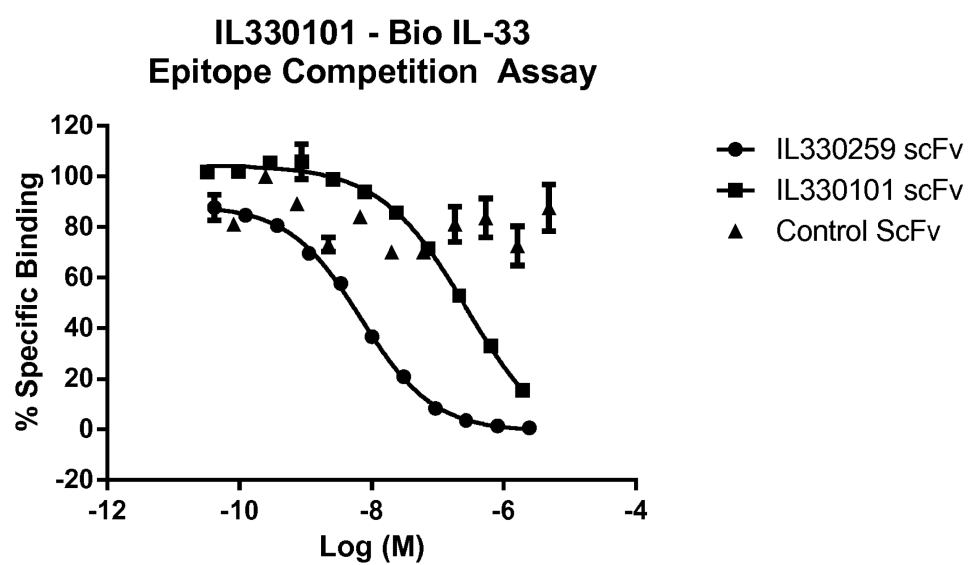


FIGURE 13

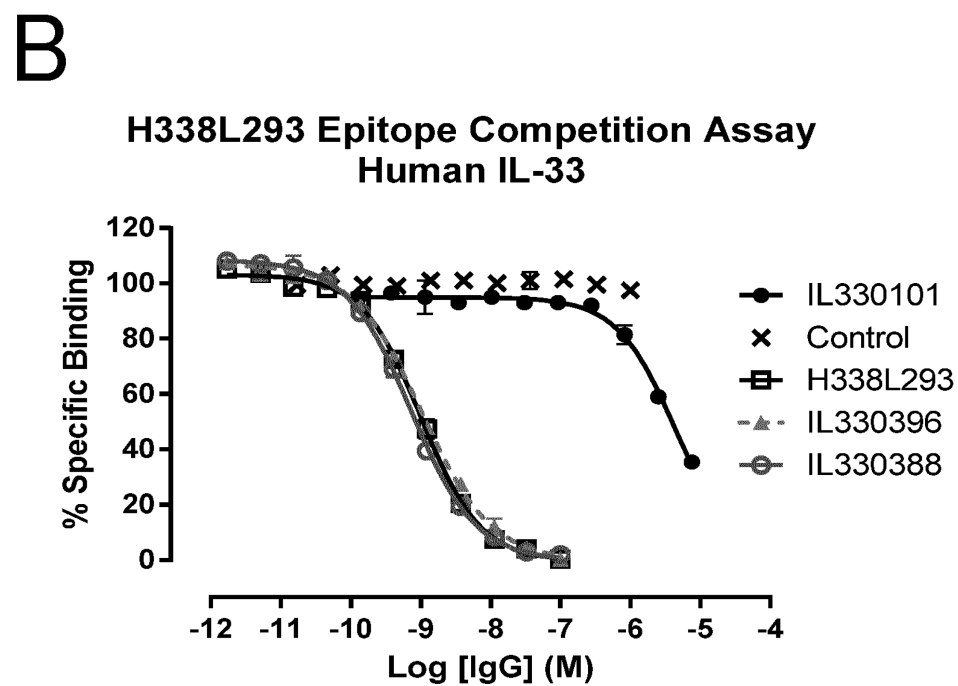
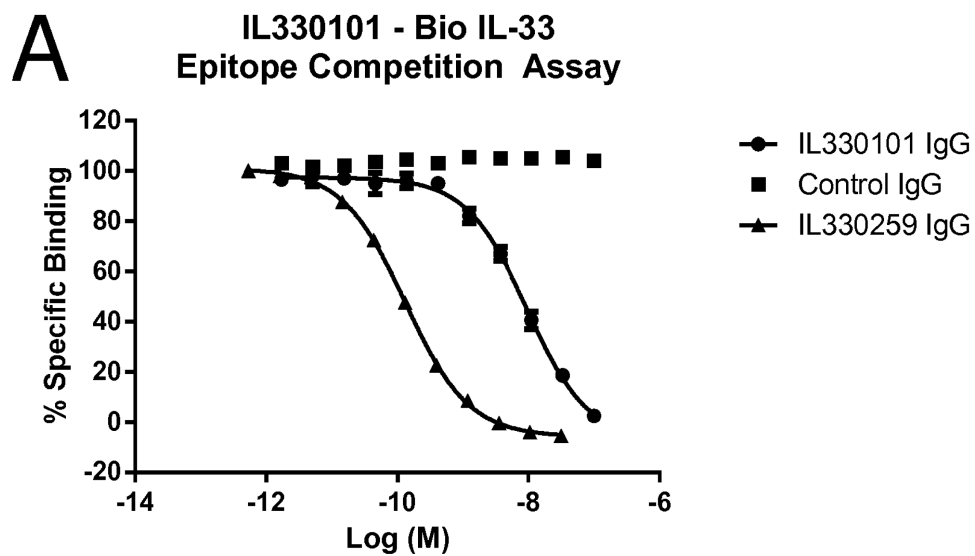


