



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.26

(21) Номер заявки
201591331

(22) Дата подачи заявки
2014.03.14

(51) Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

(54) АНТАГОНИСТЫ ИЛ-33 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 61/787,121; 61/819,029; 61/913,417

(32) 2013.03.15; 2013.05.03; 2013.12.09

(33) US

(43) 2016.01.29

(86) PCT/US2014/027058

(87) WO 2014/152195 2014.09.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Мерфи Эндрю Дж., Пападопулос
Николас Дж., Оренго Джейми (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) ALI S. ET AL.: "Caspase 3 inactivates biologically active full length interleukin-33 as a classical cytokine but does not prohibit nuclear translocation", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 391, no. 3, 15 January 2010 (2010-01-15), pages 1512-1516, XP026854479, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2009.12.107 [retrieved on 2010-01-14] page 1512, right-hand column, last paragraph - page 1513, left-hand column, paragraph 1

SHAFAQAT ALI: "Characterization of Interleukin-33 and IL-33 Receptor Complex", DISSERTATION, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 1-126, XP009169477, page 38, last paragraph - page 39, paragraph 1

PALMER G. ET AL.: "The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33", CYTOKINE, ACADEMIC PRESS LTD, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 42, no. 3, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 358-364, XP022696634, ISSN: 1043-4666, DOI: 10.1016/

J.CYTO.2008.03.008 [retrieved on 2008-05-02], abstract, page 359, left-hand column, paragraph 2, figure 4

KWANGWON HONG ET AL.: "The inhibitory function of Fc-ST2 depends on cell type; IL-1RAcP and ST2 are necessary but insufficient for IL-33 activity", IMMUNOLOGIC RESEARCH, vol. 56, no. 1, 23 February 2013 (2013-02-23), pages 122-130, XP55123041, ISSN: 0257-277X, DOI: 10.1007/s12026-013-8388-9, abstract, page 123, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1, figure 4

LÖHNING M. ET AL.: "T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of IL-4, IL-5, and IL-10, and important for Th2 effector function", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 95, no. 12, 1 June 1998 (1998-06-01), pages 6930-6935, XP002101454, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.95.12.6930, page 6931, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2, page 6933, right-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1

US-A-5576191

H. HAYAKAWA ET AL.: "Soluble ST2 Blocks Interleukin-33 Signaling in Allergic Airway Inflammation", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 282, no. 36, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 26369-26380, XP055030354, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M704916200, the whole document

PALMER GABY ET AL.: "Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases.", NATURE REVIEWS. RHEUMATOLOGY JUN 2011, vol. 7, no. 6, June 2011 (2011-06), pages 321-329, XP009178467, ISSN: 1759-4804, the whole document

FOO Y LIEW ET AL.: "Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family", NATURE REVIEWS. IMMUNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 10, no. 2, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 103-110, XP002658775, ISSN: 1474-1741, DOI: 10.1038/NRI2692 [retrieved on 2010-01-18], the whole document

US-A1-2007087411

(57) В настоящем изобретении предлагаются антагонисты интерлейкина-33 (ИЛ-33), содержащие первый ИЛ-33-связывающий домен (D1), второй ИЛ-33-связывающий домен (D2) и мультимеризующийся домен (M), где D1 присоединен к N-концу D2 и D2 присоединен к N-концу M, причем D1 содержит ИЛ-33-связывающий участок аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, соответствующей ST2 человека, D2 содержит ИЛ-33-связывающий участок аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, соответствующей ИЛ-1RAcP человека, и M содержит Fc-домен иммуноглобулина. Антагонисты ИЛ-33 по данному изобретению могут применяться в

фармацевтической композиции для лечения воспалительного заболевания или расстройства, опосредованных IL-33, а также в способе лечения воспалительного заболевания или расстройства, опосредованных IL-33, или по меньшей мере одного симптома, связанного с воспалительным заболеванием или расстройством, таких как астма, аллергия, атопический дерматит, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, артрит и аллергический ринит.

034834 B1

034834 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, которые способны противодействовать IL-33, и способам их применения.

Уровень техники

Интерлейкин-33 (IL-33) является лигандом для ST2, представителя суперсемейства Толл-подобных/интерлейкин-1 рецепторов, который ассоциируется с аксессуарным белком IL-1RAcP (для обзора, см., например, Kakkar and Lee, Nature Reviews - Drug Discovery 7(10):827-840 (2008), Schmitz et al., Immunity 23:479-490 (2005); Liew et al., Nature Reviews - Immunology 70:103-110 (2010); US 2010/0260770; US 2009/0041718). После активации ST2/IL-1RAcP интерлейкином-33 сигнальный каскад стимулируется молекулами, находящимися на более низком уровне, такими как MyD88 (миелоидный фактор дифференциации 88) и TRAF6 (связывающий фактор 6 рецептора ФНО), что приводит, среди прочего, к активации NFκB (ядерного фактора-κB). Сигнальная система IL-33 вовлечена в патогенез различных заболеваний и патологий (Liew et al., Nature Reviews - Immunology 70:103-110 (2010)).

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предлагаются антагонисты интерлейкина-33 ("IL-33"). В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается антагонист IL-33, содержащий первый IL-33-связывающий домен (D1) и мультимеризующий домен (M). В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 содержит первый IL-33-связывающий домен (D1), прикрепленный к мультимеризующему домену (M), причем D1 содержит IL-33-связывающий участок белка ST2.

В некоторых вариантах реализации изобретения антагонист IL-33 дополнительно содержит один или более дополнительных IL-33-связывающих доменов (например, D2, D3, D4 и т.д.).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации изобретения IL-33-связывающий домен (D1, D2, D3, D4 и т.д.) содержит IL-33-связывающий участок белка ST2, внеклеточный домен белка IL-1RAcP или другой IL-33-связывающий домен. В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 дополнительно содержит второй IL-33-связывающий домен (D2), прикрепленный к D1 и/или M, причем D2 содержит внеклеточную часть белка IL-1RAcP. В одном варианте реализации изобретения D1 прикреплен к N-концу M. В одном варианте реализации изобретения D1 прикреплен к C-концу M. В одном из вариантов реализации изобретения D2 прикреплен к N-концу M. В одном варианте реализации изобретения D2 прикреплен к C-концу M. В одном варианте реализации изобретения D1 прикреплен к N-концу D2, а D2 прикреплен к N-концу M. Мультимеризующий домен (M) может представлять собой пептид или полипептид, имеющий N-конец и C-конец. Компоненты IL-33 связывающего домена могут быть прикреплены к N-концу или C-концу M. В соответствии с некоторыми вариантами реализации изобретения компоненты D1, D2 и M соединены в тандеме так, что D1 прикреплен к N-концу D2, а D2 прикреплен к N-концу M. Множество механизмов и конфигураций компонентов D1, D2 и M рассматриваются в рамках настоящего изобретения, примеры которых описаны в этом документе. В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 связывает человеческий интерлейкин-33 (IL-33) со значением связывающей константы равновесия диссоциации (K_D), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 25°C, менее чем около 80 пМ, и/или со значением связывающей константы равновесия диссоциации (K_D), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 37°C, менее чем около 400 пМ. В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 связывает человеческий интерлейкин-33 (IL-33) со значением связывающей константы равновесия диссоциации (K_D), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 25°C, менее чем около 60 пМ, и/или со значением связывающей константы равновесия диссоциации (K_D), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 37°C, менее чем около 1,0 пМ.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 связывает интерлейкин-33 (IL-33) обезьяны со значением связывающей константы равновесия диссоциации (K_D), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 25°C, менее чем около 60 пМ, и/или со значением связывающей константы равновесия диссоциации (K_D), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 37°C, менее чем около 200 пМ.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 связывает интерлейкин-33 (IL-33) обезьяны со значением связывающей константы равновесия диссоциации (K_D), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 25°C, менее чем около 1,0 пМ, и/или со значением связывающей константы равновесия диссоциации (K_D), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 37°C, менее чем около 1,0 пМ.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 связывает интерлейкин-33 (IL-33) мыши со значением связывающей константы равновесия диссоциации (K_D), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 25°C, менее чем около 110 пМ, и/или со значением связывающей константы равновесия диссоциации (K_D), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 37°C, менее чем около 100 пМ.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 связывает интерлейкин-33 (IL-33) мыши со значением связывающей константы равновесия диссоциации (K_D), измеренным в поверхностном

плазмонном резонансном анализе при температуре 25°C, менее чем около 10 пМ, и/или со значением связывающей константы равновесия диссоциации (K_D), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 37°C, менее чем около 5 пМ.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 связывает человеческий интерлейкин-33 (IL-33) со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 25°C, равным около 9 мин или больше, и/или со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 37°C, равным около 4 мин или больше.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 связывает человеческий интерлейкин-33 (IL-33) со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 25°C, равным около 30 мин или больше, и/или со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 37°C, равным около 1000 мин или больше.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 связывает интерлейкин-33 (IL-33) обезьяны со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 25°C, равным около 40 мин или больше, и/или со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 37°C, равным около 10 мин или больше.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 связывает интерлейкин-33 (IL-33) обезьяны со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 25°C, равным около 1000 мин или больше, и/или со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 37°C, равным около 1000 мин или больше.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 связывает интерлейкин-33 (IL-33) мыши со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 25°C, равным около 25 мин или больше, и/или со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 37°C, равным около 30 мин или больше.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 связывает интерлейкин-33 (IL-33) мыши со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 25°C, равным около 500 мин или больше, и/или со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 37°C, равным около 1000 мин или больше.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 блокирует взаимодействие IL-33 и ST2.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 блокирует взаимодействие IL-33 и ST2 со значением IC_{50} менее чем около 115 пМ, измеренным в анализе связывания "рецептор/лиганд" при температуре 25°C *in vitro*.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 блокирует взаимодействие IL-33 и ST2 со значением IC_{50} менее чем около 20 пМ, измеренным в анализе связывания "рецептор/лиганд" при температуре 25°C *in vitro*.

В одном варианте реализации изобретения D1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или 6, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере на 90%.

В одном варианте реализации изобретения D2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере на 90%.