FIGURE 14

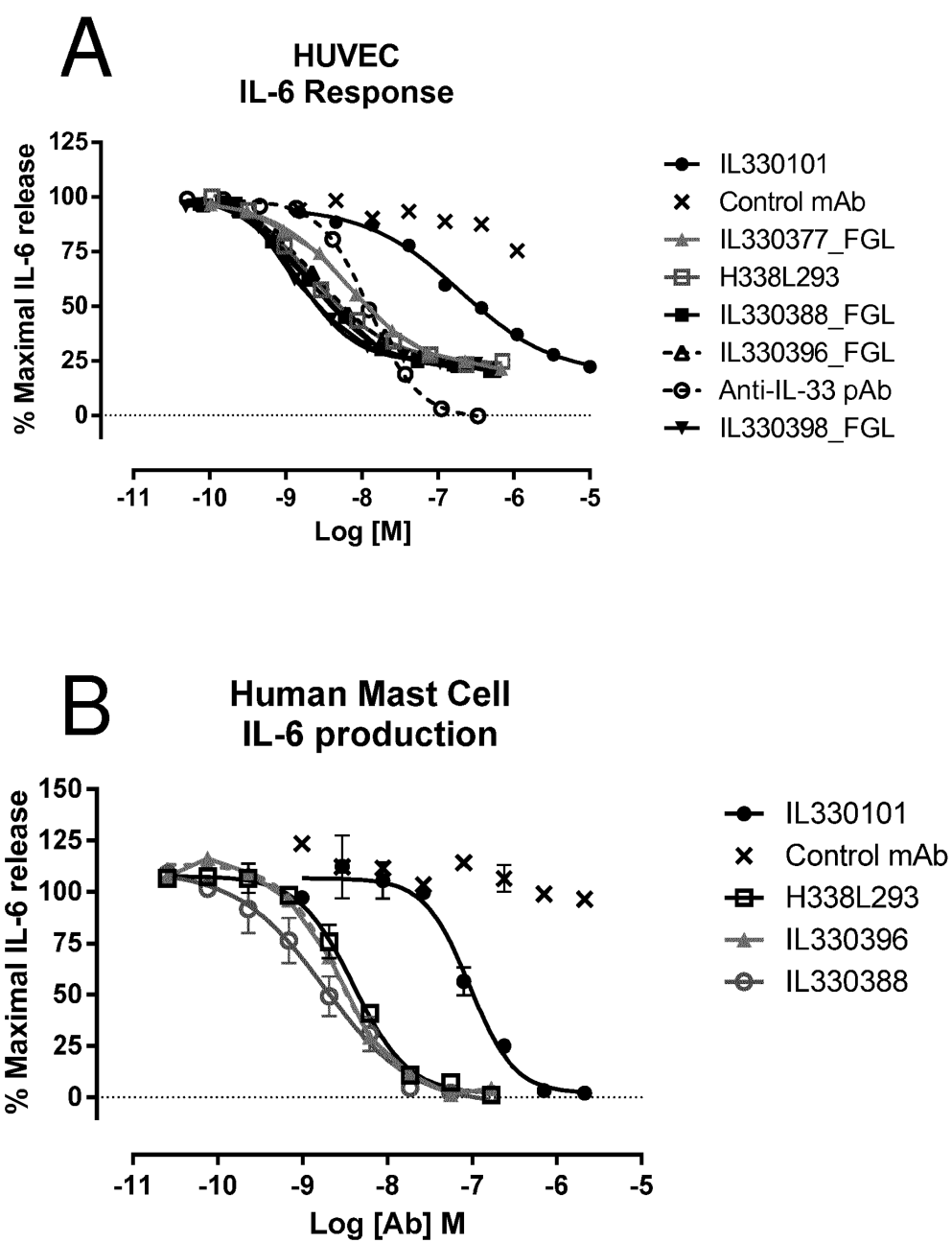


FIGURE 15

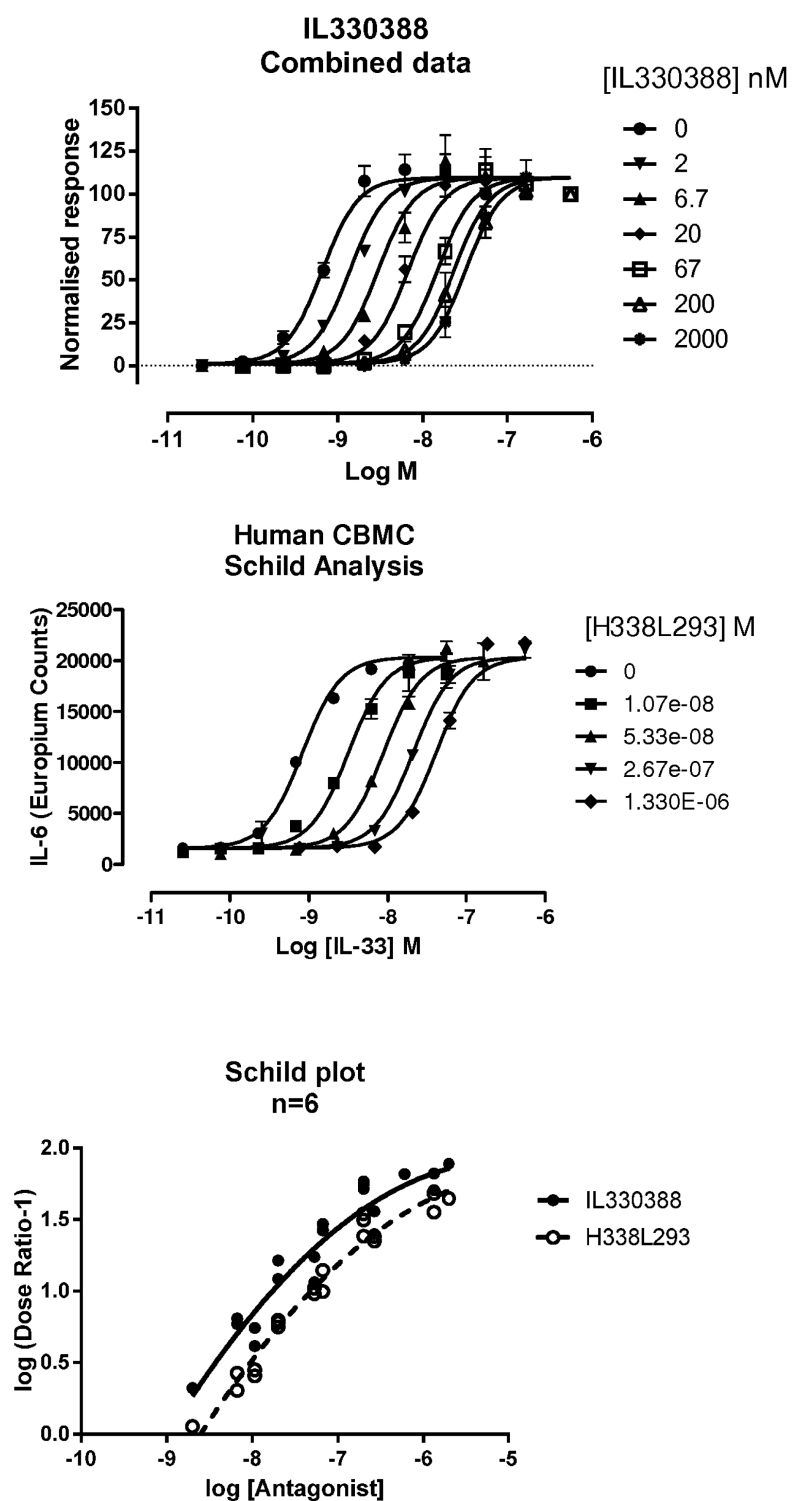


FIGURE 16

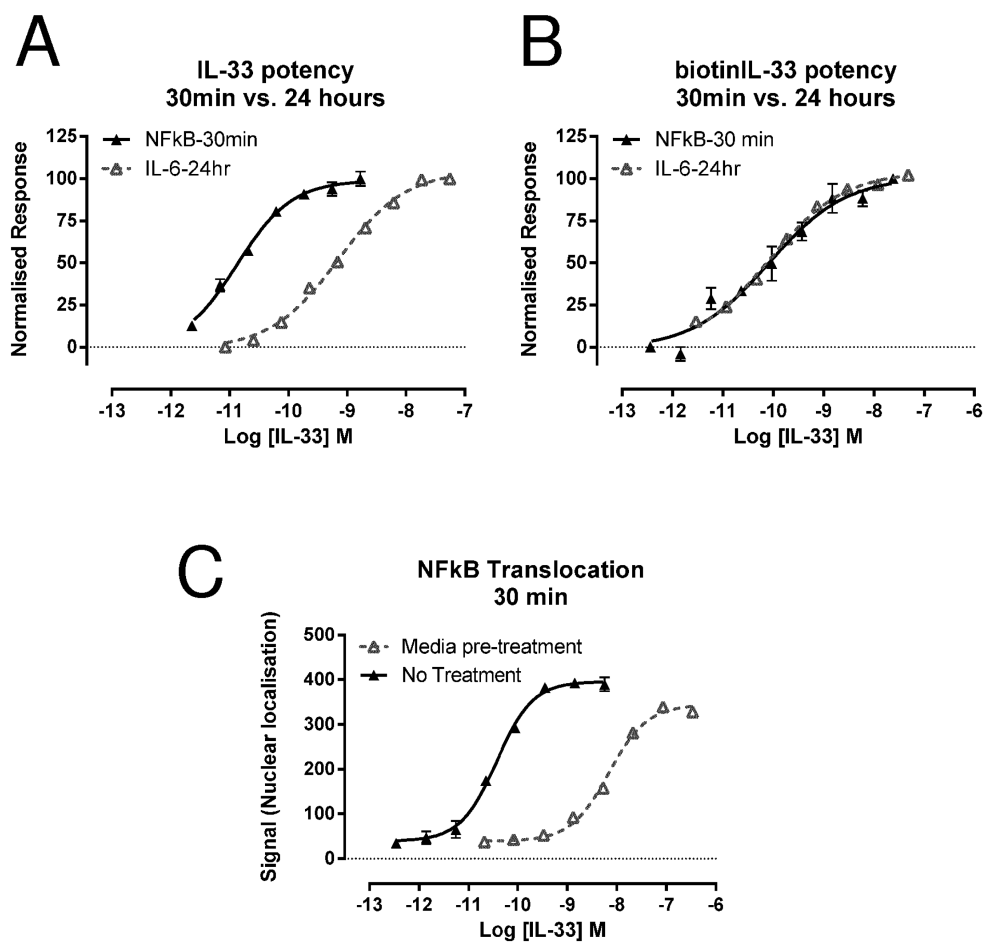


FIGURE 17

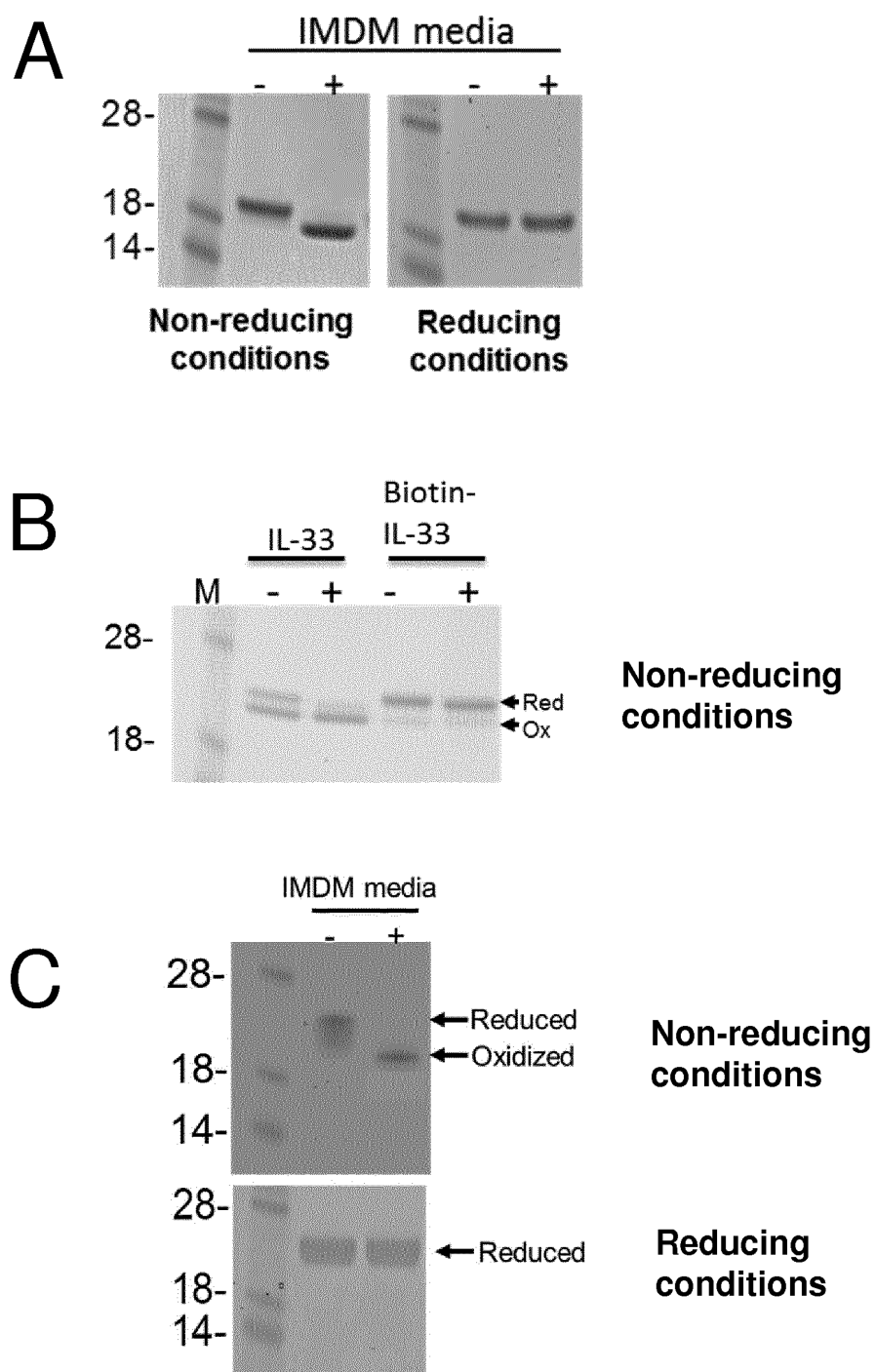


FIGURE 18

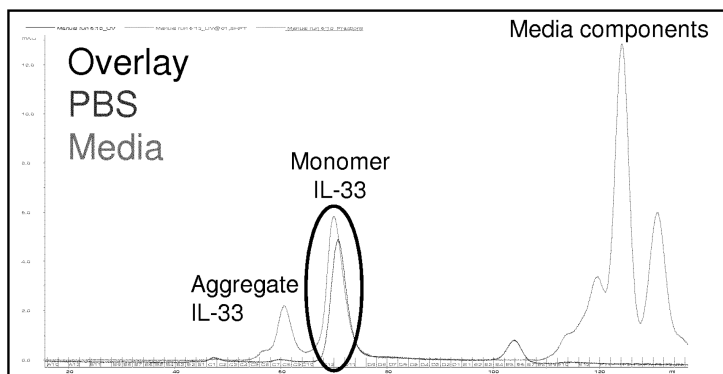
Preparation of oxidised IL-33 for mass-spec analysis

Untagged IL-33 (BK349)

18 hour incubation of IL-33 (300ug/ml) in 60% IMDM or PBS
(37°C, 5% CO₂)



SEC of alternative IL-33 preps



Mass spectrometry analysis

FIGURE 19

Mass Spec analysis – intact mass

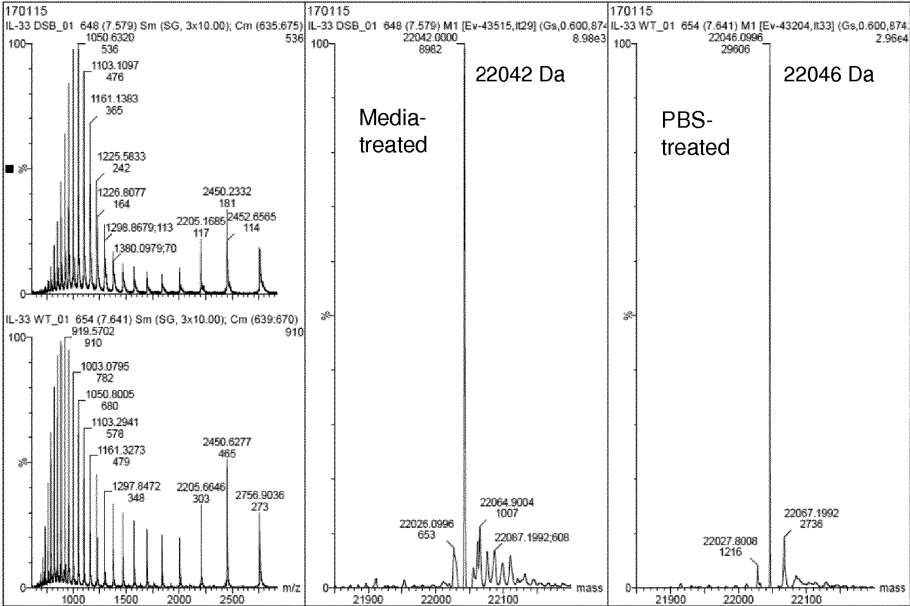


FIGURE 20

FIG. 21A

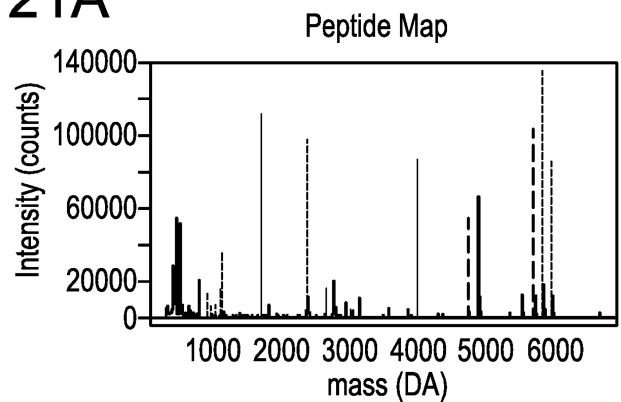


FIG. 21B

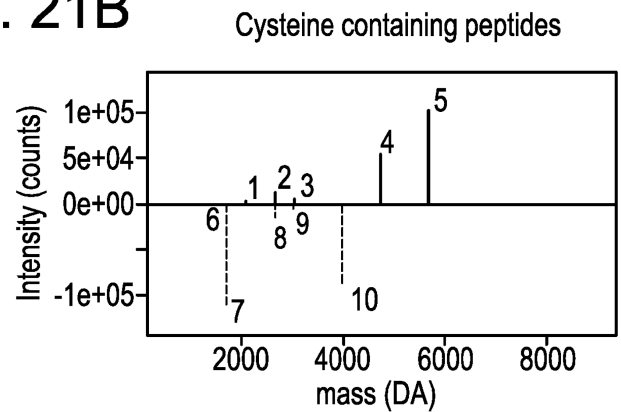


FIG. 21C

Peptides	Sequence	Cys oxidation status
	Non-reduced Lys-C peptide map	
1	C ²⁰⁸ EK--VDSSENI C ²⁵⁹ TENILFK	SS
2	PLPDQAFFVLHNMHSN C ²²⁷ VSFE C ²³² K	SS
3	[EHSVELHK][C ²⁰⁸ EK]--VDSSENI C ²⁵⁹ TENILFK	SS
4	[C ²⁰⁸ EK][PLPDQAFFVLHNMHSN C ²²⁷ VSFE C ²³² K]--VDSSENI C ²⁵⁹ TENILFK	SS
5	[EHSVELHK][C ²⁰⁸ EK][PLPDQAFFVLHNMHSN C ²²⁷ VSFE C ²³² K]--VDSSENI C ²⁵⁹ TENILFK	SS
Reduced Lys-C peptide map		
6	[EHSVELHK][C ²⁰⁸ EK]	SH
7	VDSSENI C ²⁵⁹ TENILFK	SH
8	PLPDQAFFVLHNMHSN C ²²⁷ VSFE C ²³² K	SH
9	[C ²⁰⁸ EK][PLPDQAFFVLHNMHSN C ²²⁷ VSFE C ²³² K]	SH
10	[EHSVELHK][C ²⁰⁸ EK][PLPDQAFFVLHNMHSN C ²²⁷ VSFE C ²³² K]	SH