В одном варианте реализации изобретения мультимеризующий компонент включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 10, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере на 90%.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 содержит первый IL-33-связывающий домен (D1), прикрепленный к первому мультимеризующему домену (M1), и второй IL-33-связывающий домен (D2), прикрепленный ко второму мультимеризующему домену (M2), отличающийся тем, что домены D1 и/или D2 содержат IL-33-связывающий участок рецептора, выбранного из группы, состоящей из ST2 и IL-1RAcP.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 содержит третий IL-33-связывающий домен (D3), который прикреплен к D1 или M1, и при этом D3 содержит IL-33-связывающий участок рецептора, выбранный из группы, состоящей из ST2 и IL-1RAcP.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 содержит четвертый IL-33-связывающий домен (D4), который прикреплен к D2 или M2, и при этом D4 содержит IL-33-связывающий участок рецептора, выбранный из группы, состоящей из ST2 и IL-1RAcP.

В одном варианте реализации изобретения D1 прикреплен к N-концу M1, а D2 прикреплен к N-концу M2.

В одном варианте реализации изобретения D3 прикреплен к N-концу D1.

В одном варианте реализации изобретения D3 прикреплен к C-концу M1. В одном варианте реализации изобретения D4 прикреплен к N-концу D2. В одном варианте реализации изобретения D4 прикреплен к C-концу M2. В одном варианте реализации изобретения D3 прикреплен к N-концу D1, D1 прикреплен к N-концу M1; D4 прикреплен к N-концу D2, а D2 прикреплен к N-концу M2. В одном варианте реализации изобретения D3 является идентичным или по существу идентичным D4, а D1 является идентичным или по существу идентичным D2. В одном варианте реализации изобретения D3 и D4 каждый содержит IL-33-связывающий участок белка ST2; D1 и D2 каждый содержит внеклеточный участок белка IL-1RAcP.

В одном варианте реализации изобретения антагонист IL-33 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 и 13.

Второй аспект настоящего изобретения предлагает способы применения описанных в настоящем документе антагонистов IL-33 при лечении воспалительного заболевания или патологии, или по меньшей мере одного симптома, связанного с воспалительным заболеванием или патологией, включающие введение одного или более антагонистов IL-33 по изобретению или фармацевтической композиции, содержащей один или более антагонистов IL-33 по изобретению, пациенту, нуждающемуся в этом, причем воспалительное заболевание или патология облегчается или уменьшается его степень тяжести, продолжительность или частота возникновения, или по меньшей мере один симптом, связанный с воспалительным заболеванием или патологией, облегчается или уменьшается степень его тяжести, продолжительность или частота возникновения. В одном варианте реализации изобретения, воспалительное заболевание или патология, которые можно лечить с помощью любого одного или нескольких антагонистов IL-33 по изобретению, могут быть выбраны из группы, состоящей из астмы, атопического дерматита, хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ), воспалительного заболевания кишечника, рассеянного склероза, артрита, аллергического ринита, эозинофильного эзофагита и псориаза.

В одном варианте реализации изобретения воспалительное заболевание или патология, которые можно лечить с помощью любого одного или нескольких антагонистов IL-33 по данному изобретению, представляет собой астму. Астма может быть эозинофильная или неэозинофильная. Астма может быть резистентная к стероидам или чувствительная к стероидам.

В одном варианте реализации изобретения воспалительное заболевание или патология, которые можно лечить с помощью любого одного или нескольких антагонистов IL-33 по данному изобретению, представляет собой атопический дерматит. В одном варианте реализации изобретения воспалительное заболевание или патология, которые можно лечить с помощью любого одного или нескольких антагонистов IL-33 по данному изобретению, представляет собой хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ). В одном варианте реализации изобретения хроническое обструктивное заболевание легких может быть следствием или частично вызвано вдыханием сигаретного дыма.

В родственном варианте реализации настоящего изобретения предлагается способ лечения пациента, демонстрирующего чувствительность к аллергену, который включает введение эффективного количества одного или более антагонистов IL-33 по данному изобретению или фармацевтической композиции, включающей один или несколько антагонистов IL-33 по данному изобретению, пациенту, нуждающемуся в этом; причем пациент демонстрирует пониженную чувствительность или сниженную аллергическую реакцию на аллерген, или не проявляет чувствительности или аллергической реакции, или анафилактического ответа на аллерген после введения антитела или композиции, содержащей антитело.

В родственном варианте реализации настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая один или больше антагонистов IL-33 по изобретению для применения в лечении воспалительного заболевания или патологии, причем воспалительное заболевание или патология выбирается из группы, состоящей из астмы, аллергии, анафилаксии, атопического дерматита, хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ), воспалительного заболевания кишечника, рассеянного склероза, артрита, аллергического ринита, эозинофильного эзофагита и псориаза. В одном варианте реализации настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая один или больше антагонистов IL-33 по данному изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания или патологии, причем воспалительное заболевание или патология выбирается из группы, состоящей из астмы, аллергии, анафилаксии, атопического дерматита, хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ), воспалительного заболевания кишечника, рассеянного склероза, артрита, аллергического ринита, эозинофильного эзофагита и псориаза.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагается способ лечения воспалительного заболевания или патологии путем введения одного или более антагонистов IL-33 по данному изобретению в комбинации с эффективным количеством второго терапевтического агента, пригодного для уменьшения проявлений воспалительного заболевания или патологии, или по меньшей мере одного симптома воспалительного заболевания или патологии, или уменьшения аллергической реакции на аллерген.

В одном варианте реализации изобретения второй терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из нестероидного противовоспалительного препарата (НПВП), кортикостероида, бронхального дилататора, антигистаминного средства, адреналина, противоотечного средства, антаго-

ниста тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП, TSLP), антагониста IL-13, антагониста IL-4, двойного антагониста IL-4/IL-13, антагониста IL-5, антагониста IL-6, антагониста IL-12/23, антагониста IL-22, антагониста IL-25, антагониста IL-17, антагониста IL-31, ингибитора PDE4 и другого антагониста IL-33 или другого антитела к IL-33.

Третий аспект настоящего изобретения предлагает фармацевтическую композицию, содержащую любой один или более антагонистов IL-33, описанных в настоящем документе, фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель и терапевтические способы, включающих введение таких фармацевтических композиций субъектам, нуждающимся в этом. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный терапевтически активный компонент может создаваться или вводиться в комбинации с антагонистом IL-33 из настоящего изобретения.

Другие варианты реализации настоящего изобретения станут очевидными после рассмотрения последующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

На фигуре представлены четыре типовые конфигурации отдельных компонентов антагонистов IL-33 по отношению друг к другу. На панели А показана конфигурация, в которой первый IL-33-связывающий домен (D1) прикреплен к N-концу первого мультимеризующего домена (M1), а второй IL-33-связывающий домен (D2) прикреплен к N-концу второго мультимеризующего домена (M2). D1 представлен в виде белой ячейки, D2 - в виде черной ячейки, для иллюстрации того, что D1 и D2 являются производными от различных IL-33-связывающих белков. На панели В показана конфигурация, в которой первый IL-33-связывающий домен (D1) прикреплен к N-концу первого мультимеризующего домена (M1), а второй IL-33-связывающий домен (D2) прикреплен к C-концу второго мультимеризующего домена (M2). D1 представлен в виде белой ячейки, D2 - в виде черной ячейки, для иллюстрации того, что D1 и D2 являются производными от различных IL-33-связывающих белков. На панелях С и D показаны конфигурации, включающие четыре IL-33-связывающих домена: D1, D2, D3 и D4. В этих конфигурациях D3-D1-M1 и D4-D2-M2 прикреплены в тандеме, в котором D3 прикреплен к N-концу D1, а D1 прикреплен к N-концу M1; D4 прикреплен к N-концу D2, а D2 прикреплен к N-концу M2. На панели С D3 и D4 являются идентичными или по существу идентичными друг к другу, и D1 и D2 являются идентичными или по существу идентичными друг к другу. На панели D D1 и D4 являются идентичными или по существу идентичными друг к другу, и D3 и D2 являются идентичными или по существу идентичными друг к другу.

Подробное описание

Прежде чем настоящее изобретение будет описано, следует понимать, что это изобретение не ограничено описанными конкретными способами и экспериментальными условиями, поскольку способы и условия могут изменяться. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе в целях описания конкретных вариантов реализации изобретения, не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном описании, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом, имеющим средний уровень квалификации в области техники, к которой относится это изобретение. В данном контексте термин "около" в отношении конкретного численного значения означает, что значение может изменяться от указанного значения не более чем на 1%. Например, в данном контексте термин "около 100" включает в себя 99 и 101, а также все значения между ними (например, 99,1; 99,2; 99,3; 99,4 и т.д.). Несмотря на то что в практике или тестировании настоящего изобретения могут использоваться любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, предпочтительные способы и материалы приведены ниже.

Антагонисты IL-33

Определения "интерлейкин-33", "IL-33" и т.п., которые используются в настоящем описании, относятся к человеческому белку IL-33, имеющему аминокислотную последовательность, как изложено в списке учетных номеров Национального центра биотехнологической информации (NCBI) № NP_254274.1 (человеческая изоформа 1), NP_001186569.1 (человеческая изоформа 2) или NP_001186570.1 (человеческая изоформа 3). Все упоминания белков, полипептидов и фрагментов белков в настоящем описании обозначают человеческую версию соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если четко не обозначен нечеловеческий вид (например, "IL-33 мыши", "IL-33 обезьяны" и т.д.).

В данном контексте определение "антагонист IL-33" означает любую антигенсвязывающую молекулу, которая способна связываться с IL-33, блокировать, ослаблять или другим путем препятствовать передаче сигнала IL-33 и/или взаимодействию между IL-33 и рецептором клеточной поверхности (например, ST2). Антагонисты IL-33 из настоящего изобретения содержат первый IL-33-связывающий домен (D1), прикрепленный к мультимеризующему домену (M). В некоторых вариантах реализации изобретения антагонисты IL-33 по данному изобретению содержат второй IL-33-связывающий домен (D2), прикрепленный к D1 и/или M. В соответствии с некоторыми вариантами реализации изобретения D1 содержит IL-33-связывающий участок белка ST2. Согласно некоторым вариантам реализации изобре-

ния D2 содержит внеклеточный участок белка IL-1RAcP.

Отдельные компоненты антагонистов IL-33 могут быть расположены относительно друг друга разнообразно, что приводит к формированию функционально антагонистических молекул, способных связывать IL-33. Например, D1 и/или D2 прикреплены к N-концу M. В других вариантах реализации изобретения D1 и/или D2 прикреплены к C-концу M. В других вариантах реализации изобретения D1 прикреплен к N-концу D2, а D2 прикреплен к N-концу M, в результате чего происходит линейное слияние молекулы антагониста, от N-конца к C-концу, представленной формулой D1-D2-M. Другие ориентации отдельных компонентов описаны в настоящем документе. Неограничивающие примеры антагонистов IL-33 по данному изобретению представлены в рабочих вариантах реализации изобретения в настоящем описании, и включают антагонисты, обозначенные "hST2-hFc", "hST2-mFc", "hST2-hIL1RAcP-mFc", "hST2-hIL1RAcP-hFc" и "mST2-mIL1RAcP-mFc". hST2-hFc и hST2-mFc также могут упоминаться как "рецепторные белки ST2". hST2-hIL1RAcP-mFc, hST2-hIL1RAcP-hFc и mST2-mIL1RAcP-mFc также могут упоминаться в настоящем описании как "белки-ловушки IL-33".

В данном контексте "прикрепленный" относительно первого полипептидного компонента, который "прикреплен" ко второму полипептидному компоненту (например, "D1 прикреплен к M", "D2 прикреплен к M", "D1 прикреплен к D2" и т.д.), означает, что первый компонент физически связан со вторым компонентом, непосредственно или опосредовано. В качестве примера непосредственного прикрепления двух полипептидных компонентов, C-концевая аминокислота первого компонента может быть присоединена через пептидную связь к N-концевой аминокислоте второго компонента, или N-терминальная аминокислота первого компонента может быть присоединена через пептидную связь к C-концевой аминокислоте второго компонента. Опосредованное прикрепление, с другой стороны, означает, что и первый, и второй компоненты соединены физически с разными частями промежуточной структуры, которая представляет собой связующее звено между первым и вторым компонентами. Промежуточной структурой может быть, например, единичная аминокислота, пептидный линкер или другой полипептидный компонент (например, другой IL-33-связывающий белок и т.д.). Например, в конфигурации D1-D2-M (в которой первый IL-33-связывающий домен [D1] прикреплен ко второму IL-33-связывающему домену [D2], который в свою очередь соединен с мультимеризующим доменом [M]), D1 рассматривается как "прикрепленный" к M, хотя прикрепление является опосредованным D2, служащему в качестве промежуточной структуры.

Стандартные молекулярно-биологические технологии (например, технологии рекомбинантной ДНК) могут быть использованы для создания любого из антагонистов IL-33 по данному изобретению или их вариантов.

IL-33-связывающие домены.

Антагонисты IL-33 по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один IL-33-связывающий домен (иногда обозначаемый в настоящем документе как "D" или "D1", "D2" и т.д.). В некоторых вариантах реализации изобретения IL-33-связывающий домен содержит IL-33-связывающий участок белка ST2. IL-33-связывающий участок белка ST2 может содержать или состоять из всех или части внеклеточного домена белка ST2. В некоторых вариантах реализации изобретения белок ST2 является белком человеческого ST2. Термин "человеческий белок ST2" в данном контексте относится к белку ST2, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах реализации изобретения белок ST2 представляет собой белок ST2 из нечеловеческих видов (например, ST2 мыши, ST2 обезьяны и т.д.). Типовой IL-33-связывающий участок белка ST2, упоминаемый в настоящем документе, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (соответствующую внеклеточному домену человеческого ST2 [K19-S328 по NCBI, учетный номер: NP_057316.3]). Другой пример IL-33-связывающего участка белка ST2, упоминаемого в настоящем документе, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (соответствующую внеклеточному домену мыши ST2 [S27-R332 по NCBI, учетный номер: P14719]). В некоторых вариантах реализации изобретения IL-33-связывающий домен содержит внеклеточную часть белка IL-1RAcP. В некоторых вариантах реализации изобретения белок IL-1RAcP представляет собой человеческий белок IL-1RAcP. Термин "человеческий белок IL-1RAcP" в данном контексте относится к белку IL-1RAcP, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах реализации изобретения белок IL-1RAcP представляет собой белок IL-1RAcP из нечеловеческих видов (например, IL-1RAcP мыши, IL-1RAcP обезьяны и т.д.). Типовой внеклеточный участок белка IL-1RAcP, упоминаемый в настоящем документе, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 (соответствующую внеклеточному домену человеческого IL-1RAcP [S21-E359 по NCBI, учетный номер: Q9NPH3]). Другой пример внеклеточного участка белка IL-1RAcP, упоминаемый в настоящем документе, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 (соответствующую внеклеточному домену IL-1RAcP мыши [S21-E359 по NCBI, учетный номер: Q61730]). Настоящее изобретение включает в себя антагонисты IL-33, содержащие компоненты D1 и/или D2, с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой типовой аминокислотной последовательности компонента IL-33-связывающего домена, упоминаемого в настоящем документе (например, SEQ ID NO: 5-8).

Мультивимеризующий домен.

Антагонисты IL-33 по настоящему изобретению также содержат по меньшей мере один мультивимеризующий домен (иногда обозначаемый в настоящем документе аббревиатурой "M", "M1", "M2" и т.д.). В общих чертах, мультивимеризующий домен (домены) по настоящему изобретению функционируют для соединения различных компонентов антагонистов IL-33 (например, IL-33-связывающий домен (домены)) друг с другом. В данном контексте термин "мультивимеризующий домен" относится к любой макромолекуле, которая имеет возможность ассоциировать (ковалентно или нековалентно) со второй макромолекулой с такой же или аналогичной структурой или составом. Например, мультивимеризующий домен может быть полипептидом, содержащим домен иммуноглобулина C_H3. Неограничивающим примером мультивимеризующего домена является Fc-часть иммуноглобулина, например, домен Fc IgG, выбранного из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любой аллотип в каждой группе изотипа. В некоторых вариантах реализации изобретения мультивимеризующий домен представляет собой фрагмент Fc или аминокислотную последовательность от 1 до около 200 аминокислот в длину, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. В других вариантах реализации изобретения мультивимеризующий домен представляет собой остаток цистеина или короткий цистеинсодержащий пептид. Другие мультивимеризующие домены включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой "молнии", мотива спираль-петля или биспирального мотива.

Неограничивающие изобретение примеры мультивимеризующих доменов, которые могут быть использованы в антагонистах IL-33 из настоящего изобретения, включают человеческий IgG1 Fc (SEQ ID NO: 9) или Fc IgG2a мыши (SEQ ID NO: 10). Настоящее изобретение включает в себя антагонисты IL-33, содержащие компоненты M, с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой из типовых аминокислотных последовательностей компонентов M, упоминаемой в настоящем документе (например, SEQ ID NO: 9 или 10).

В некоторых вариантах реализации изобретения антагонисты IL-33 по настоящему изобретению содержат два мультивимеризующих домена, M1 и M2, при этом M1 и M2 идентичны друг другу. Например, M1 может быть доменом Fc, имеющим определенную аминокислотную последовательность, а M2 представляет собой домен Fc с такой же аминокислотной последовательностью, что и M1.

В некоторых альтернативных вариантах реализации изобретения антагонисты IL-33 по данному изобретению содержат два мультивимеризующих домена, M1 и M2, которые отличаются друг от друга в одном или более положении аминокислоты. Например, M1 может содержать первый иммуноглобулиновый (Ig) домен C_H3, а M2 может содержать второй домен Ig C_H3, при этом первый и второй домены Ig C_H3 отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и причем по меньшей мере одно аминокислотное отличие уменьшает связывание целевой конструкции с белком A по сравнению с эталонной конструкцией, имеющей идентичные последовательности M1 и M2. В одном варианте реализации изобретения домен Ig C_H3 M1 связывает белок A, а домен Ig C_H3 M2 содержит мутацию, которая уменьшает или блокирует связывания белка A, такую как модификация H95R (по нумерации экзона IMGT; H435R по нумерации EC). C_H3 M2 может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EC). Дальнейшие модификации, которые могут быть обнаружены в C_H3 M2 включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EC) в случае домена IgG1 Fc; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EC) в случае домена IgG2 Fc; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EC) в случае домена IgG4 Fc.

Ориентация и расположение компонентов антагонистов IL-33.

Отдельные компоненты антагонистов IL-33 по настоящему изобретению (например, D1, D2, M и т.д.) могут быть расположены относительно друг друга различными способами, примеры которых подробно описаны в других разделах настоящего документа. Мультивимеризующие домены (M1 и/или M2) могут представлять собой пептид или полипептид, имеющий N-конец и C-конец. Таким образом, компоненты D1 и D2 могут быть прикреплены к компоненту M либо на N- или C-конце компонента M. Например, D1 может быть прикреплен к N-концу M (представлено как "D1-M"). Как вариант, D1 может быть прикреплен к C-концу M (представлено как "M-D1"). В некоторых вариантах реализации изобретения D2 прикреплен к N-концу M (представлено как "D2-M"), или D2 прикреплен к C-концу M (представлено как "M-D2"). В других вариантах реализации изобретения D1 прикреплен к N-концу D2, а D2 прикреплен к N-концу M (представлено как "D1-D2-M"). Другие типовые расположения отдельных компонентов, от N-к C-концу, могут, таким образом, быть представлены как; D2-D1-M; M-D1; M-D2; M-D1-D2; M-D2-D1; D1-M-D2; D2-M-D1 и т.д.

В вариантах реализации изобретения, включающих два различных мультивимеризующих домена (M1 и M2), один или несколько IL-33-связывающих доменов могут быть прикреплены к мультивимеризующим доменам в различных расположениях. Неограничивающие примеры таких расположений схематически изображены на фигуре. Например, настоящее изобретение включает в себя антагонисты IL-33, содержащие первый IL-33-связывающий домен (D1), который прикреплен к первому мультивимеризующему домену (M1), и второй IL-33-связывающий домен (D2), который прикреплен ко второму мультивимеризующему домену (M2). Антагонисты IL-33 по изобретению могут также включать один или более дополнительных

IL-33-связывающих доменов (например, D3, D4 и т.д.). Например, если третий IL-33-связывающий домен (D3) включен, компонент D3 может быть прикреплен к D1 или M1; аналогично, если четвертый IL-33-связывающий домен (D4) включен, компонент D4 может быть прикреплен к D2 или M2.

В вариантах реализации изобретения, включающих несколько IL-33-связывающих доменов, два или более IL-33-связывающих доменов могут быть идентичными или по существу идентичными друг с другом. Например, в одном варианте реализации изобретения, включающем четыре IL-33-связывающих домена (D1, D2, D3 и D4), D1 и D2 могут быть идентичными или по существу идентичными друг другу; и D3 и D4 могут быть идентичными или по существу идентичными друг другу и т.д.