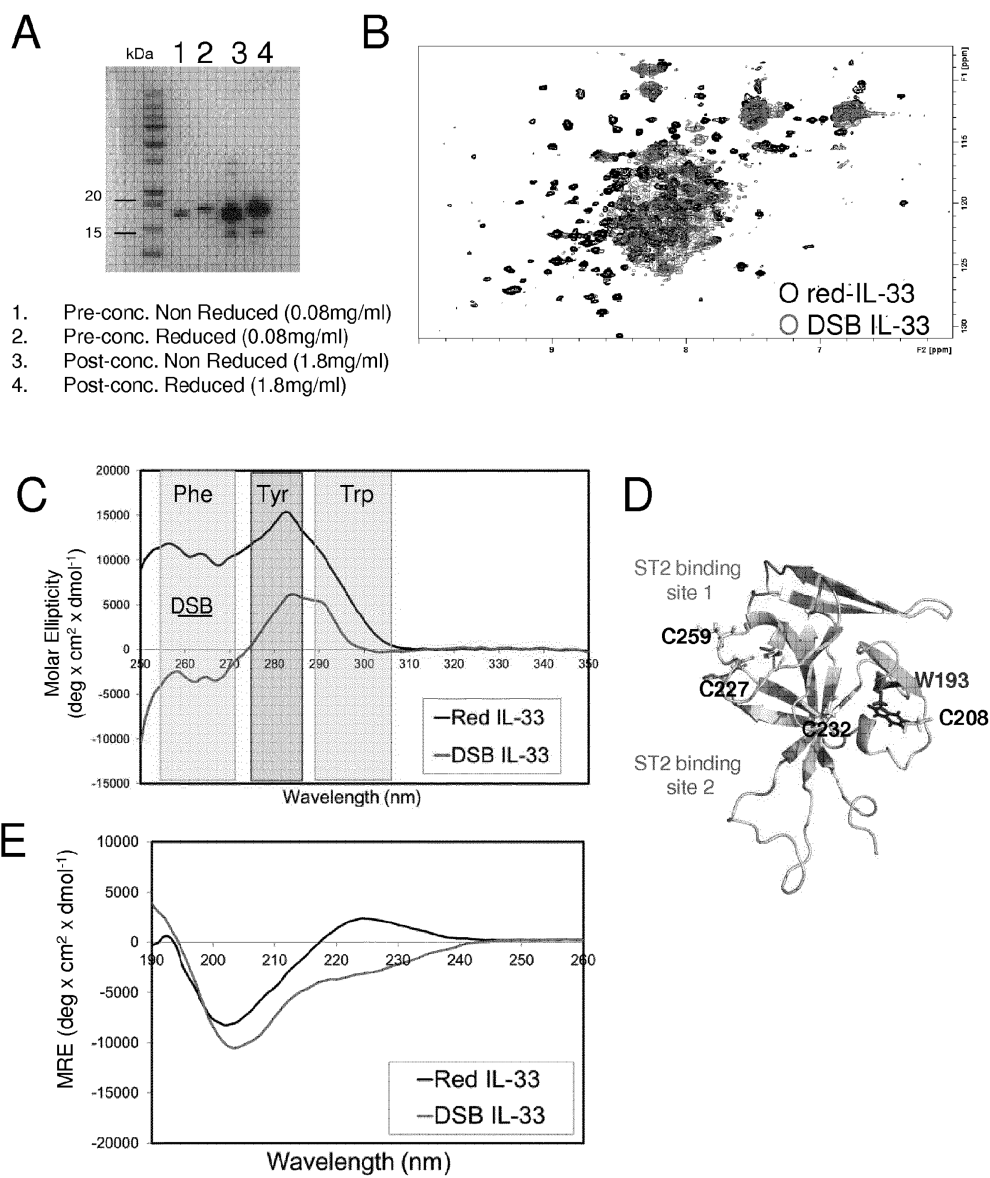


FIGURE 22

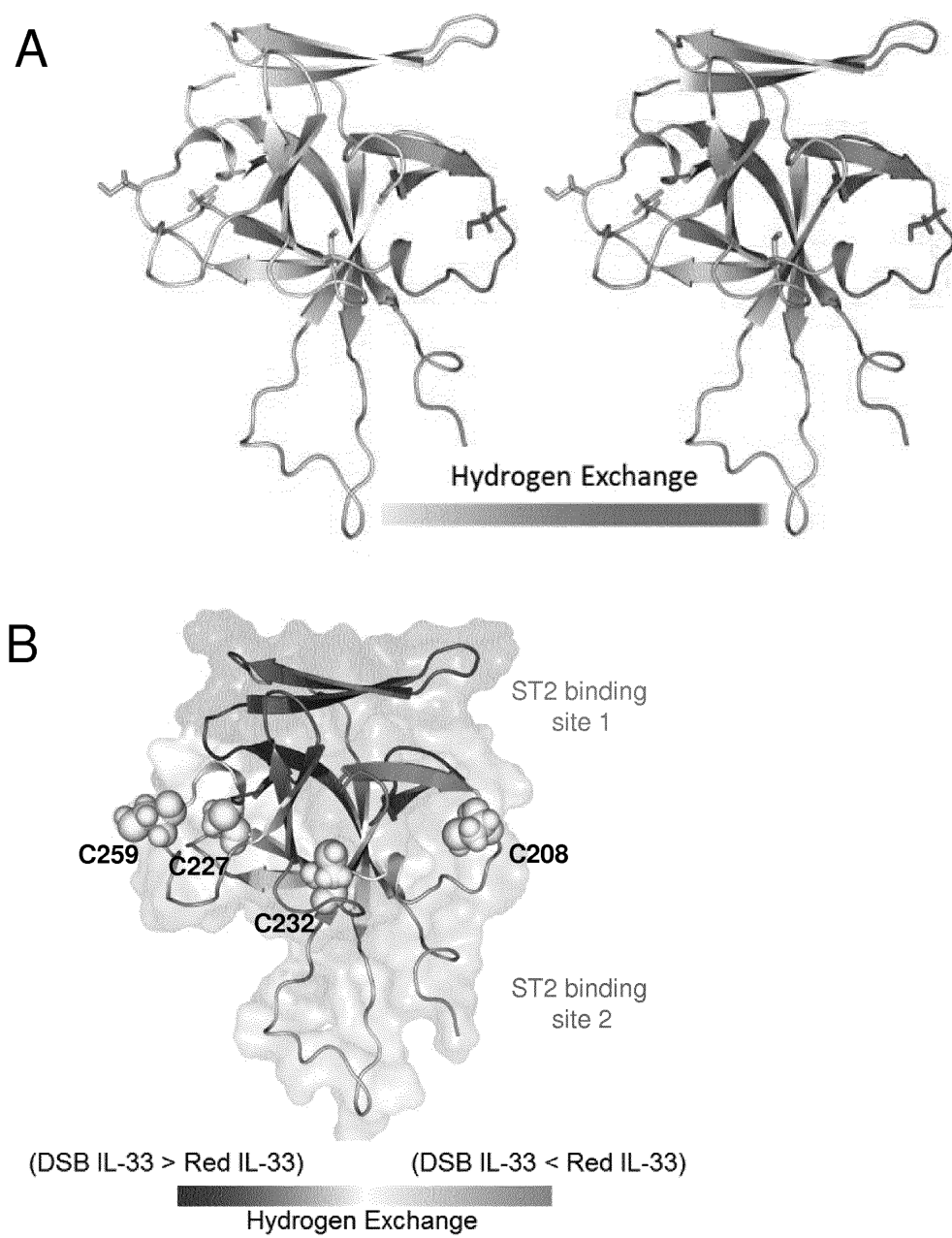
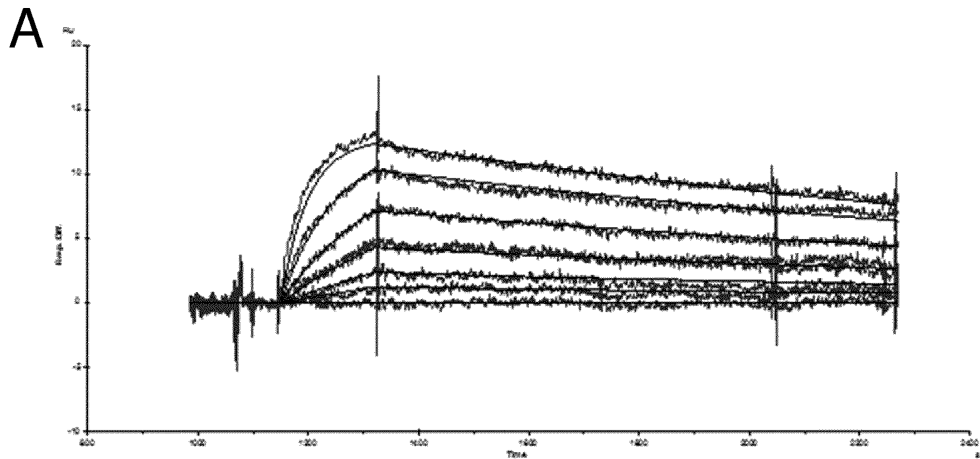


FIGURE 23

Reduced IL33 binding to ST2

Sensorgrams from 7.8nM to 0.24nM are shown giving a K_D of 0.2nM,



B DSB IL33 binding to ST2
Sensorgrams from 500nM to 0.24nM with no obvious binding

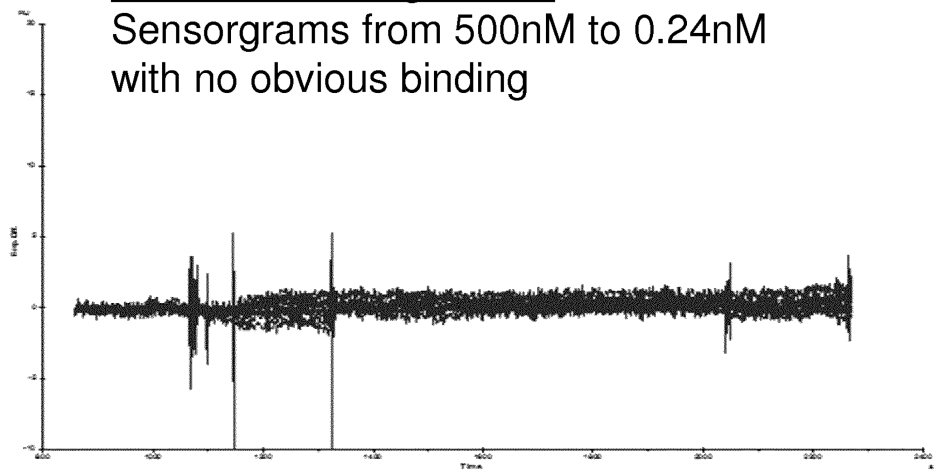
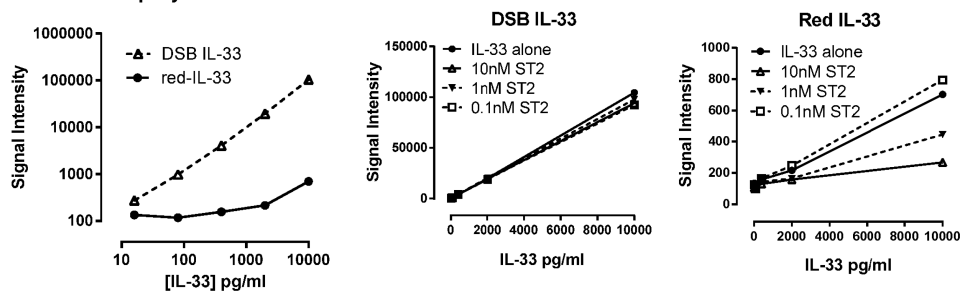
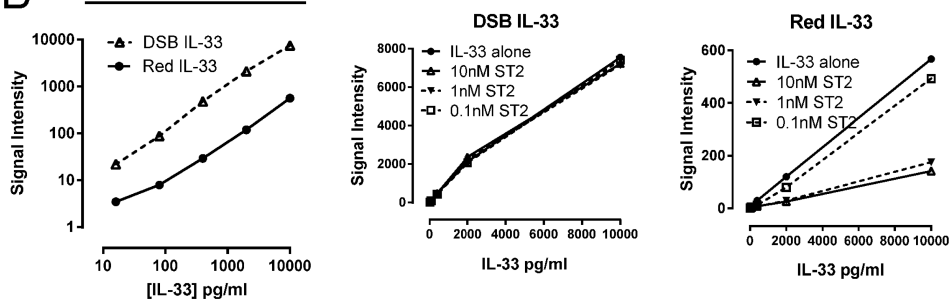


FIGURE 24

A RnD Systems – human IL-33
Goat polyclonal capture
Goat polyclonal detection



B Luminex-human IL-33



C RnD Systems – mouse IL-33
Goat polyclonal capture
Goat polyclonal detection

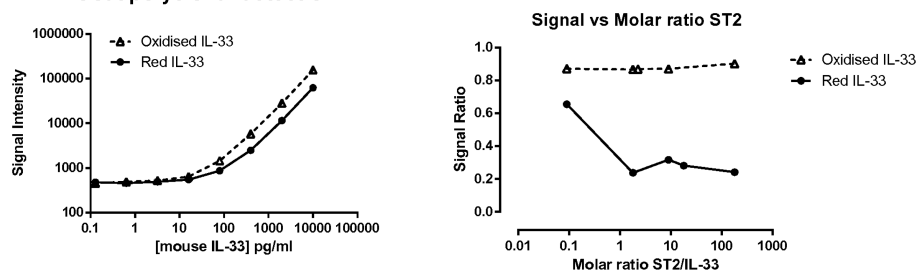


FIGURE 25

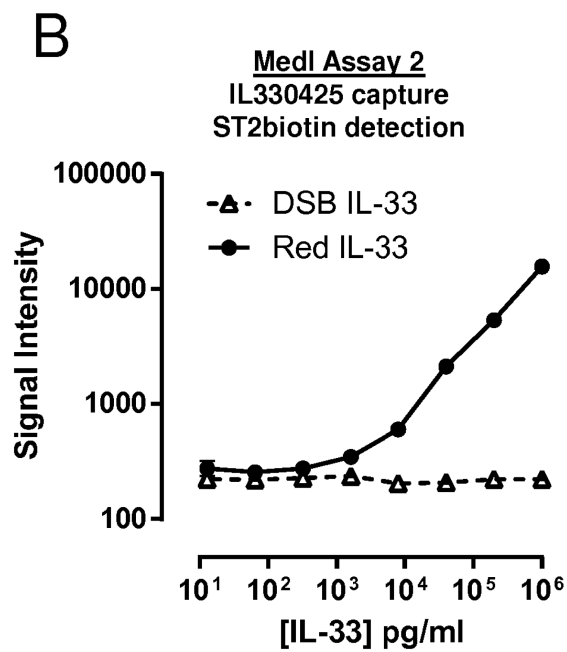
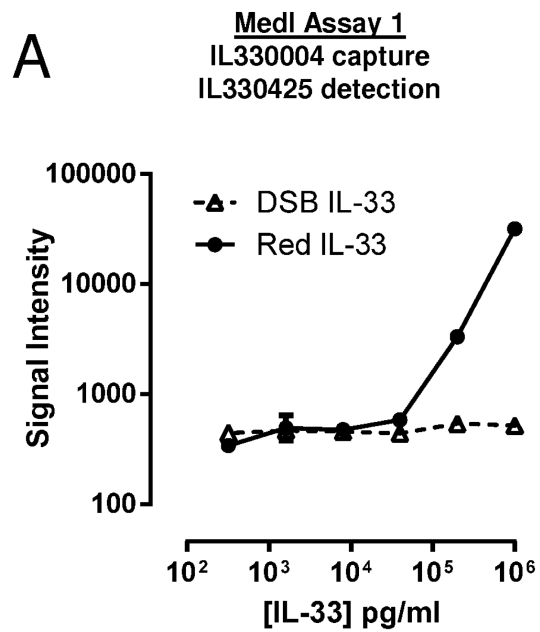


FIGURE 26

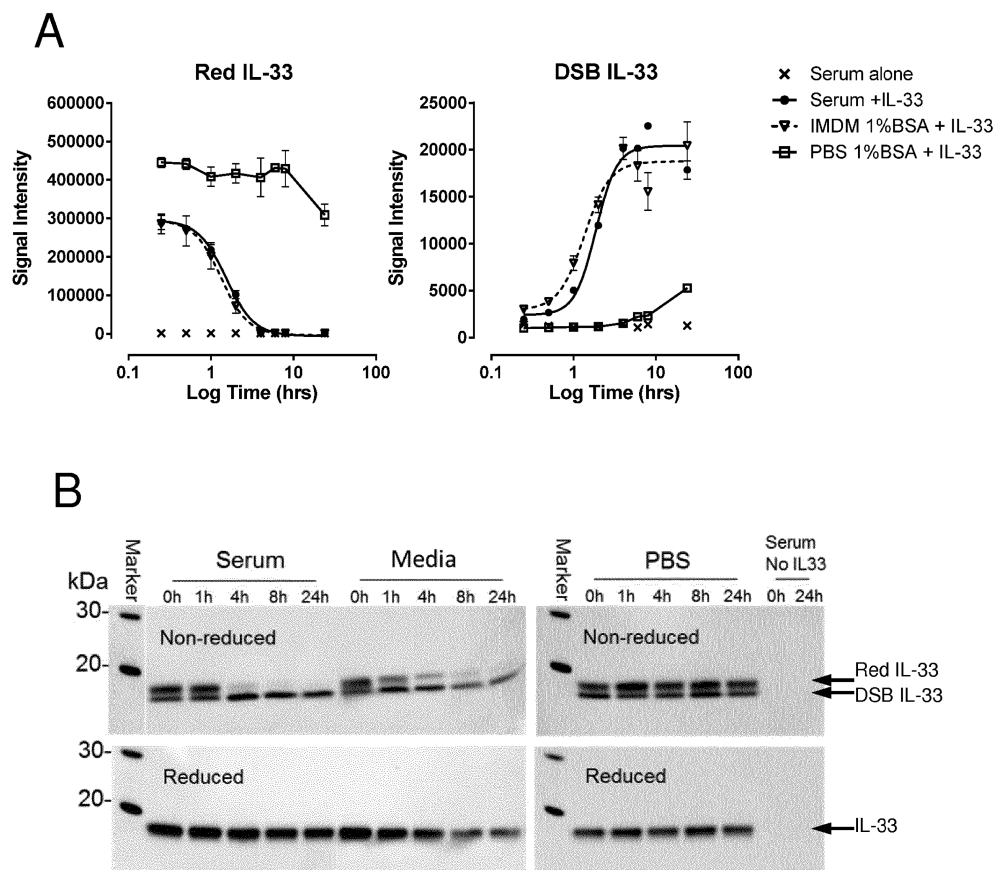
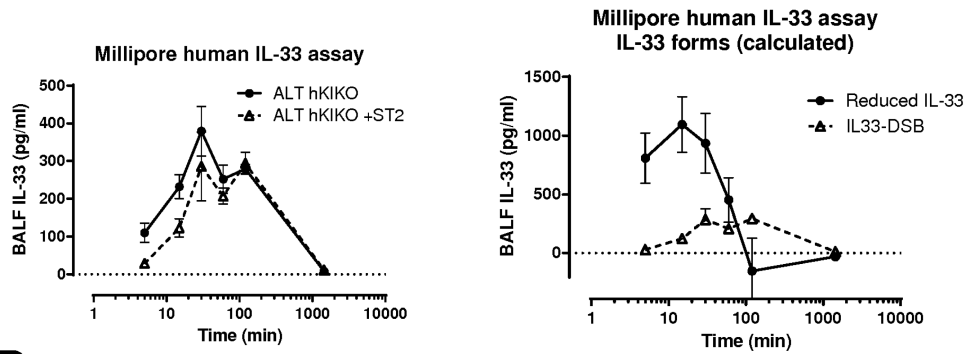
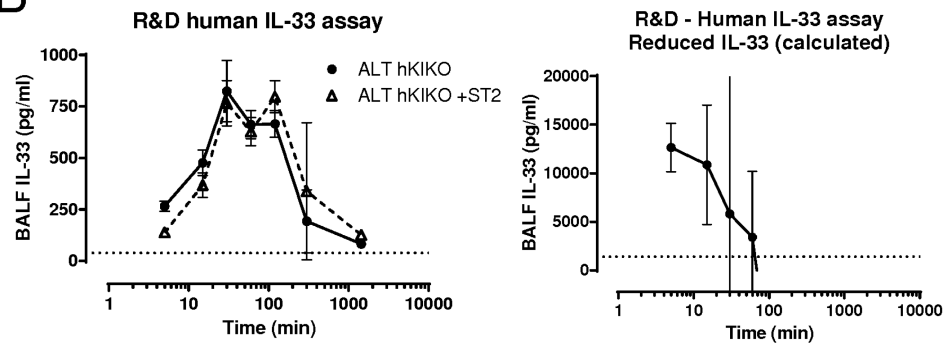