Неограничивающие иллюстративные примеры антагонистов IL-33 по изобретению, содержащих два мультимеризующих домена (M1 и M2) и четыре IL-33-связывающих домена (D1, D2, D3 и D4), показаны на фигуре, расположения С и D). В типовых расположениях такого рода, D1 прикреплен к N-концу M1, D2 прикреплен к N-концу M2, D3 прикреплен к N-концу D1, и D4 прикреплен к N-концу D2. На панели С представлена ситуация, когда D1 и D2 идентичны друг другу (например, каждый содержит внеклеточный домен IL-1RAcP), и D3 и D4 идентичны друг другу (например, каждый содержит внеклеточный домен ST2). На панели С представлена ситуация, когда D1 и D2 не идентичны, и D3 и D4 не идентичны. Многочисленные другие расположения будут очевидны для обычного специалиста в данной области техники после рассмотрения данного документа и включены в объем настоящего изобретения.

Линкеры.

Отдельные компоненты антагонистов IL-33 из настоящего изобретения (например, D1, D2, M1, M2 и т.д.) могут быть прикреплены друг к другу непосредственно (например, D1 и/или D2 может быть непосредственно прикреплен к M и т.д.); в альтернативном варианте отдельные компоненты могут быть прикреплены друг к другу с помощью линкерного компонента (например, D1 и/или D2 может быть прикреплен к M посредством линкера, ориентированного между отдельными компонентами; D1 может быть прикреплен к D2 посредством линкера; и т.д.). В любом расположении, описанном в настоящем документе, при котором один компонент описан как "прикрепленный" к другому компоненту, прикрепление может осуществляться посредством линкера (даже если он специально не обозначен как таковой). В данном контексте "линкер" означает любую молекулу, которая соединяет два полипептидных компонента вместе. Например, линкер может быть пептидом, содержащим от 1 до 20 аминокислот, соединенных вместе пептидными связями. (Пептидная связь, сама по себе, однако, не рассматривается как "линкер" для целей настоящего изобретения). В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит стерически незатрудненные аминокислоты, такие как глицин и аланин. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой гибкую цепь аминокислот, устойчивую к протеолитической деградации. Линкер может содержать две молекулярных структуры, которые взаимодействуют друг с другом. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения линкер может содержать компонент стрептавидин и компонент биотин; связь между стрептавидином (прикрепленным к одному компоненту) и биотином (прикрепленным к другому компоненту) служит в качестве прикрепления между отдельными компонентами антагонистов IL-33. Типовые примеры антагонистов IL-33, описанные в настоящем документе, такие как hST2-hIL1RAcP-mFc и mST2-mlIL1RAcP-mFc включают серин-глициновый (SG) линкер между компонентом IL-1RAcP и мультимеризующим доменом Fc. Другие аналогичные расположения линкера и конфигурации, включающие линкеры, находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Биологические характеристики антагонистов IL-33.

Настоящее изобретение включает в себя антагонистов IL-33, которые связывают растворимые молекулы IL-33 с высокой аффинностью. Например, настоящее изобретение включает в себя антагонисты IL-33 (как описано в настоящем документе в другом месте), которые связывают IL-33 (например, при 25°C или 37°C) со значением K_D менее чем около 400 пМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонансного анализа, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 2 настоящего документа. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонисты IL-33 по настоящему изобретению связывают IL-33 со значением K_D менее чем около 200 пМ, менее чем около 100 пМ, менее чем около 90 пМ, менее чем около 80 пМ, менее чем около 70 пМ, менее чем около 60 пМ, менее чем около 50 пМ, менее чем около 40 пМ, менее чем около 30 пМ, менее чем около 20 пМ, менее чем около 10 пМ, менее чем около 9 пМ, менее чем около 8 пМ, менее чем около 6 пМ или менее чем около 1 пМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонансного анализа, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 2 настоящего документа, или по существу, аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает в себя антагонистов IL-33, которые специфически связывают IL-33 со значением диссоциативного периода полураспада ($t_{1/2}$), равным около 4 мин или больше, измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 25 или 37°C, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 2 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонисты IL-33 из настоящего изобретения связывают IL-33 со значением $t_{1/2}$, более чем около 10 мин, более чем около 20 мин, более чем около 30 мин, более чем около 40 мин, более чем около 50 мин, более чем около 60 мин или более

чем около 70 мин, или более чем около 500 мин, или более чем около 1000 мин, измеренным в поверхностном плазмонном резонансном анализе при температуре 25 или 37°C, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 2 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает в себя антагонистов IL-33, которые блокируют связывание IL-33 с IL-33-рецептором (например, ST2). Например, настоящее изобретение включает в себя антагонистов IL-33, которые блокируют связывание IL-33 с ST2 *in vitro*, со значением IC₅₀ менее чем около 115 пМ, измеренным с помощью иммуноанализа на основе ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонисты IL-33 из настоящего изобретения блокируют связывание IL-33 с ST2 *in vitro*, со значением IC₅₀ менее чем около 120 пМ, менее чем около 90 пМ, менее чем около 80 пМ, менее чем около 70 пМ, менее чем около 60 пМ, менее чем около 50 пМ, менее чем около 40 пМ, менее чем около 30 пМ, менее чем около 20 пМ, менее чем около 18 пМ, менее чем около 16 пМ, менее чем около 14 пМ, менее чем около 12 пМ, менее чем около 10 пМ, менее чем около 9 пМ, менее чем около 8 пМ или менее чем около 7 пМ, измеренным с помощью иммуноанализа на основе ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает в себя антагонисты IL-33, которые ингибируют IL-33-опосредованную клеточную передачу сигнала. Например, настоящее изобретение включает в себя антагонисты IL-33, которые ингибируют IL-33-опосредованную передачу сигнала в клетках, экспрессирующих человеческий ST2, со значением IC₅₀ менее чем около 500 пМ, измеренным в блокирующем биоанализе на основе клеток, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 4 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонисты IL-33 из настоящего изобретения блокируют IL-33-опосредованную передачу сигналов в клетках, экспрессирующих человеческий ST2, со значением IC₅₀ менее чем около 400 пМ, менее чем около 300 пМ, менее чем около 200 пМ, менее чем около 100 пМ, менее чем около 80 пМ, менее чем около 60 пМ, менее чем около 40 пМ, менее чем около 30 пМ, менее чем около 20 пМ, менее чем около 18 пМ, менее чем около 16 пМ, менее чем около 14 пМ, менее чем около 12 пМ, менее чем около 10 пМ, менее чем около 8 пМ, менее чем около 7 пМ, менее чем около 6 пМ, менее чем около 5 пМ, менее чем около 4 пМ, менее чем около 3 пМ, менее чем около 2 пМ или менее чем около 1,5 пМ, измеренным в блокирующем биоанализе на основе клеток, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 4 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

Антагонисты IL-33, которые ингибируют IL-33-индуцированную активацию базофилов, и антагонисты IL-33, которые ингибируют IL-33-индуцированное высвобождение IFN-гамма из человеческих МКПК. Базофильная активация может быть определена как дегрануляция, экспрессия маркера поверхности клетки, высвобождение цитокинов и других иммунных медиаторов, таких как гистамин и лейкотриены. Антагонисты IL-33 из настоящего изобретения могут обладать одной или несколькими из указанных выше биологических характеристик, или какими-либо их комбинациями. Другие биологические характеристики антител настоящего изобретения будут очевидны для обычного специалиста в данной области техники при рассмотрении настоящего описания с его рабочими примерами.

Терапевтический состав и введение.

В настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая антагонисты IL-33 из настоящего изобретения. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, которые обеспечивают улучшенную передачу, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих составов можно найти в фармакологическом справочнике, известном всем фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, жиры, липид (катионный или анионный), содержащий везикулы (например, LIPOFECTIN®, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), конъюгаты ДНК, безводные впитываемые пасты, эмульсии "масло-в-воде" и "вода-в-масле", карбовакс (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антагониста IL-33, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и площади поверхности тела пациента, установленной болезни, состояния, пути введения и тому подобное. Предпочтительная доза, как правило, рассчитывается согласно массе тела или площади поверхности тела. Если антагонист IL-33 из настоящего изобретения применяют для лечения состояния или заболевания, связанного с активностью IL-33 у взрослого пациента, может быть предпочтительным внутривенное введение антагониста из настоящего изобретения, как правило, в разовой дозе от около 0,01 до около 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от около 0,02 до около 7, от около 0,03 до около 5 или от около 0,05 до около 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния, частота и длительность лечения могут быть скорректированы. Эффективные дозы и режимы введения антагониста IL-33 можно

определить эмпирически. Например, улучшение состояния пациента можно контролировать при периодической оценке, и соответствующим образом корректировать дозу. Кроме того, можно выполнить межвидовое масштабирование дозировок с помощью хорошо известных способов в данной области техники (например, Mordenti et al., 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351). Известны различные системы доставки, которые могут быть использованы для введения фармацевтической композиции по данному изобретению, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, эндцитоз, опосредованный рецептором (см., например, Wu et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Способы введения включают, без ограничения, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное, подкожное, интраназальное, эпидуральное и оральное введение. Композицию можно вводить любым удобным способом, например путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые накладки (например, на слизистую оболочку полости рта, прямой кишки, кишечника и т.д.) и вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть введена подкожно или внутривенно с использованием стандартной иглы и шприца. Кроме того, для подкожного введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению находит широкое применение приспособление "шприц-ручка". Такое приспособление может быть многоразового или одноразового использования. В многоразовых приспособлениях для введения типа "шприц-ручка", как правило, используется сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. Когда вся фармацевтическая композиция из картриджа введена и картридж пуст, его можно легко снять и заменить на новый, который содержит фармацевтическую композицию. Приспособление для введения типа "шприц-ручка" может быть использовано повторно. В одноразовом приспособлении для введения типа "шприц-ручка" сменные картриджи не предусмотрены. Чаще одноразовые приспособления для введения типа "шприц-ручка" поставляются уже с предварительно заполненным фармацевтической композицией резервуаром внутри устройства. После того, как фармацевтическая композиция в резервуаре заканчивается, все устройство утилизируется.

Для подкожного введения фармацевтической композиции из настоящего изобретения используются многочисленные многоразовые устройства типа "шприц-ручка" и автоинжекторы. Примеры включают, но не ограничиваются ими, AUTOPEN® (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC® (Disetronic Medical Systems, Бергдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25®, шприц-ручку HUMALOG®, шприц-ручку HUMALIN 70/30® (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN® I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR® (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD® (Becton Dickinson, Франклин Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN®, OPTIPEN PRO®, OPTIPEN STARLET® и OPTICLIK® (sanofi-aventis, Франкфурт, Германия), называя только некоторые из них. Примеры одноразовых приспособлений, имеющих применение для подкожного введения фармацевтической композиции из настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются ими: шприц-ручку SOLOSTAR® (sanofi-aventis), FLEXPEN® (Novo Nordisk), KWIKPEN® (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK® (Amgen, Таузенд-Оукс, Калифорния), PENLET® (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.), шприц-ручку HUMIRA® (Abbott Labs, Эбботт Парк, Иллинойс), называя только некоторые из них.

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть введена с помощью системы с контролируемым высвобождением. В одном варианте реализации изобретения может использоваться насос (см. Langer, supra; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201). В другом варианте реализации изобретения могут использоваться полимерные материалы; см., *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Бока-Ратон, Флорида. В еще одном варианте реализации изобретения система с регулируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от цели композиции, таким образом, требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, p. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти препараты для инъекций могут быть получены широко известными способами. Например, препараты для инъекций могут быть получены путем растворения, суспендирования или эмульгирования антагониста или его соли, описанного выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций применяют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу, и другие вспомогательные агенты и т.п., которые могут быть использованы в комбинации с соответствующим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтилен (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. Для масляной среды применяются, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые могут быть использованы в сочетании с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.п. Веществом для инъекции, полученным таким образом, предпочтитель-

но наполняют соответствующую ампулу.

Фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, успешно готовят в лекарственных формах в виде унифицированной дозы, приспособленной для соответствия дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в виде унифицированной дозы включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество вышеупомянутой содержащейся молекулы антагониста обычно составляет от около 5 до около 500 мг на лекарственную форму в виде унифицированной дозы, особенно в виде инъекции; предпочтительно, чтобы количество вышеупомянутой содержащейся молекулы антагониста составляло от около 5 до около 100 мг, и от около 10 до около 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтическое применение антагонистов IL-33.

Эксперименты, проведенные авторами настоящего изобретения, способствовали выявлению различных заболеваний и состояний, которые можно лечить, предотвращать и/или улучшать путем антагонизма IL-33. Например, гидродинамическая доставка мышиной ДНК IL-33 была причиной индукции накопления слизи в легких и увеличения уровня общего сывороточного IgE у мышей. Кроме того, доставка ДНК mL-33 приводила к положительной регуляции ST2 и различных последующих цитокинов, что измерялось с помощью микроматричного анализа. Эксперименты, проведенные авторами настоящего изобретения с использованием нокаут-мышей с IL-33, также выявили различные потенциальные терапевтические преимущества антагонизма IL-33. Например, макроскопические царапины и кожные инфильтраты оказались сопоставимы между мышами дикого типа и мышами IL-33^{-/-} в модели IMQ (имиквимод)-индуцированного псориаза. Кроме того, у мышей с IL-33^{-/-} наблюдалось снижение эозинофилии и накопления остаточной слизи в модели аллерген-индуцированного воспаления легких. Антагонисты IL-33 по изобретению применимы, в частности, для лечения, профилактики и/или улучшения любого заболевания или патологии, связанных или опосредованных экспрессией IL-33, передачей сигнала или поддающимися лечению с помощью блокирования взаимодействия между IL-33 и IL-33-лигандом (например, ST2) или ингибирования активности IL-33 и/или передачи сигнала иным образом. Например, настоящее изобретение предлагает способы лечения инфекционных заболеваний (например, инфекции, вызванной лейшманией (*Leishmania*); инфекции, вызванной власоглавом (*Trichuris*); инфекции, вызванной микобактерией (*Mycobacterium*); инфекции, вызванной листерией (*Listeria*); инфекции, вызванной токсоплазмой (*Toxoplasma*); инфекции, вызванной шистосомой (*Schistosoma*); инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом; инфекции, вызванной вирусом гриппа и т.д.); астмы (например, эозинофильной или неэозинофильной астмы; астмы, резистентной к стероидам; астмы, чувствительной к стероидам; аллергической астмы; неаллергической астмы; тяжелой не поддающейся лечению астмы; приступов астмы [например, вирус- или аллерген-индуцированных] и т.д.); атопического дерматита, псориаза, других воспалительных заболеваний; аллергии; анафилаксии; сердечно-сосудистых заболеваний; заболеваний центральной нервной системы; боли артрита (например, ревматоидного артрита, остеоартрита, псориатического артрита и т.д.); гигантоклеточного артериита; воспалительных заболеваний кишечника (например, болезни Крона или язвенного колита); рассеянного склероза; аллергического ринита; эозинофильного эзофагита; васкулита и пурпуры Геноха-Шенлейна. Антагонисты IL-33 по настоящему изобретению также применимы для лечения, профилактики и/или улучшения одного или более фиброзных заболеваний. Примеры фиброзных заболеваний, которые поддаются лечению путем введения антагонистов IL-33 по данному изобретению, включают фиброз легких (например, идиопатический фиброз легких, блеомин-индуцированный фиброз легких, асбест-индуцированный фиброз легких, бронхиолитический облитерирующий синдром), хроническую астму, фиброз, связанный с острым повреждением легких и острым респираторным дистресс-синдромом (например, аллерген-индуцированный фиброз, фиброз, индуцированный бактериальной пневмонией, фиброз, индуцированный травмой, фиброз, индуцированный вирусной пневмонией, вентилятор-индуцированный фиброз, фиброз, индуцированный нелегочным сепсисом, и фиброз, индуцированный аспирацией), силикоз, радиационно-индуцированный фиброз, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ, включая обострения ХОЗЛ или ХОЗЛ, которое возникло вследствие активного или пассивного курения или частично им вызвано), глазной фиброз, фиброз кожи (например, склеродермия), фиброз печени (например, цирроз печени, алкоголь-индуцированный фиброз печени, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ, NASH), патологию желчных протоков, первичный билиарный цирроз, фиброз печени, индуцированный инфекциями или вирусами [например, хроническая ВГС-инфекция], аутоиммунный гепатит, фиброз почки (почечный фиброз), фиброз сердца, атеросклероз, стент-рестеноз и миелофиброз.

В контексте способов лечения, описанных в настоящем документе, антагонисты IL-33 можно вводить в виде монотерапии (т.е. в качестве единственного терапевтического агента) или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами (примеры которых описаны в других разделах настоящего документа).

Комбинированные методы лечения и составы.

Настоящее изобретение включает композиции и терапевтические составы, содержащие любой из антагонистов IL-33, описанных в настоящем документе, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, включающие введение таких комбина-

ций пациентам, которые нуждаются в этом. Антагонисты IL-33 по настоящему изобретению также могут быть скомбинированы и/или вводиться в сочетании, например, с ингибиторами цитокинов или антагонистами, в том числе низкомолекулярными ингибиторами цитокинов и антителами, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-26, IL-31, двойным антагонистом IL-4/IL-13, антагонистом IL-12/IL-23, ингибитором PDE4 (в одном из вариантов реализации изобретения, пероральным ингибитором PDE4), и другим антагонистом IL-33 или антителом к другому IL-33, тимусным стромальным лимфопоэтином (TSLP) или антагонистами соответствующих рецепторов.

Антагонисты IL-33 по данному изобретению могут быть также введены и/или скомбинированы в сочетании с противовирусными препаратами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами, стероидами, кислородом, антиоксидантами, металлохелатами, IFN-гамма и/или НПВП, бронхиальным дилататором, антигистаминным средством, адреналином или противоотечным средством.

Дополнительный терапевтически активный компонент (компоненты) можно вводить непосредственно перед, одновременно или вскоре после введения антагониста IL-33 из настоящего изобретения; (для целей настоящего изобретения, такие режимы введения подразумевают введение антагониста IL-33 "в сочетании с" дополнительным терапевтически активным компонентом). Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антагонист IL-33 по данному изобретению скомбинирован с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами (компонентами), как описано в других разделах настоящего документа.

Схемы введения.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения многократные дозы антагониста IL-33 (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антагониста IL-33 и любого из дополнительных терапевтически активных агентов, упомянутых в настоящем описании) могут вводить субъекту курсом в течение определенного времени. Способы соответственно данному аспекту изобретения включают последовательное введение субъекту многократных доз антагониста IL-33 по изобретению. В данном контексте "последовательное введение" означает, что каждую дозу антагониста IL-33 вводят субъекту в другой момент времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение включает способы, которые содержат последовательное введение пациенту одной начальной дозы антагониста IL-33, за которой следует одна или более вторичных доз антагониста IL-33, и в некоторых случаях следуют одна или более третичных доз антагониста IL-33.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антагониста IL-33 по данному изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которая вводится в начале схемы лечения (также называемая "базовой дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводятся после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводятся после вторичных доз. Начальная, вторичные и третичные дозы могут содержать одинаковое количество антагониста IL-33, но, как правило, могут отличаться друг от друга по частоте введения. В некоторых вариантах реализации изобретения, однако, количество антагониста IL-33, содержащееся в начальной, вторичных и/или третичных дозах, в ходе лечения варьируется относительно друг друга (например, коррекция в сторону увеличения или уменьшения по мере необходимости). В некоторых вариантах реализации изобретения две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале курса лечения в качестве "дозы насыщения" с последующими дозами, которые вводят не так часто (например, "поддерживающие дозы"). В некоторых типовых вариантах реализации настоящего изобретения, каждую вторичную и/или третичную дозу вводят от 1 до 26 (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза" в данном контексте относится к последовательности многократного введения и означает дозу антагониста IL-33, которую вводят пациенту перед введением следующей же дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антагониста IL-33. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения, пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах реализации изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Кроме того, в некоторых вариантах реализации изобретения пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах реализации изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В вариантах реализации изобретения, включающих многократные вторичные дозы, каждая вторичная доза может быть введена с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может быть введена пациенту от 1 до 2 недель или от 1 до 2 месяцев после непосредственно предшествующей дозы. Подобным образом, в вариантах реализации изобретения, включающих несколько третичных доз, каждая третичная доза может быть введена с той же частотой, что и другие третичные

дозы. Например, каждая третичная доза может быть введена пациенту от 2 до 12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В некоторых вариантах реализации изобретения частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может изменяться согласно схеме курса лечения. Частота введения также может быть скорректирована врачом в ходе лечения в зависимости от показаний у конкретного пациента после проведения клинического обследования.