FIGURE 27

A



B



C

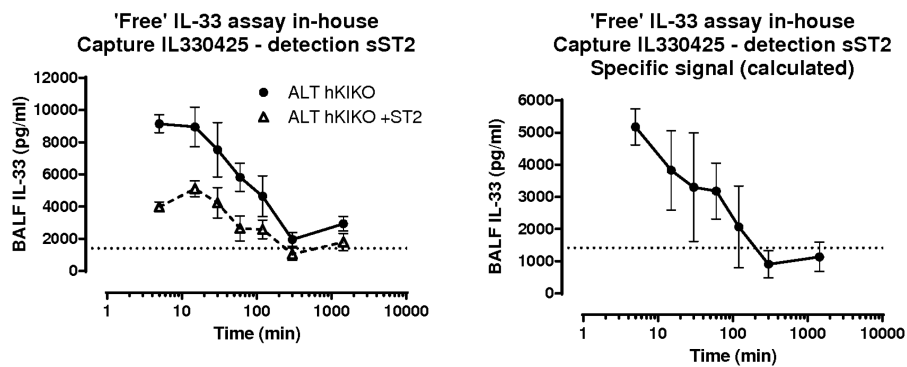


FIGURE 28

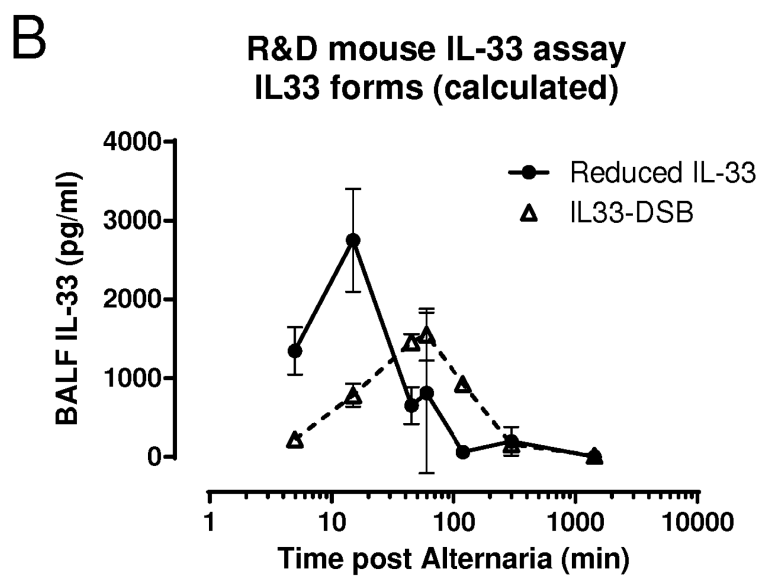
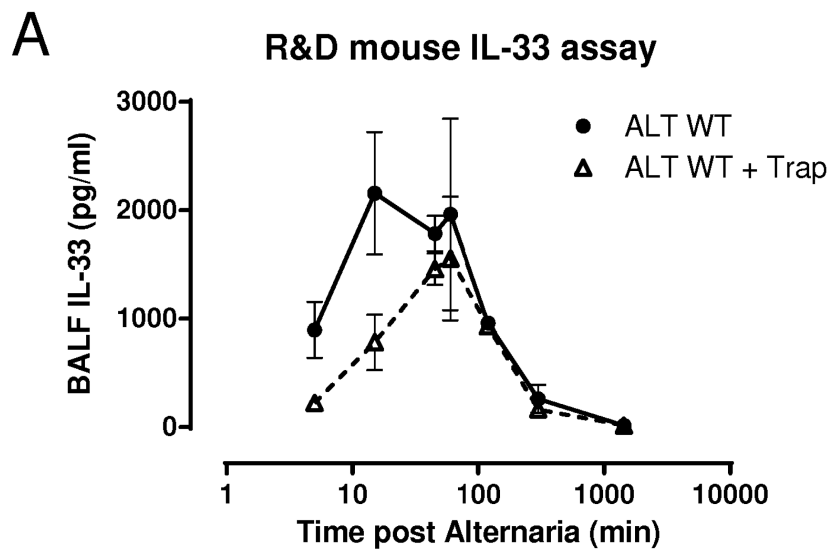


FIGURE 29

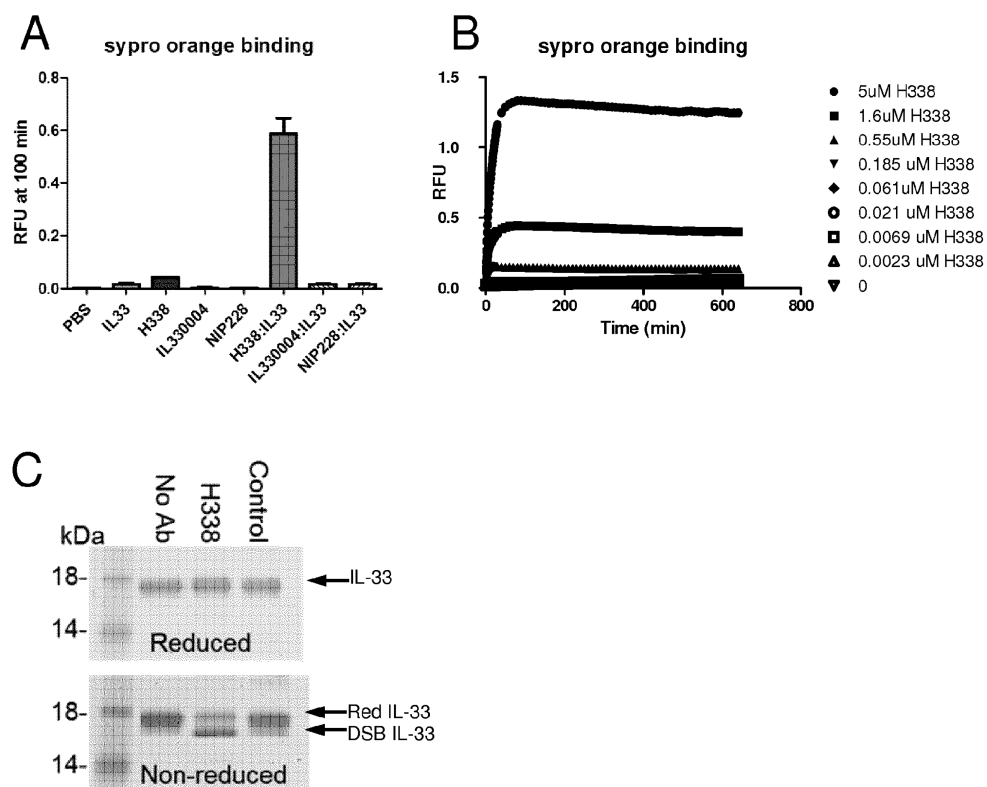


FIGURE 30

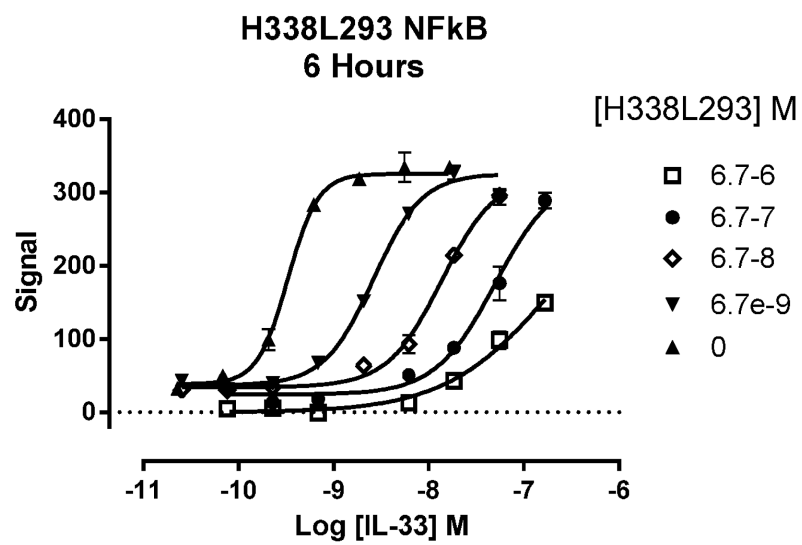
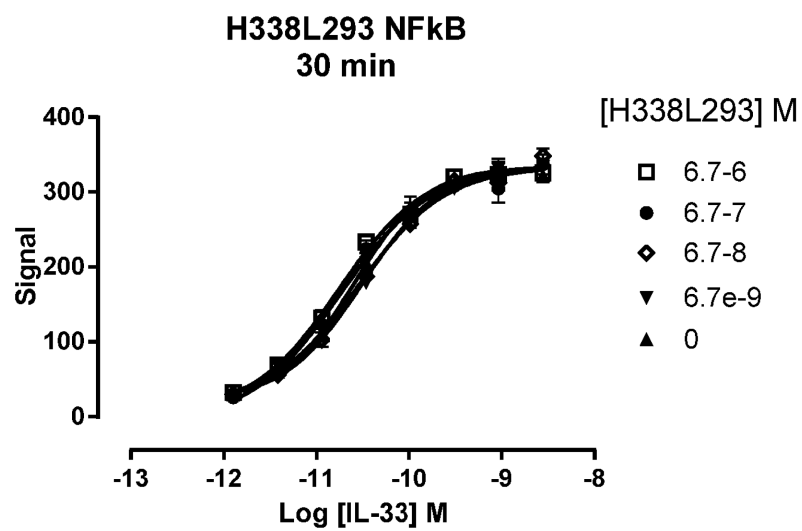
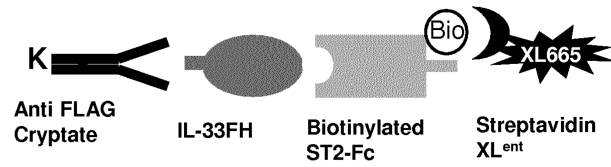
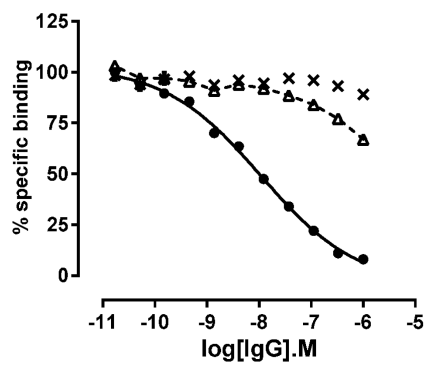


FIGURE 31

IL33-ST2 Binding Assay



Competition



IL-33:mAb pre-incubation

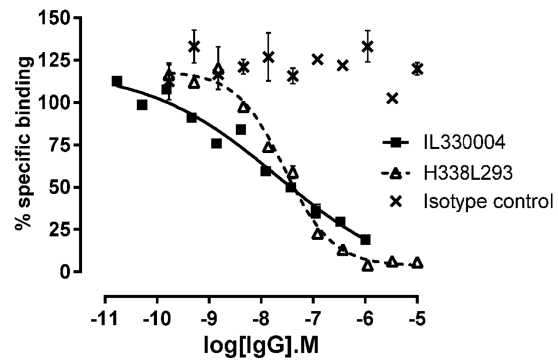
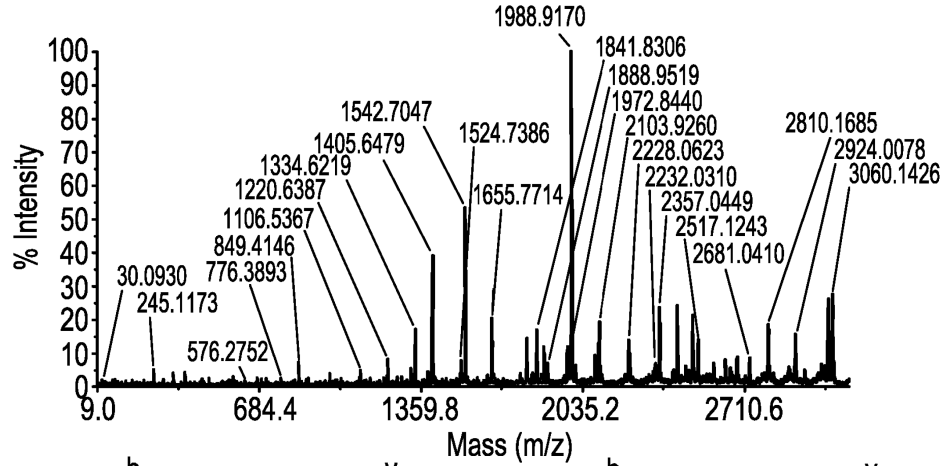


FIGURE 32

FIG. 33A

MALDI-TOF MS-MS fragmentation analysis of 3,206 Da precursor ion

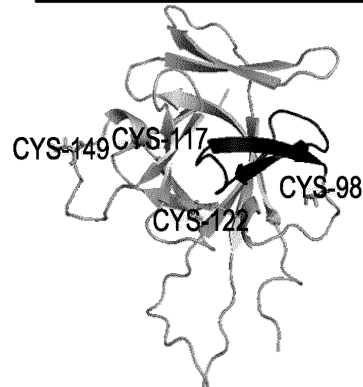
MLMVTLSPTKDFWLHANNKEHSVELHK



b			v		b		v
1	M	27					
245.1318	2	L	26	3074.5880	1800.9175	15	H
376.1723	3	M	25	2961.5040	1871.9547	16	A
475.2407	4	V	24	2830.4635	1985.9976	17	N
576.2884	5	T	23	2731.3951	2100.0405	18	N
689.3725	6	L	22	2630.3474	2228.1355	19	K
776.4045	7	S	21	2517.2633	2357.1781	20	E
873.4573	8	P	20	2430.2313	2494.2370	21	H
974.5049	9	T	19	2333.1785	2581.2690	22	S
1102.5999	10	K	18	2232.1309	2680.3374	23	V
1217.6268	11	D	17	2104.0359	2809.3800	24	E
1364.6953	12	F	16	1989.0090	2922.4641	25	L
1550.7746	13	W	15	1841.9405	3059.5230	26	H
1663.8586	14	L	14	1655.8612	---	27	K