Настоящее изобретение включает схемы введения, в которых от 2 до 6 доз насыщения вводят пациенту с первой частотой (например, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз каждые три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца и т.д.), с последующим введением пациенту двух или более поддерживающих доз не так часто. Например, в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения, если дозы насыщения вводят с частотой один раз в месяц, то поддерживающие дозы можно вводить пациенту один раз в шесть недель, один раз в два месяца, один раз в три месяца и т.д.).

Примеры

Следующие примеры представлены таким образом, чтобы обеспечить специалистам в данной области техники полное понимание и описание того, как создавать и использовать способы и композиции по данному изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы считают своим изобретением. Были предприняты усилия, чтобы обеспечить точность в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1. Конструкция антагонистов IL-33.

Пять различных типовых антагонистов IL-33 по данному изобретению были сконструированы с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Первый антагонист IL-33 (hST2-hFc, SEQ ID NO: 1) состоит из растворимой внеклеточной области человеческого ST2 (SEQ ID NO: 5), слитого на своем С-конце с N-концом Fc-области человеческого IgG1 (SEQ ID NO: 9). Второй антагонист IL-33 (hST2-mFc, SEQ ID NO: 2) состоит из растворимой внеклеточной области человеческого ST2 (SEQ ID NO: 5), слитого на своем С-конце с N-концом Fc-области IgG2a мыши (SEQ ID NO: 10). Третий антагонист IL-33 (hST2-hIL1RAcP-mFc, SEQ ID NO: 3) состоит из линейного слияния, имеющего человеческий ST2 (SEQ ID NO: 5) на своем N-конце, с последующей внеклеточной областью человеческого IL-1RAcP (SEQ ID NO: 7), за которой следует IgG2a Fc мыши (SEQ ID NO: 10) на своем С-конце. Четвертый антагонист IL-33 (mST2-mIL1RAcP-mFc, SEQ ID NO: 4) состоит из линейного слияния, имеющего ST2 мыши (SEQ ID NO: 6) на своем N-конце, с последующей внеклеточной областью IL-1RAcP мыши (SEQ ID NO: 8), за которой следует IgG2a Fc мыши (SEQ ID NO: 10) на своем С-конце. Пятый антагонист IL-33 (hST2-hIL1RAcP-hFc, SEQ ID NO: 13) состоит из линейного слияния, имеющего человеческий ST2 из SEQ ID NO: 5 на своем N-конце, с последующей внеклеточной областью человеческого IL-1RAcP (SEQ ID NO: 7), за которой следует человеческий IgG1 Fc (SEQ ID NO: 9) на своем С-конце. В табл. 1a изложено краткое описание различных антагонистов IL-33 и их составных частей. В табл. 1b приведены аминокислотные последовательности антагонистов IL-33 и их составных частей.

Таблица 1a

Краткое описание антагонистов IL-33

Антагонист IL-33	Аминокислотная последовательность полной молекулы антагониста	Компонент D1	Компонент D2	Компонент M
hST2-hFc	SEQ ID NO:1	Человеческий ST2 внеклеточный (SEQ ID NO:5)	Отсутствует	Человеческий IgG1 Fc (SEQ ID NO:9)
hST2-mFc	SEQ ID NO:2	Человеческий ST2 внеклеточный (SEQ ID NO:5)	Отсутствует	Мышиный IgG2a Fc (SEQ ID NO:10)
hST2-hIL1RAcP-mFc	SEQ ID NO:3	Человеческий ST2 внеклеточный (SEQ ID NO:5)	Человеческий IL-1RAcP внеклеточный (SEQ ID NO:7)	Мышиный IgG2a Fc (SEQ ID NO:10)
mST2-mIL1RAcP-mFc	SEQ ID NO:4	Мышиный ST2 внеклеточный (SEQ ID NO:6)	Мышиный IL-1RAcP внеклеточный (SEQ ID NO:8)	Мышиный IgG2a Fc (SEQ ID NO:10)
hST2-hIL1RAcP-hFc	SEQ ID NO: 13	Человеческий ST2 внеклеточный (SEQ ID NO:5)	Человеческий IL-1RAcP внеклеточный (SEQ ID NO:7)	Человеческий IgG1 Fc (SEQ ID NO:9)

Аминокислотные последовательности

Идентификатор	Последовательность
SEQ ID NO:1 (hST2-hFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQL LKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSE KNSKIYCPTIDLYNWTAPELWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEADAGDYT CKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKANLTC SACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNSQSFNGLACLDMVLR ADVKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSKDTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PRPEQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:2 (hST2-mFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQL LKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSE KNSKIYCPTIDLYNWTAPELWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEADAGDYT CKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKANLTC SACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNSQSFNGLACLDMVLR ADVKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHSEPRGPTIKPCPPCKCP APNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMLSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHT AQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN TEPVLDSGDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG K
SEQ ID NO:3 (hST2-hL1RA cP-mFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQL LKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSE KNSKIYCPTIDLYNWTAPELWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEADAGDYT CKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKANLTC SACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNSQSFNGLACLDMVLR ADVKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHSSERCDDWGLDMRQI QVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSSTAHSAGLTLIYWYTRQDRDLEEFNFRLEN RISKEKDVLFWRPTLLNDTGNITCMLRNTTYCSKVAFPLEVVQKDSFCNSPMKL PVHKLIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTITWYMGCYKIQNFNNVIPEGMNLISFL IALISNNGNYTCVVYPENGRTHLRLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVE KEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISHSRTEDET RTQILSIKKTSEDLKRSYVCHARSAGEVAKAAKVKQKVPAPRYTVESGEPGRG PTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMLSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQI SWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDL LPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSGDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO:4 (mST2-mL1R AcP-mFc)	SKSSWGLENEALIVRCPRGRSTYVVEWYYSQTNKSIPTQKRNRIFVSRDLKFL LPAVVEDSGIYACVIRSPNLNKTGYLNVTHKKPPSCNIPDYLMYSTVIRGSDKNF KITCPTIDLYNWTAPELWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEADAGDYT THAENGTNYIVTATRSFTVEEKGFSMFPVITNPPYNTMEVEIGKPASIASACF GKGSFLADVLWQINKTVVGNFGEARIQEEEGRNESSNDMDCLTSVLRLITGVT EKDLSLEYDCLALNLHGMIRHTIRLRKQPIDHRSERCDDWGLDMRQIQVFED EPARIKCPLEHFLKFNYSSTAHSAGLTLIYWYTRQDRDLEEFNFRLENRISKEK DVLWFRPTLLNDTGNITCMLRNTTYCSKVAFPLEVVQKDSFCNSAMRFPVHKM YIEHGIHKITCPNVDGYFPSSVKPSVTWYKGCETEIVDFHNVLPPEGMNLISFLPLV SNGNYTCVVYPENGRTHLRLTRTLTVKVVGSPKDALPPQIYSPNDRVVEYKEPG

	EELVIPCKVYFSFIMDSHNEVWWTIDGKKPDDVTVDITINESVSYSSTEDETRTQI LSIKKVTPEDLRRNYVCHARNTKGEAEQAQAVKQKVIIPRYTVESEGEPRGPTIKP CPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWV NNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPI ERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWNTNGK TELNYKNTEPVLDSGGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSVSVVHEGLHNHHTTK SFSRTPGK
SEQ ID NO:5 (человеческий ST2 внеклеточный домен)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQL LKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVDPDYLMYSTVSGSE KNSKIYCTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEDAGDYT CKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKANLTC SACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQEEEGQNSFSNGLACLDMLVRI ADVKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHS
SEQ ID NO:6 (мышинный ST2 внеклеточный домен)	SKSSWGLENEALIVRCPRQGRSTYPVEWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQL LPAVVEDSGIYACVIRSPNLNKTGYLNVTHKKPPSCNIPDYLMYSTVSGSDKNF KITCPTIDLYNWTAPVQWFKNCALQEPFRFRAHRSYLFIDNVTHDDEGDYTCQF THAENGTYIVTATRSFTVEEKGFMSFPVITNPPYNHTMEVEIGKPAIACSACF GKGSFLADVWQINKTVVGNFGARIQEEEGRNESNDMDCLTSVLRITGV EKDLSLEYDCLALNLHGMIRHTIRLRKQPIDHR
SEQ ID NO:7 (человеческий IL1RAcP внеклеточный домен)	SERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLIYWYTR QDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVWFRPTLLNDTGNVTCMLRNTTYCSKVAFPL EVVQKDSFCNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVGDYFPSSVKPTITWYMGCKY QNFNNVIPEGMNL SFLIALISNNGNYTCVVYTPENGRTFHLTRTLTKVVGSPK AVPPVIHSPNDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITI DVTINESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAAVKQK VPAPRYTVE
SEQ ID NO:8 (мышинный IL1RAcP внеклеточный домен)	SERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLIYWYTR QDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVWFRPTLLNDTGNVTCMLRNTTYCSKVAFPL EVVQKDSFCNSAMRFPVHKMYIEHGIHKITCPNVGDYFPSSVKPSVTVYKGT IVDFHNVLP EGMNLSFFIPLVSNNGNYTCVVYTPENGRFLHLTRTVTKVVGSPK DALPPQIYSPNDRVVVEKEPGEELVIPCKVYFSFIMDSHNEVWWTIDGKKPDDV TVDITINESVSYSSTEDETRTQILSIKKVTPEDLRRNYVCHARNTKGEAEQAQAVK QKVIIPRYTVE
SEQ ID NO:9 (человеческий IgG1 Fc)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:10 (мышинный IgG2a Fc)	EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDD PDVQISWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKV NNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIY VEWNTNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSVSVVHE GLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO:11 (<i>M. fascicularis</i> IL-33-6His)	SITGISPITESLASLSTYNDQSITFALEDESIEYVEDLKKDKKKDKVLLSYYESQH PSESGDGVGDKMLMVTLSPTKDFWLQANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFVVLH NRSFNCVSFECKTDPGVFIGVDKNHLALIKVDYSENLSGSENLFLKLEIHHHHH H
SEQ ID NO:13 (hST2-hIL1RA cP-hFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFA SGQLLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVDPDYL MYSTVSGSEKNSKIYCTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFL VIDNVMTEDAGDYTCCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGA PAQNEIKEVEIGKANLTC SACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRI QEEEGQNSFSNGLACLDMLVRIADVKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHT VRLSRKNPIDHHSERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFN
	YSTAHSAGLTLIYWYTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVWFRPTLLN DTGNVTCMLRNTTYCSKVAFPLEVQKDSFCNSPMKLPVHKLYIEYGIQR ITCPNVGDYFPSSVKPTITWYMGCKYIQNFNVIPEGMNL SFLIALISNNG NYTCVVYTPENGRTFHLTRTLTKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEP GEELLIPCTVYFSLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISHSRTEDE TRTQILSIKKVTSSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAAVKQKVPAPRYTVE KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Некоторые биологические свойства типовых антагонистов IL-33, получаемых в соответствии с этим Примером, подробно описаны в примерах, приведенных ниже.