FIG. 33B

LSPTKDFWLHANNKEHSVELHK



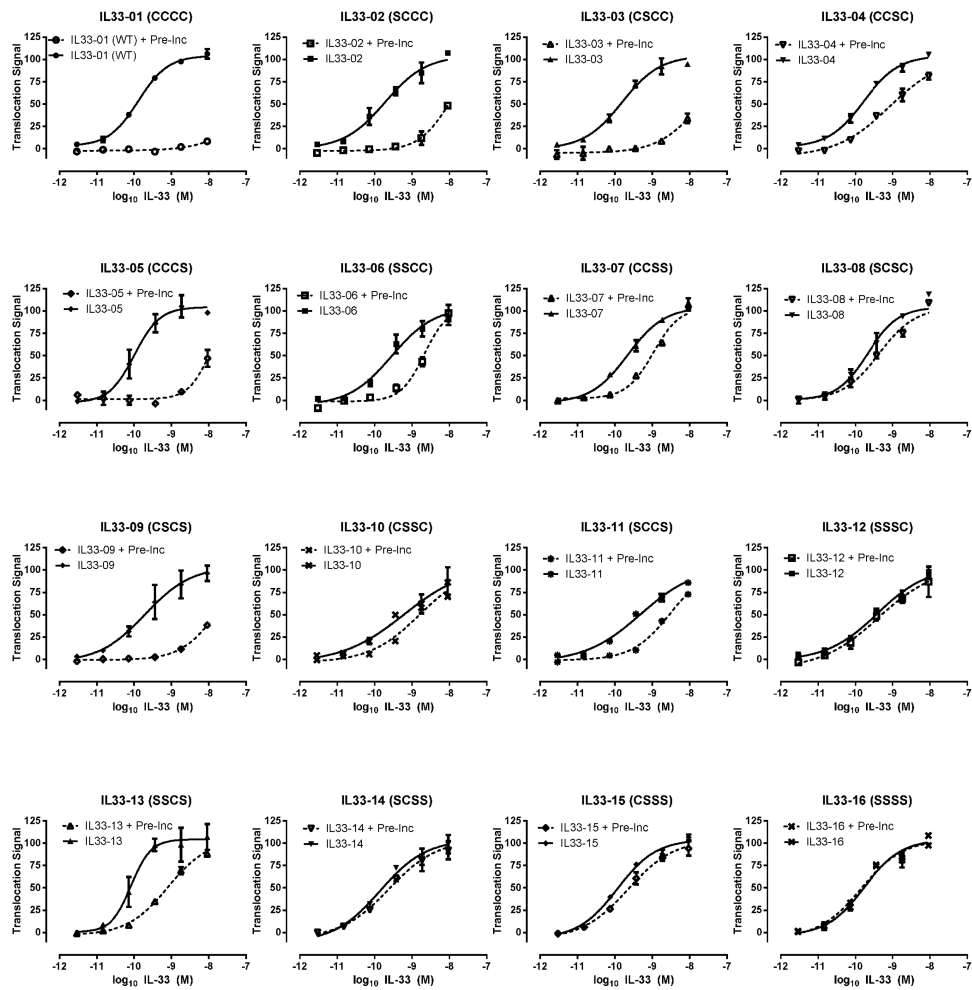
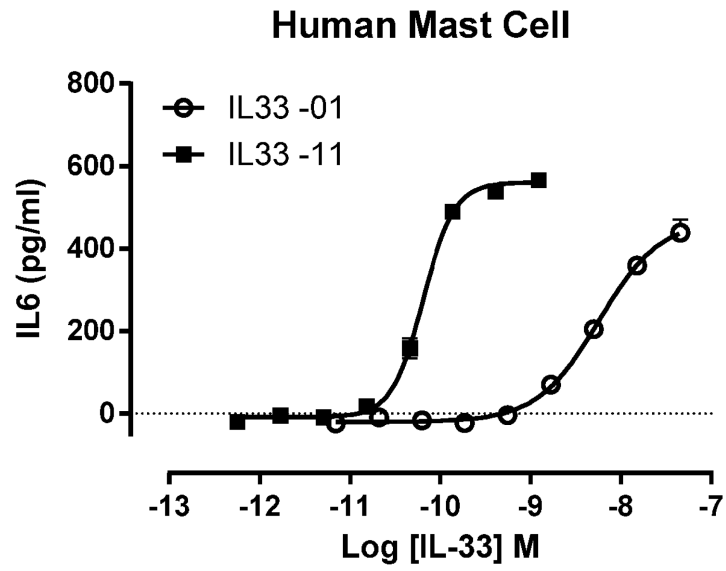


FIGURE 34

A



B

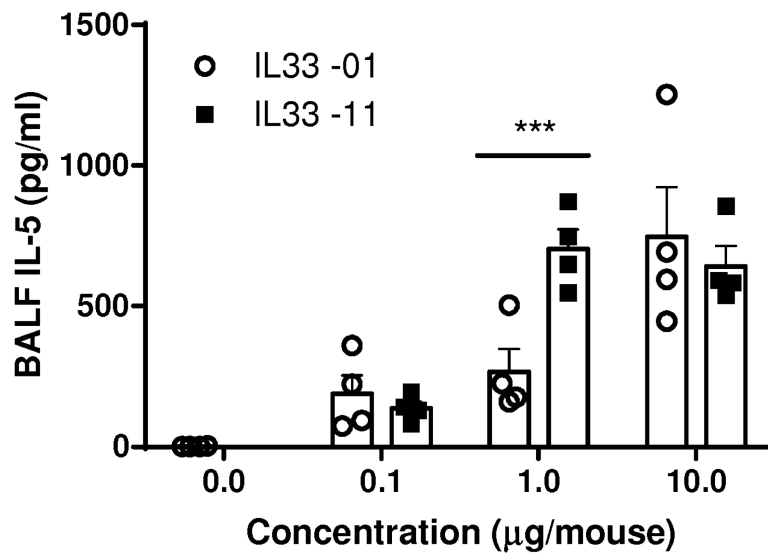


FIGURE 35

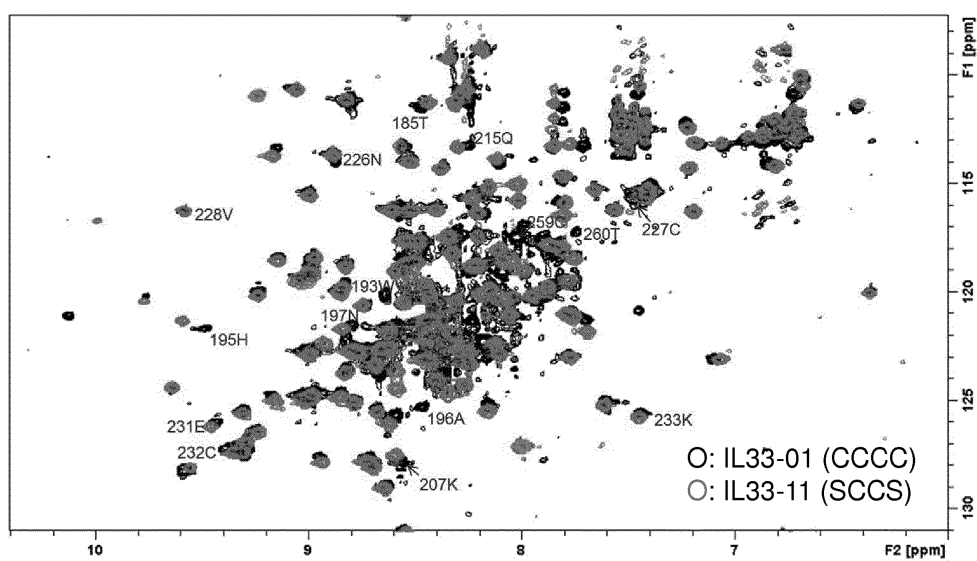


FIGURE 36

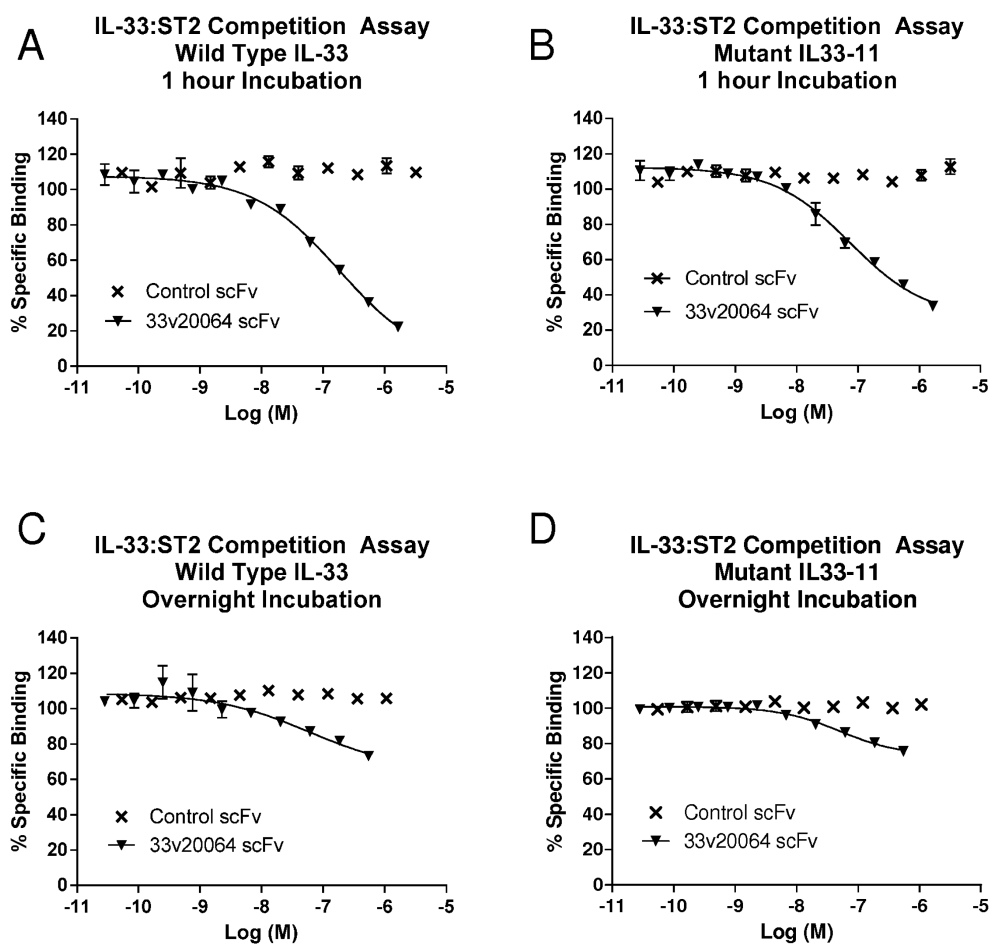


FIGURE 37

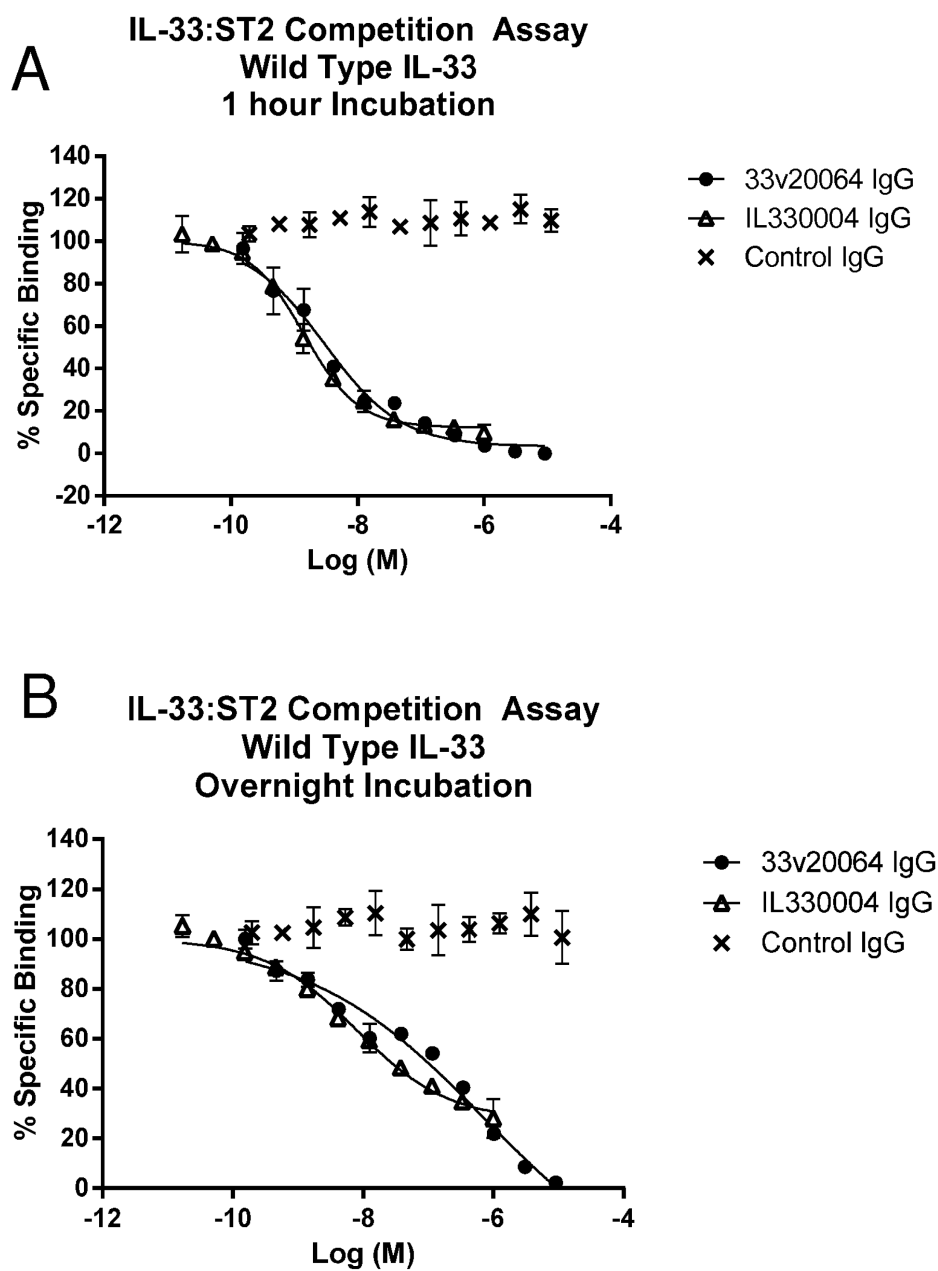


FIGURE 38

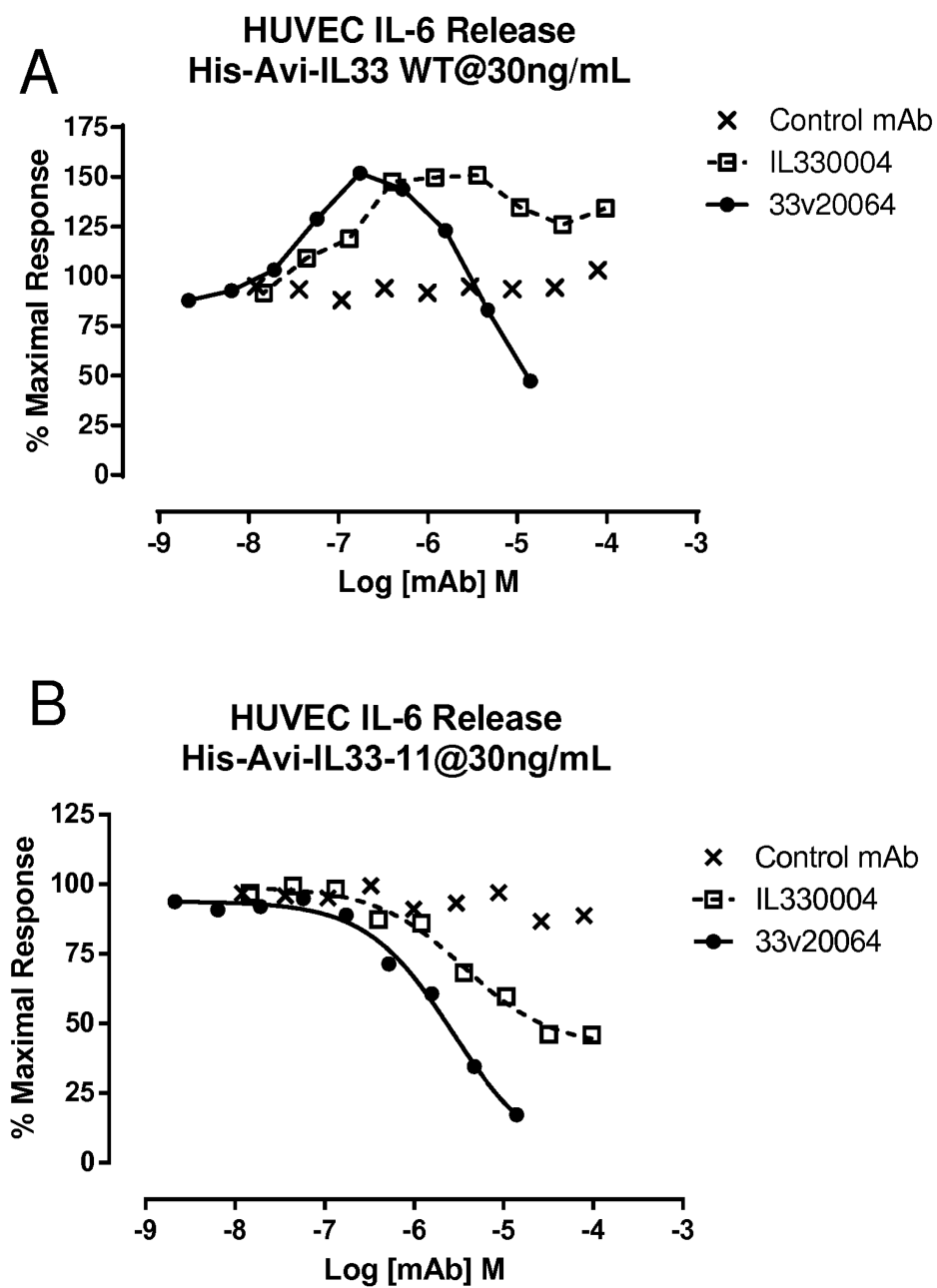


FIGURE 39

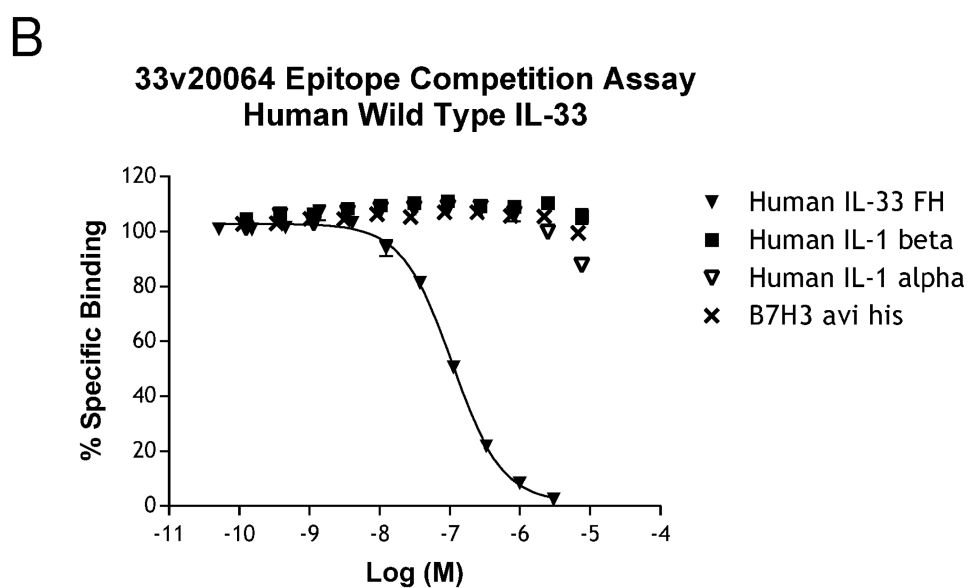
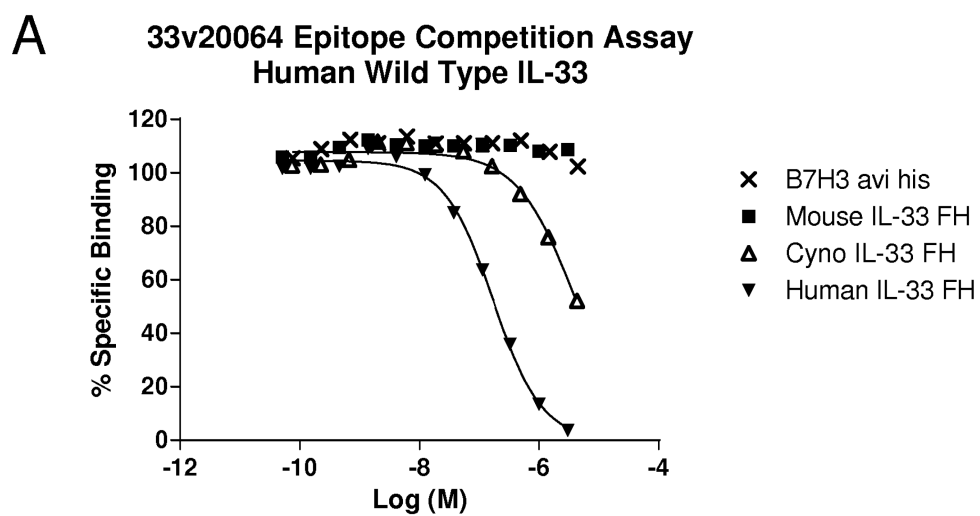