Пример 2. Связывание антагонистов IL-33 с IL-33 человека, мыши и обезьяны, определяемое с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Значения равновесных констант диссоциации (величины K_D) связывания человеческого IL-33 (R&D Systems, #3626-IL-010/CF), мышинного IL-33 (R&D Systems, #3626-ML-010/CF) и IL-33 обезьяны, экспрессированных С-концевым гексагистидиновым маркером (MfIL-33-6His; SEQ ID NO: 12) с очищенными белками-ловушками IL-33 и рецепторными белками ST2, определяли, используя биосенсор поверхностного плазмонного резонанса аппарата Biacore T-200 в режиме реального времени при 25°C и/или при 37°C. Поверхность сенсора Biacore вначале была дериватизирована аминным соединением с поликлональным анти-мышинным антителом кролика (GE, #BR-1008-38) или моноклональным анти-человеческим антителом Fc мыши (GE, #BR-1008-39) с целью иммобилизации белков-ловушек IL-33 и рецепторных белков с С-концевым маркером Fc мышинного IgG2a или С-концевым маркером Fc человеческого IgG1 соответственно. Кинетические эксперименты проводились в 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА и 0,005% v/v Сурфактанта Твин-20 (подвижный буфер HBST). Различные concentra-

ции человеческого IL-33, мышиноного IL-33 или MfIL-33-6His, приготовленные в подвижном буфере HBST (в пределах от 60 нМ до 27,4 пМ, в 3-кратных разбавлениях - для белков-ловушек, и в пределах от 60 нМ до 0,25 нМ, в 3-кратных разбавлениях - для рецепторных белков ST2), вводили через поверхность иммобилизованных белков-ловушек IL-33 и рецепторных белков при скорости потока 50 мкл/мин. Ассоциативную связь различных белков IL-33 с различными иммобилизованными поверхностями контролировали в течение 7 мин для белков-ловушек или в течение 4 мин для рецепторных белков ST2, а их диссоциацию в подвижном буфере HBST - в течение 14 мин для белков-ловушек или 8 мин для рецепторных белков ST2. Параметры кинетических констант ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем построения сенсограмм связывания в режиме реального времени в модели связывания 1:1 с использованием Скруббера 2.0с с программным обеспечением для обработки кривых. Равновесные константы связывания при диссоциации (K_D) и диссоциативный период полужизни ($t_{1/2}$) рассчитывались из кинетических констант скоростей, как

$$K_D (M) = k_d/k_a \quad \text{и} \quad t_{1/2} (\text{мин}) = \ln(2)/(60 \cdot k_d)$$

Кинетические параметры связывания белков-ловушек IL-33 с IL-33 человека, обезьяны и мыши при 25 и 37°C приведены в табл. 2-7, вместе с тем кинетические параметры связывания рецепторных белков ST2 с IL-33 человека и мыши при 25°C приведены в табл. 2 и 6. Как показано в табл. 2, белки-ловушки и рецепторные белки IL-33 связывают человеческий IL-33 со значениями K_D в пределах от около 0,53 до 54 пМ при 25°C. Как показано в табл. 3, белки-ловушки IL-33 связывают человеческий IL-33 со значениями K_D в пределах от около 0,569 до 353 пМ при 37°C. Как показано в табл. 4, белки-ловушки IL-33 связывают MfIL-33-6His со значениями K_D в пределах от около 0,596 до 53,5 пМ при 25°C. Как показано в табл. 5, белки-ловушки IL-33 связывают MfIL-33-6His со значениями K_D в пределах от около 0,551 до 190 пМ при 37°C. Как показано в табл. 6, белки-ловушки и рецепторные белки IL-33 связывают мышинный IL-33 со значениями K_D в пределах от около 6,1 до 102 пМ при 25°C. Как показано в табл. 7, белки-ловушки IL-33 связывают мышинный IL-33 со значениями K_D в пределах от около 2,78 до 93,3 пМ при 37°C.

Таблица 2

Кинетические параметры связывания человеческого IL-33 с белками-ловушками IL-33 человека, белками-ловушками IL-33 мыши и рецепторными белками ST2 человека при 25°C

Иммобилизованный аналит	Количество иммобилизованного аналита (RU)	60 нМ Связывание человеческого IL-33 (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
hST2-hIL1RAc P-hFc	276 ± 0,7	19	1,89E+07	1,00E-05*	5,30E-13*	1155*
hST2-hIL1RAc P-mFc	256 ± 2,9	28	1,92E+07	6,32E-05	3,29E-12	183
mST2-mIL1RAc P-mFc	233 ± 3,0	22	1,82E+07	1,29E-03	7,09E-11	9
hST2-hFc	230 ± 7,7	25	5,90E+06	3,20E-04	5,40E-11	36
hST2-mFc	255 ± 6,6	24	5,72E+06	3,07E-04	5,36E-11	38

* В экспериментальных условиях диссоциации IL-33 из иммобилизованного моноклонального антитела не наблюдалось, поэтому значение k_d зафиксировано 1.00E-05, а производные значения $t_{1/2}$ и K_D представляют нижний и верхний пределы соответственно.

Таблица 3

Кинетические параметры связывания человеческого IL-33
с белками-ловушками IL-33 человека и мыши при 37°C

Иммобилизи- рованный аналит	Количество иммобилизи- рованного аналита (RU)	60 нМ связывание человеческого IL-33 (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
hST2-hIL1RAc P-hFc	339 ± 10,7	26	1,76E+07	1,00E-05*	5,69E-13*	1155*
hST2-hIL1RAc P-mFc	258 ± 4,3	28	1,82E+07	2,02E-05	1,11E-12	573
mST2-mIL1RAc P-mFc	222 ± 5,2	20	9,11E+06	3,22E-03	3,53E-10	4

* В экспериментальных условиях диссоциации IL-33 из иммобилизованного моноклонального антитела не наблюдалось, поэтому значение k_d зафиксировано 1,00E-05, а производные значения $t_{1/2}$ и K_D представляют нижний и верхний пределы соответственно.

Таблица 4

Кинетические параметры связывания IL-33 обезьяны
с белками-ловушками IL-33 человека и мыши при 25°C

Иммобилизи- рованный аналит	Количество иммобилизи- рованного аналита (RU)	60 нМ связывание IL-33 обезьяны (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
hST2-hIL1R AcP-hFc	274 ± 0,9	20	1,68E+07	1,00E-05*	5,96E-13*	1155*
hST2-hIL1R AcP-mFc	247 ± 4,1	28	1,31E+07	4,09E-05	3,13E-12	282
mST2-mIL1 RAcP-mFc	225 ± 3,6	23	4,55E+06	2,44E-04	5,35E-11	47

* В экспериментальных условиях диссоциации IL-33 из иммобилизованного моноклонального антитела не наблюдалось, поэтому значение k_d зафиксировано 1,00E-05, а производные значения $t_{1/2}$ и K_D представляют нижний и верхний пределы соответственно.

Таблица 5

Кинетические параметры связывания IL-33 обезьяны с белками-ловушками
IL-33 человека и мыши при 37°C

Иммобилизи- рованный аналит	Количество иммобилизи- рованного аналита (RU)	60 нМ связывание IL-33 обезьяны (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
hST2-hIL1R AcP-hFc	308 ± 8,2	25	1,82E+ 07	1,00E-05*	5,51E-13*	1155*
hST2-hIL1R AcP-mFc	247 ± 3	27	1,45E+ 07	4,79E-05	3,29E-12	241
mST2-mIL1 RAcP-mFc	209 ± 3,1	21	6,16E+ 06	1,17E-03	1,90E-10	10

* В экспериментальных условиях диссоциации IL-33 из иммобилизованного моноклонального антитела не наблюдалось, поэтому значение k_d зафиксировано 1,00E-05, а производные значения $t_{1/2}$ и K_D представляют нижний и верхний пределы соответственно.

Таблица 6
Кинетические параметры связывания мышинового IL-33 с белками-ловушками IL-33 человека, мышцы и рецепторными белками ST2 человека при 25°C

Иммобилизованный аналит	Количество иммобилизованного аналита (RU)	60 нМ связывание IL-33 мышцы (RU)	k_a (1/мс)	k_d (1/с)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
hST2-hIL1R AcP-hFc	272 ± 0,9	17	3,66E+06	2,23E-05	6,10E-12	517
hST2-hIL1R AcP-mFc	237 ± 2,7	22	4,67E+06	8,97E-05	1,92E-11	129
mST2-mIL1 RAcP-mFc	217 ± 1,9	22	4,73E+06	4,94E-05	1,05E-11	234
hST2-hFc	211 ± 4,4	18	4,10E+06	4,23E-04	1,02E-10	27
hST2-mFc	238 ± 4,1	18	3,97E+06	3,50E-04	8,82E-11	33

Таблица 7
Кинетические параметры связывания мышинового IL-33 с белками-ловушками IL-33 человека и мышцы при 37°C

Иммобилизованный аналит	Количество иммобилизованного аналита (RU)	60 нМ связывание IL-33 мышцы (RU)	k_a (1/мс)	k_d (1/с)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
hST2-hIL1R AcP-hFc	280 ± 7,7	18	3,60E+06	1,00E-05*	2,78E-12*	1155*
hST2-hIL1R AcP-mFc	236 ± 3,2	21	3,39E+06	3,17E-04	9,33E-11	36
mST2-mIL1 RAcP-mFc	199 ± 2,8	20	6,00E+06	1,28E-04	2,13E-11	90

* В экспериментальных условиях диссоциации IL-33 из иммобилизованного моноклонального антитела не наблюдалось, поэтому значение k_d зафиксировано 1,00E-05, а производные значения $t_{1/2}$ и K_D представляют нижний и верхний пределы соответственно.

Пример 3. Антагонисты IL-33 блокируют связывание IL-33 с человеческим рецептором ST2.