FIGURE 40

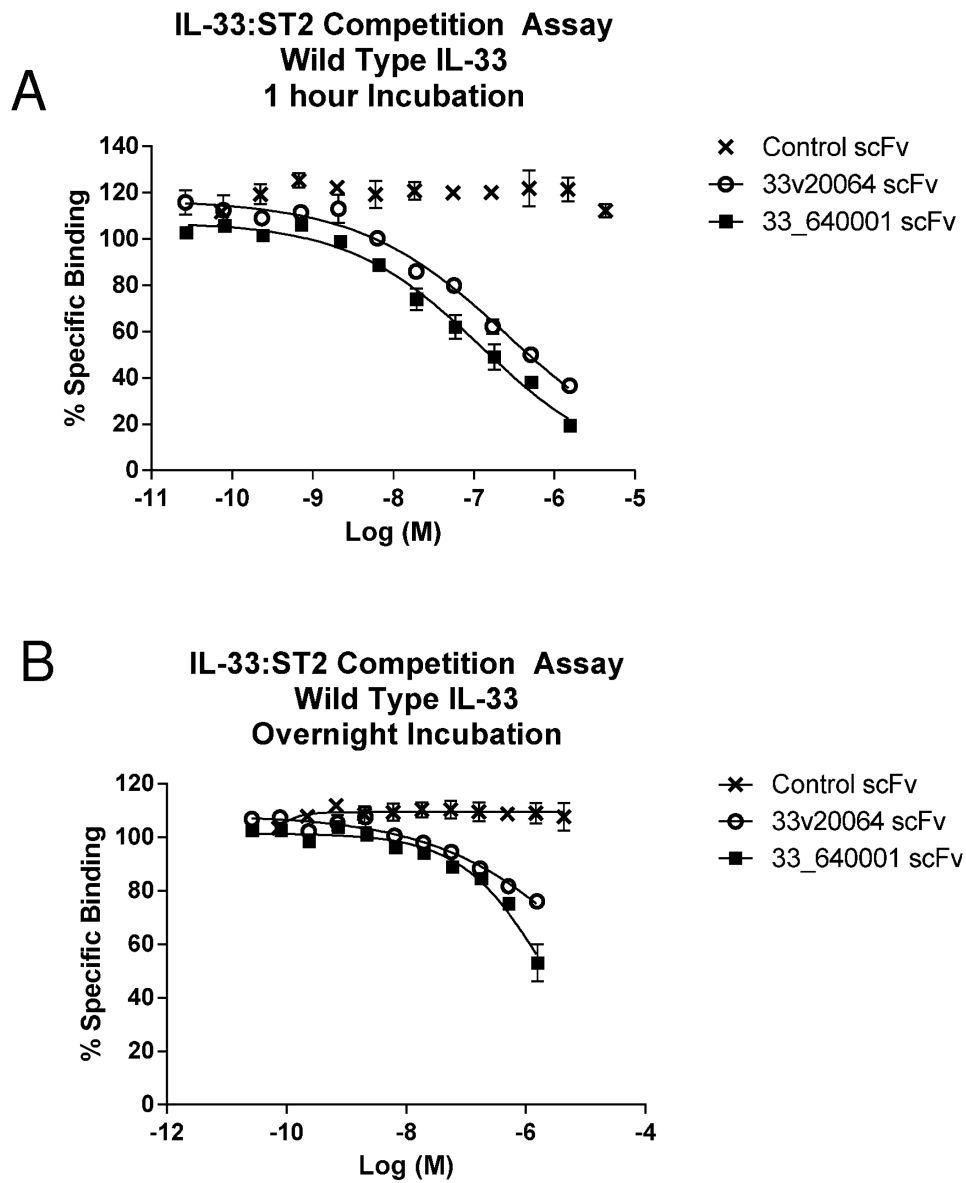


FIGURE 41

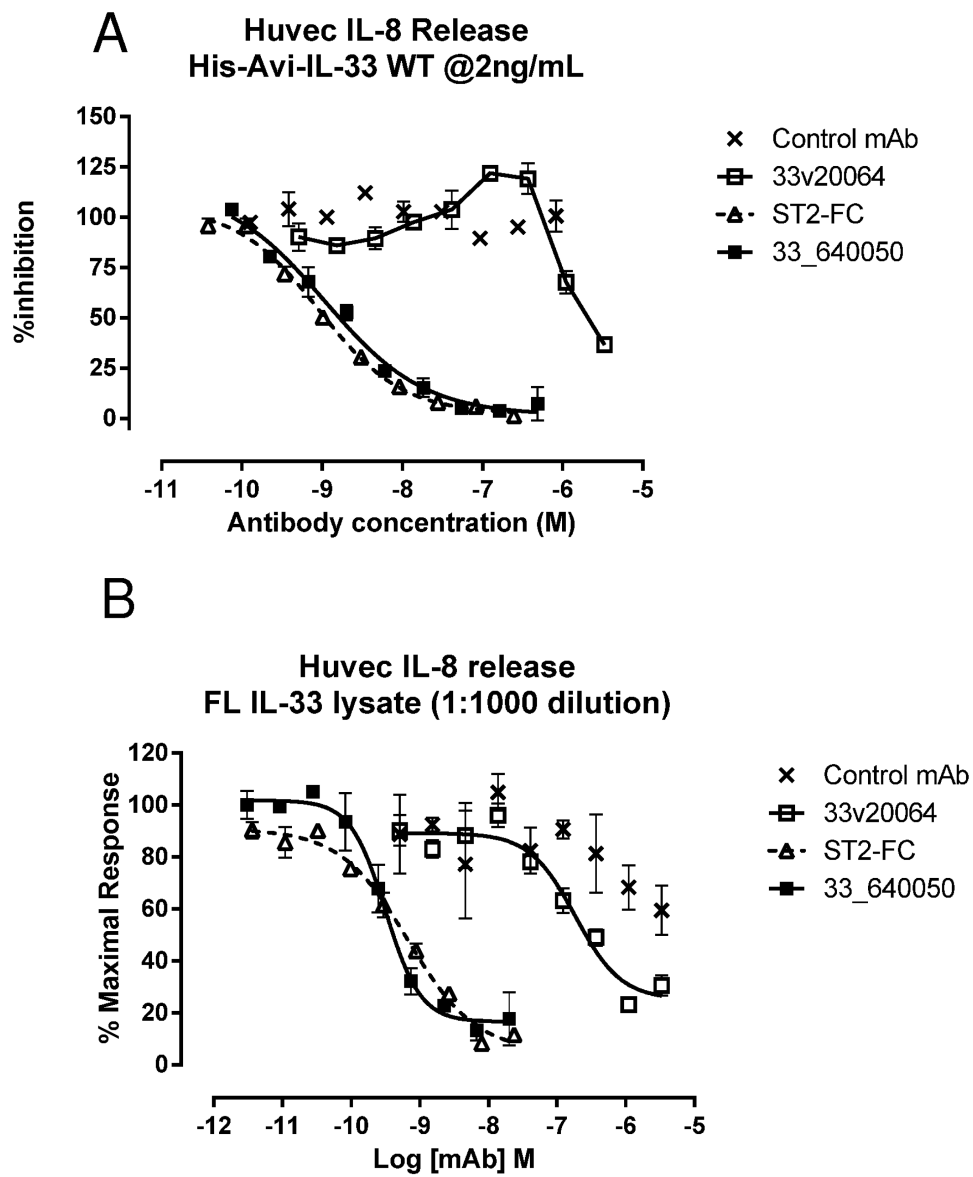
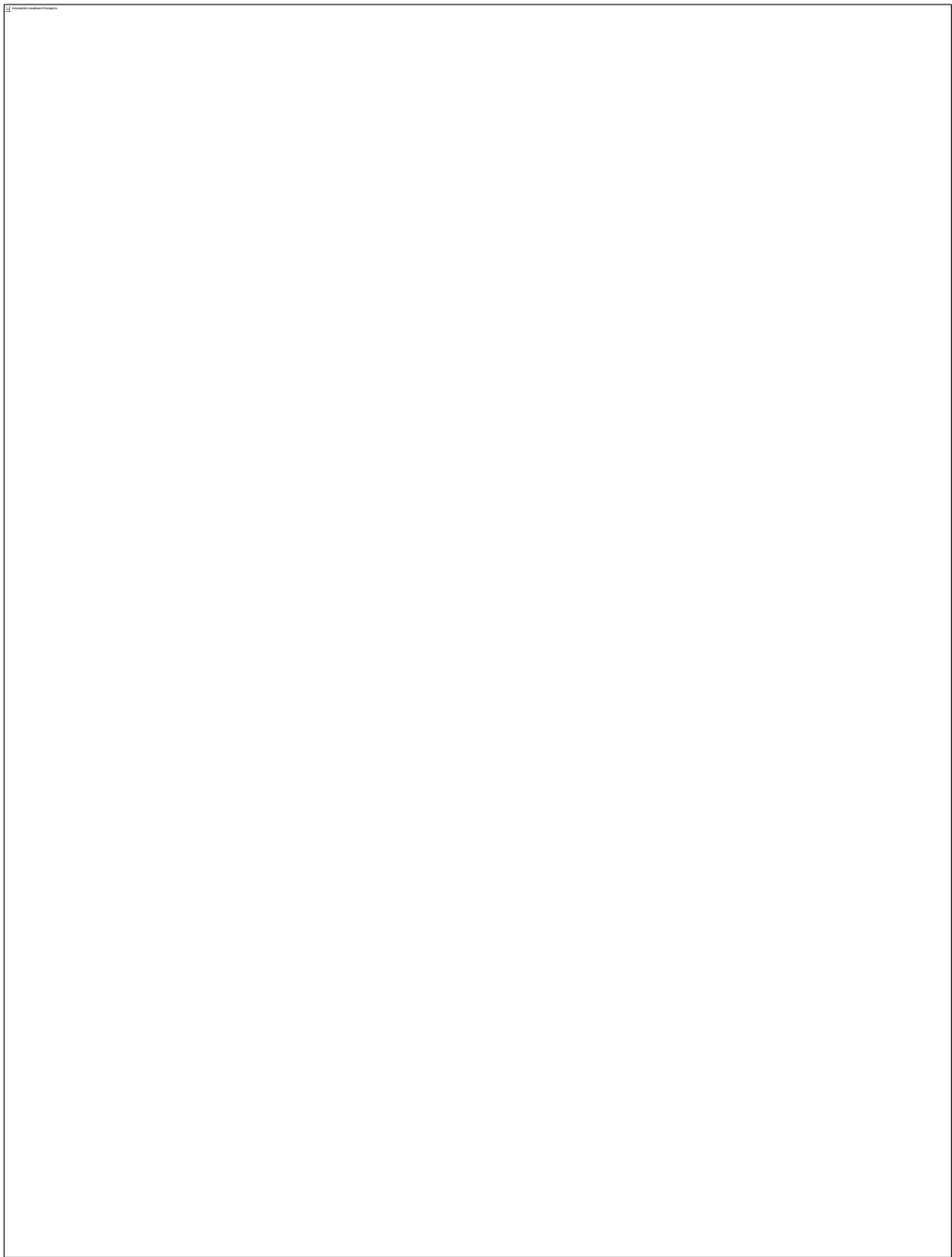
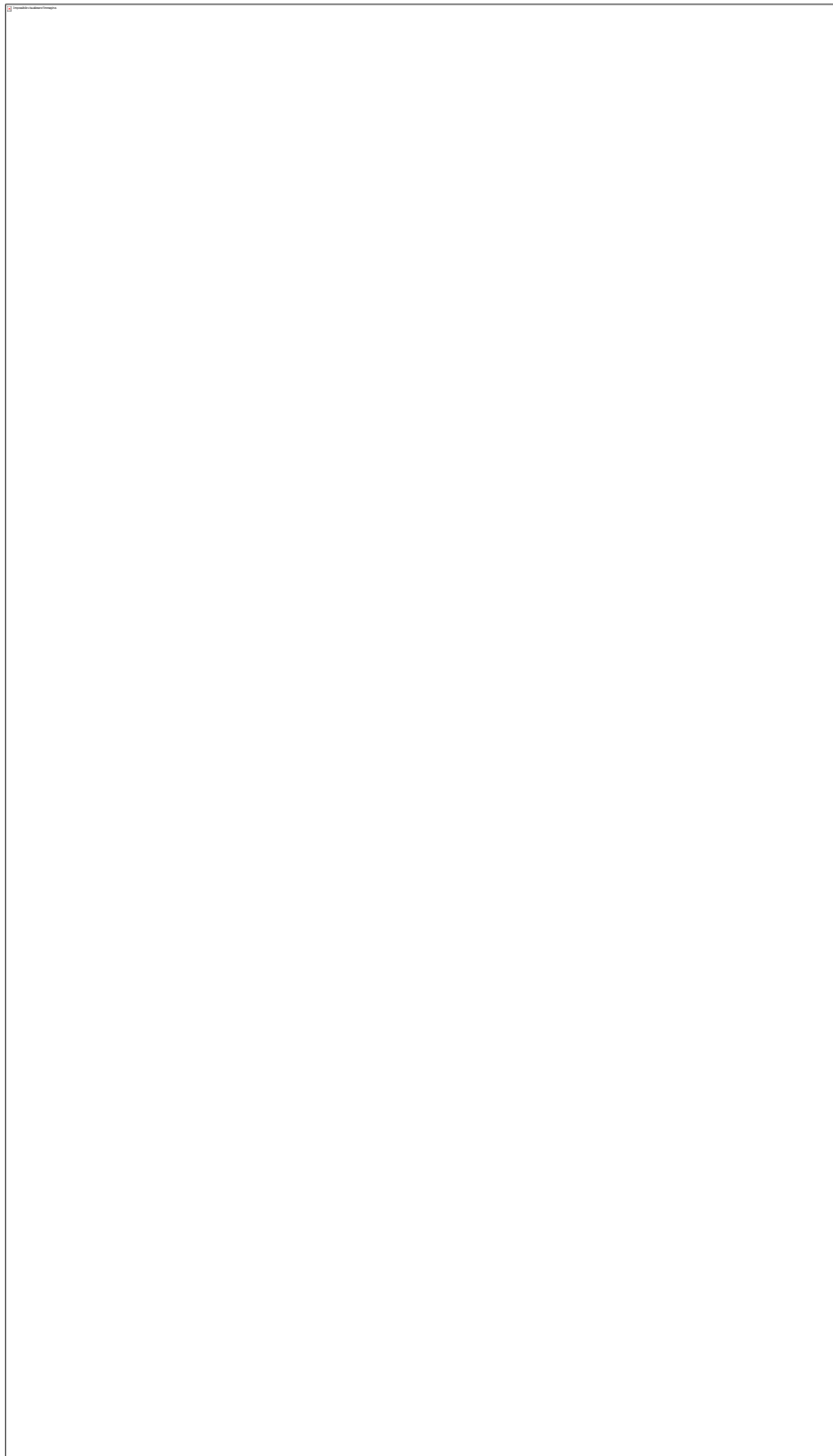
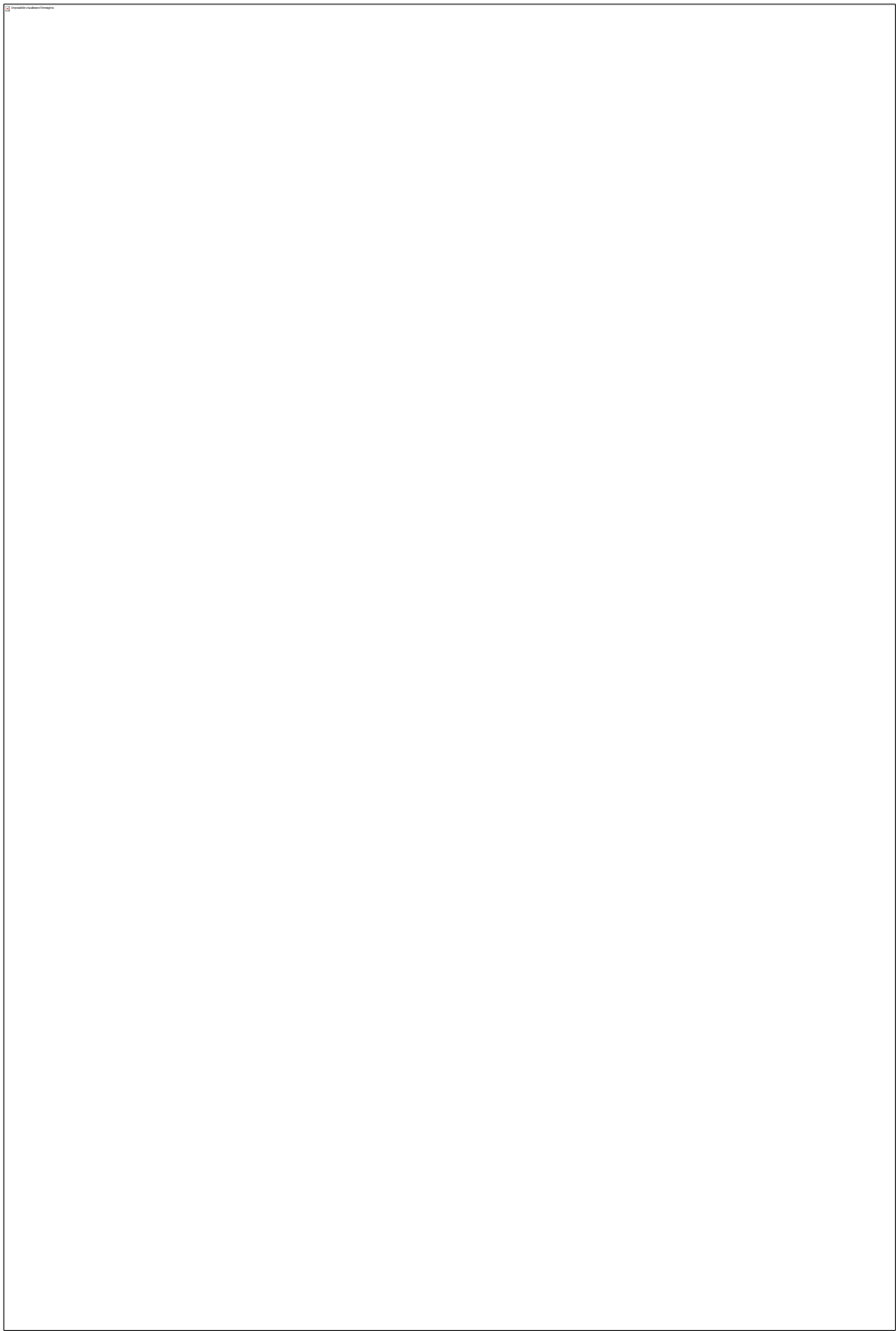
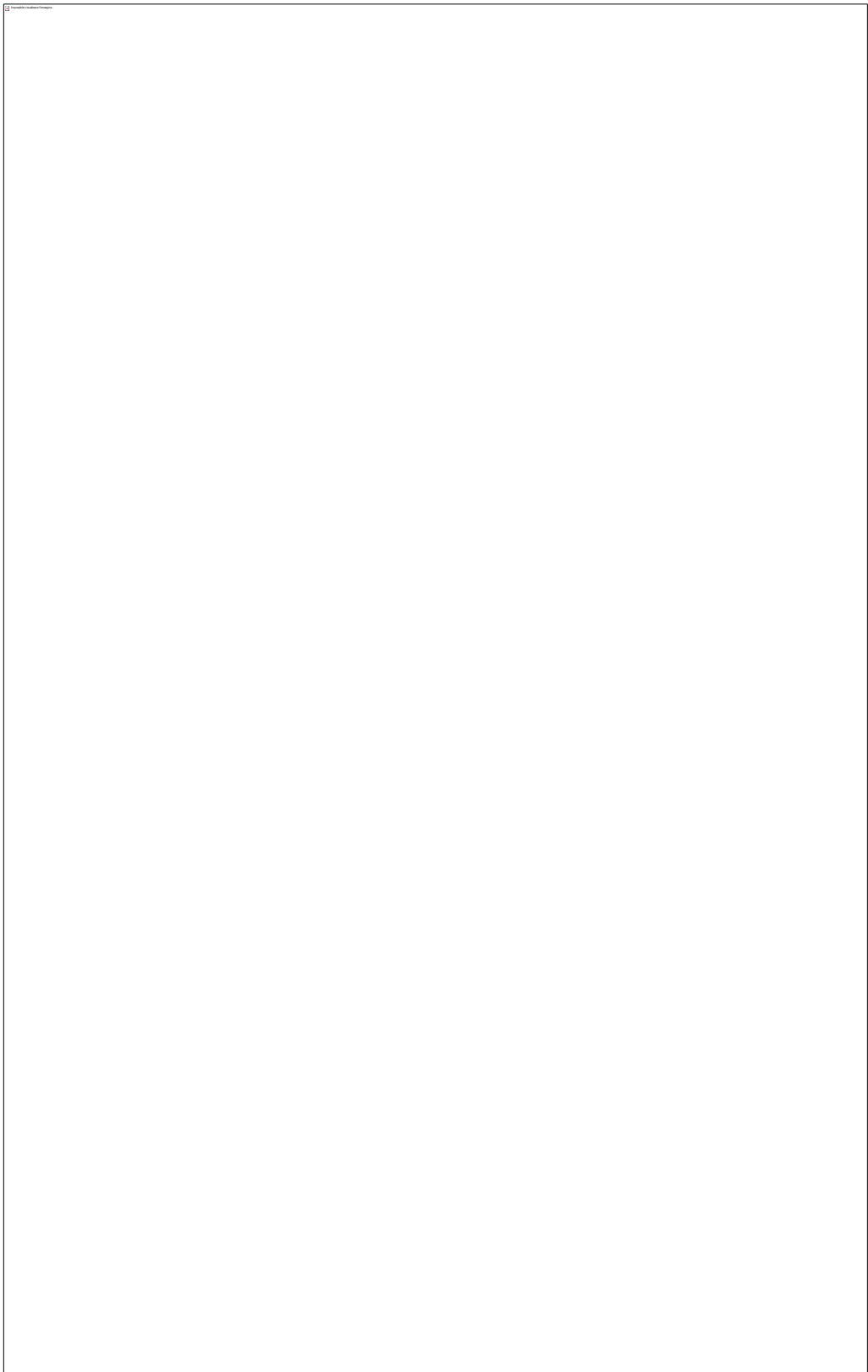


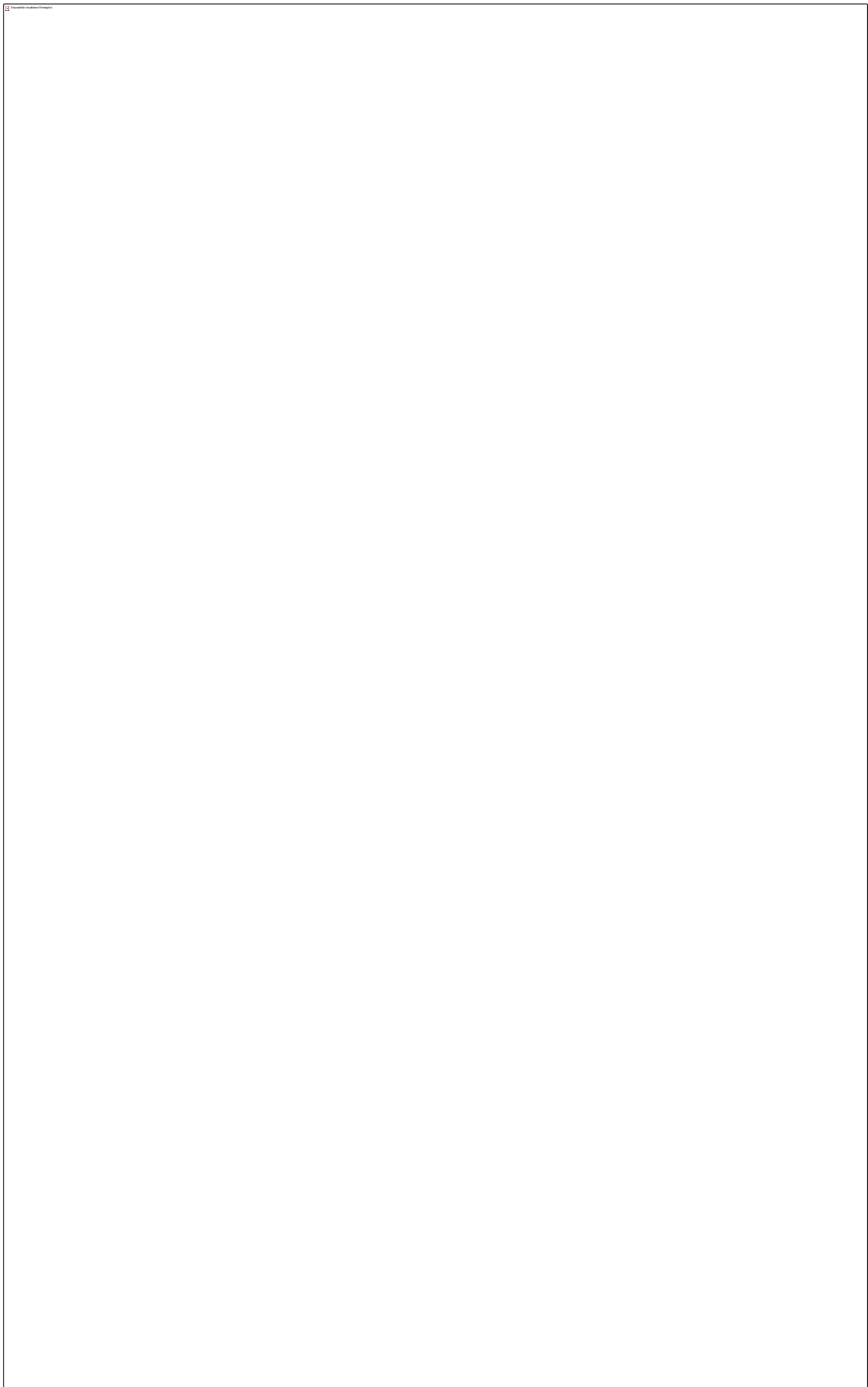
FIGURE 42

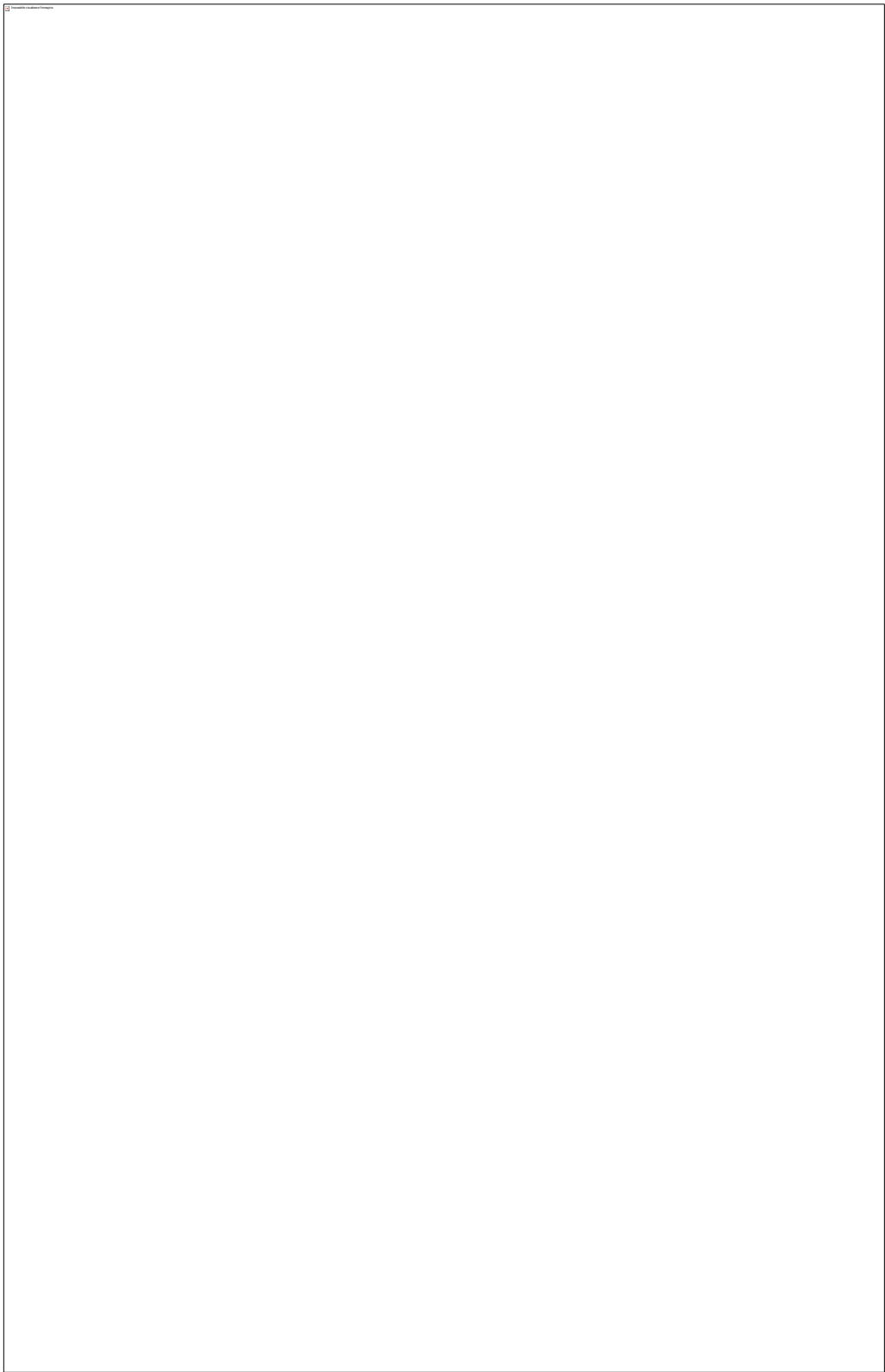


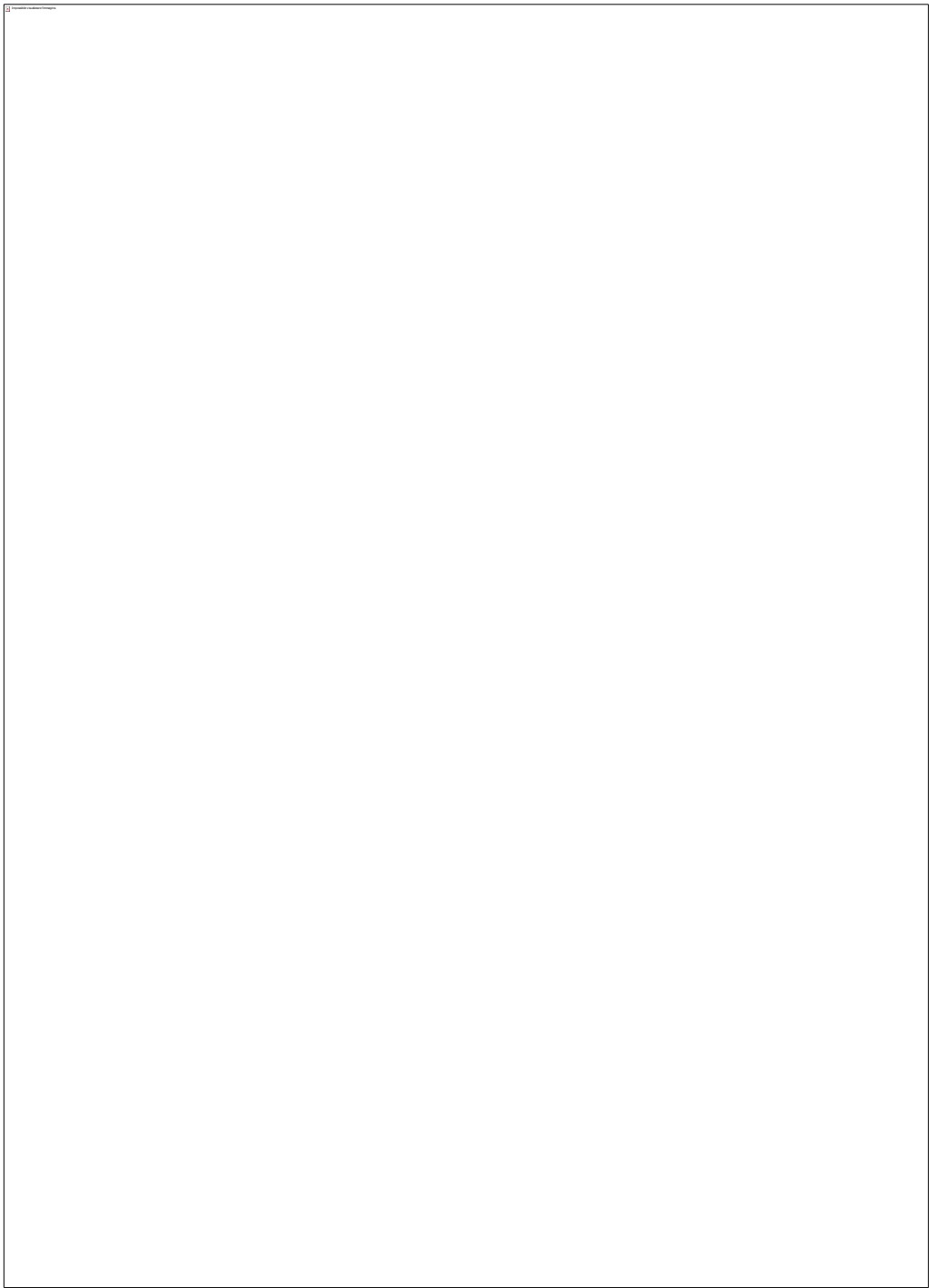


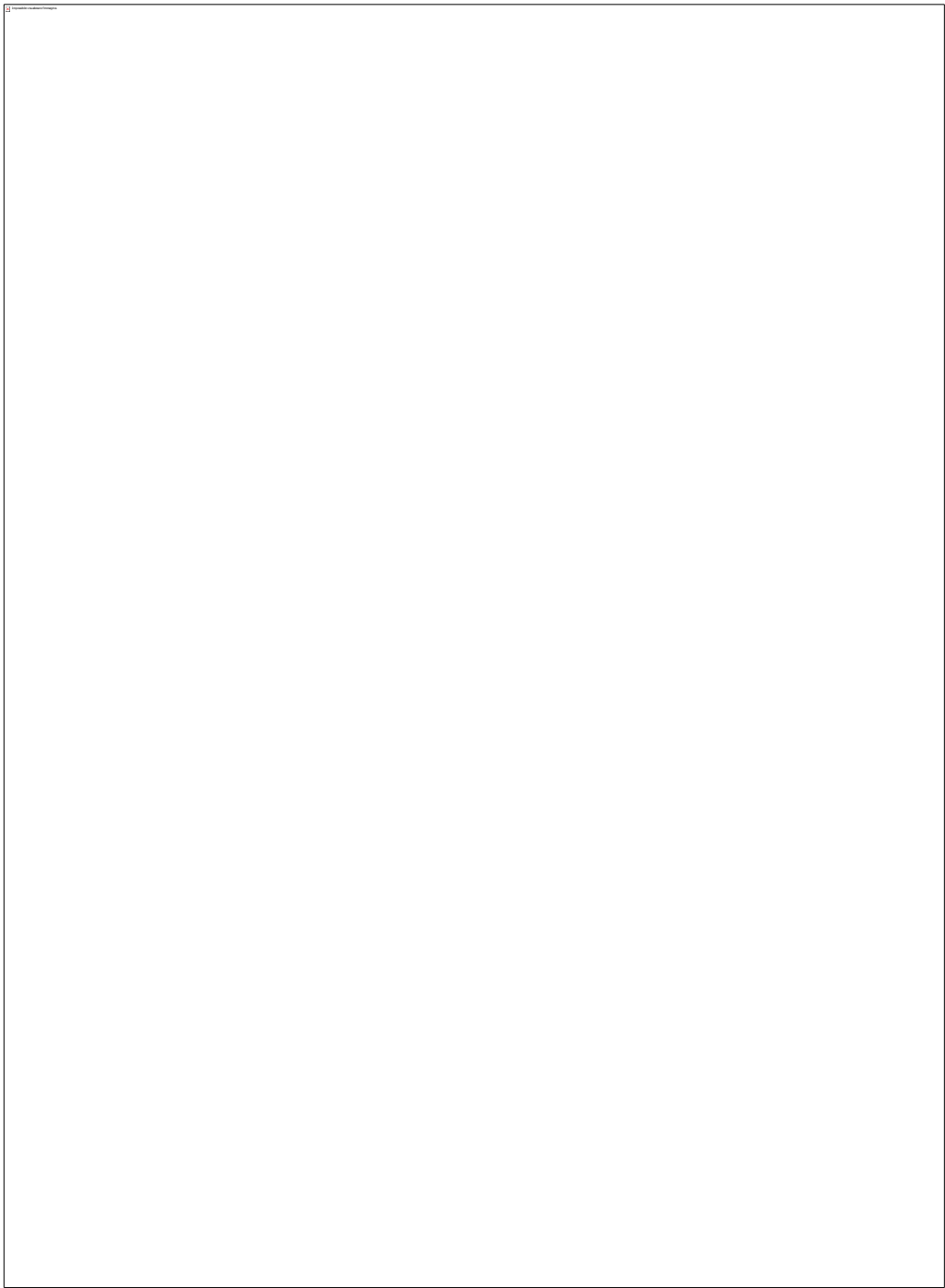












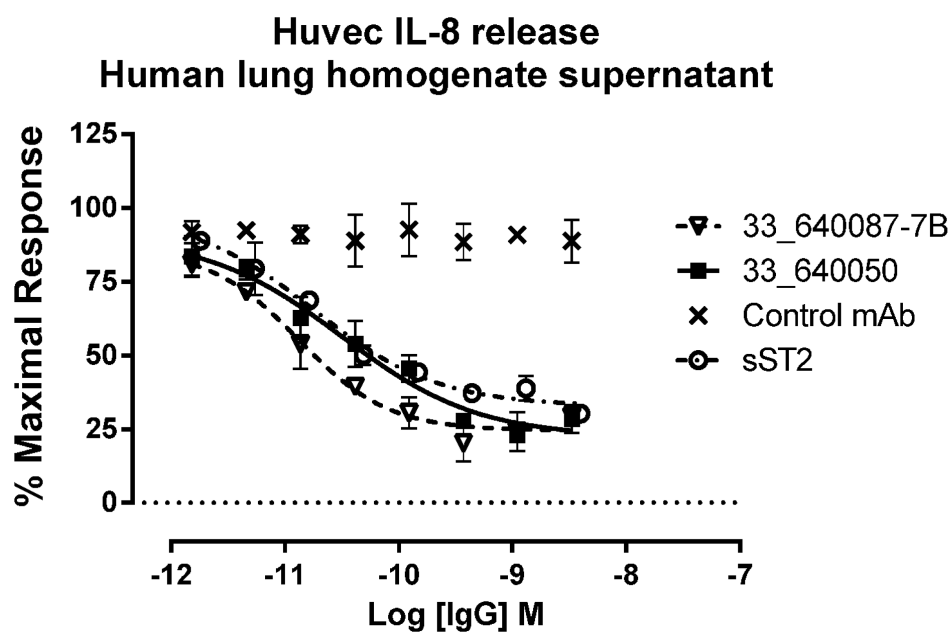


FIGURE 51