Способность типовых антагонистов IL-33 по настоящему изобретению блокировать связывание человеческого IL-33 (hIL-33) с рецептором ST2 человека измеряли с использованием конкурентного твердофазного иммуоферментного "сэндвич"-анализа ("сэндвич"-ELISA). Часть внешнего домена человеческого белка ST2, который экспрессировался С-концевым мышинным маркером Fc (SEQ ID NO: 2), была нанесена в концентрации 1 мкг/мл в буфер ФСБ на 96-луночный микротитрационный планшет на ночь при 4°C. Неспецифические участки связывания были затем блокированы с использованием 0,5% (w/v) раствора БСА в ФСБ. Биотинилированный белок hIL-33 (R&D Systems, #3625-IL/CF) (biot-hIL-33) добавляли в серийные разбавления антагонистов IL-33 в диапазоне от 0 до 100 нМ для получения устойчивой конечной концентрации 20 пМ. Смесь инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ), прежде чем перенести на микротитрационные планшеты с нанесенным hST2-hFc. После инкубации в течение 1 ч при КТ лунки промывали и выявляли связанный на планшете biot-hIL-33 с помощью стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) (Thermo Scientific, # N200). Все образцы обрабатывали раствором ТМВ (BD biosciences, # 51-2607KC) для получения колориметрической реакции, а затем гасили путем подкисления с помощью 1М серной кислоты перед измерением поглощения при 450 нм на планшете-ридере Victor X5 (PerkinElmer). Анализ данных проводили с использованием сигмовидной дозозависимой модели в программном обеспечении Prism®. Полученное значение IC₅₀, определяемое как концентрация молекулы антагониста, необходимая для блокирования связывания biot-hIL-33 с hST2 mFc на 50%, использовали в качестве индикатора блокирования активности. Максимальные значения блокирования отображают способность антагонистов блокировать связывание IL-33 по сравнению с исходным уровнем. Поглощение, измеряемое при постоянной концентрации hIL-33 на кривой зависимости от дозы, определяли как 0% блокирование, а поглощение, измеряемое без добавления IL-33, определяли как 100% блокирование. Значения поглощающей способности лунок, содержащих высокую концентрацию каждого антагониста, использовались для определения процента максимального блокирования.

Таблица 8

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) блокирования связывания биотина-hIL-33 с hST2-hFc антагонистами IL-33

Антагонист IL-33	Блокирование 20 пМ биотина-hIL-33 на hST2-hFc, IC ₅₀ (М)	% максимального блокирования
hST2-hFc	1,92E-11	99
hST2-mFc	1,69E-11	100
hST2-hIL1RAcP-mFc	6,34E-12	97
mST2-mIL1RAcP-mFc	1,12E-10	97

Четыре протестированных антагониста IL-33 блокировали связывание биотина-hIL-33 с hST2-mFc со значением IC₅₀ в пределах от 112 до 6,34 пМ с максимальным процентом блокирования в пределах от 97% до 100%, как показано в табл. 8.

Пример 4. Ингибирование IL-33-опосредованной передачи сигнала рецептора антагонистами IL-33.

Интерлейкин-33 (IL-33) является лигандом для ST2, представителя суперсемейства Толл-подобных/интерлейкин-1 рецепторов, который ассоциируется с аксессуарным белком IL-1RAcP (для обзора, см. Kakkar and Lee (2008), *Nat Rev Drug Discovery*, Oct; 7(10): 827-840). После активации ST2/IL-1RAcP интерлейкином-33, сигнальный каскад стимулируется молекулами, находящимися на более низком уровне, такими как MyD88 (миелоидный фактор дифференциации 88) и TRAF6 (связывающий фактор 6 рецептора ФНО), что приводит, среди прочего, к активации NFκB (ядерного фактора-κB). С целью разработки биологически релевантных систем биоисследований для изучения антагонистов IL-33, эмбриональные клетки почки человека (HEK293) были стабильно трансфицированы для экспрессии человеческого ST2 (аминокислоты 1-556 из учетного номера NP_057316) вместе с репортером люциферазы [элемент ответа NFκB (5X)-люцифераза-IRES-GFP] (HEK293/hST2/NFκB-люциферазная клеточная линия). Клеточная линия HEK293 эндогенно экспрессирует IL-1RAcP, а NFκB активируется интерлейкином-33 в клетках HEK293, как было показано ранее (Schmitz et al. (2005), *Immunity* 23:479-490). Стабильная клеточная линия была изолирована и поддерживается в 10% FBS, DMEM, NEAA, пенициллин/стрептомицин и G418.

Для биоисследований HEK293/hST2/NFκB-люциферазные клетки высевали на 96-луночные планшеты для анализа в расчете 10000 клеток на лунку в низких сывороточных средах, содержащих 0,1% w/v FBS и OPTIMEM (Invitrogen, # 31985-070) и затем инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день для определения дозозависимого ответа от IL-33: человеческого IL-33 (hIL-33; R&D Systems, #3625-IL) или IL-33 обезьяны-макака, экспрессированного C-терминальным гексагистидиновым маркером (MfIL-33-6His; SEQ ID NO: 11), или IL33 мыши (mIL-33; R&D Systems, #3626-IL) серийно разбавляли в отношении 1:3 (hIL33: 15 нМ-0,3 пМ или 10 нМ-0,2 пМ, mfIL33: 1,5 нМ-0,03 пМ или 1 нМ-0,05пМ, mIL33: 15 нМ-0,3 пМ или 10 нМ-0,2 пМ) и добавляли к клеткам. Контроль, содержащий буфер для разведения, но не IL-33, также добавляли к одному образцу клеток. Для измерения ингибирования белки-ловушки IL-33 и растворимые рецепторные белки серийно разбавляли и добавляли к клеткам с последующим добавлением постоянных концентраций IL-33 (5 или 20 пМ для hIL-33, 5 или 3 пМ для MfIL-33-6His и 30 пМ для mIL-33). Серии разбавлений растворимого рецептора и белков-ловушек перед добавлением к клеткам составляли 1:3, начиная с ~ 15, 150, 100 или 200 нМ, и в пределах до ~ 0,3, 3 или 2 пМ, плюс контрольный образец, не содержащий белка-ловушки или контроль растворимого рецепторного белка. Человеческий белок Fc (контрольный белок) также серийно разбавляли в соотношении 1: 3 в пределах от 798 до 0,01 нМ или от 100 до 0,002 нМ и протестировали с hIL-33, MfIL-33-6His и mIL-33 таким же образом, как и белки-ловушки и рецепторные белки. Активность люциферазы измеряли через 5,5 ч инкубации при 37°C в 5% CO₂ с использованием планшета-ридера Victor X (Perkin Elmer), а результаты анализировали нелинейной регрессией (четырёхпараметрическая регрессионная логистическая модель) с помощью программного обеспечения Prism 5. Результаты показаны в табл. 9.

Таблица 9

Ингибирование активированных человеческим IL-33, IL-33 обезьяны и IL-33 мыши HEK293/hST2/NFκB-люциферазных клеток с помощью белков-ловушек IL-33 и растворимых рецепторов ST2

IL-33	Человек	Обезьяна	Мышь	Человек	Обезьяна	Мышь
EC ₅₀ (M)	1,9E-12	1,7E-12	1,0E-11	2,5E-11	1,3E-12	8,8E-11
Постоянный IL33	5pM	5pM	30pM	20pM	3pM	30pM
Описание	IC ₅₀ (M)					
mST2-mIL1RAcP-mFc	4,8E-10	6,4E-11	8,7E-12	Анализ не проводился	Анализ не проводился	Анализ не проводился
hST2-hIL1RAcP-mFc	1,3E-12	1,3E-12	1,3E-11	1,3E-11	4,7E-11	1,9E-10
hST2-hIL1RAcP-hFc	Анализ не проводился	Анализ не проводился	Анализ не проводился	3,0E-11	1,0E-10	3,7E-10
hST2-mFc	1,2E-11	5,5E-12	1,4E-10	Анализ не проводился	Анализ не проводился	Анализ не проводился
hST2-hFc	1,0E-11	4,6E-12	1,1E-10	Анализ не проводился	Анализ не проводился	Анализ не проводился
Контрольный белок	НБ	НБ	НБ	НБ	НБ	НБ

НБ=не блокатор.

Как показано в табл. 9, все проанализированные IL-33 антагонисты потенциально блокировали (IC₅₀ <1 нМ) стимуляцию IL-33 человека, макаки и мыши в этом анализе на основе клеток.

Пример 5. Антагонист IL-33 ингибирует IL-33-опосредованную активацию базофилов.

Для дальнейшей оценки характеристик *in vitro* антагонистов IL-33 hST2-hIL1RAcP-mFc и hST2-hIL1RAcP-hFc, была измерена их способность блокировать IL-33-индуцированную активацию базофилов.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) очищали из свежей цельной крови четырех разных доноров-людей с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Цельную кровь K2 ЭДТА разбавляли в среде RPMI 1640 в соотношении 1:1, тщательно разделяли на слои с помощью Ficoll-Paque (GE Healthcare, #17-1440-03) и центрифугировали для отделения МКПК. Межфазный слой, содержащий МКПК, отсасывали, переносили в новую пробирку и дважды промывали буфером MACS, который состоял из разбавленного раствора MACS BSA (Miltenyi Biotec, #130-091-376) в смачивающей жидкости MACS (Miltenyi Biotec, # 130-091-222) в соотношении 1:20. Очищенные МКПК затем помещали (100 мкл на лунку) на 96-луночный полипропиленовый планшет с V-образным дном лунок в конечной концентрации ~ 3,0×10⁶ клеток/мл в буфер MACS. Чтобы подготовить базофилы, содержащиеся в популяции МКПК, 1 нг IL-3 (Sigma, # H7166-10UG) в 50 мкл физиологического раствора, забуференного фосфатом Дульбекко без Ca⁺⁺ или Mg⁺⁺ (DPBS), добавляли к суспензии клеток, а затем инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Серийные разбавления (1:3 для доноров 655675 и 655676 и 1:4 для доноров 655685, 655686, 698846 и 698847) антагонистов человеческого IL-33 (hST2-hIL1RAcP-mFc или hST2-hIL1RAcP-hFc) или нерелевантного контрольного белка произведены в пределах от 10 нМ до 4,6 пМ для доноров 655675 и 655676 и от 5 нМ до 0,3 пМ для доноров 655685, 655686, 698846 и 698847. Кроме того, был включен контроль без какого-либо антагониста IL-33 или нерелевантного контрольного белка. Растворы смешивали с фиксированной концентрацией человеческого IL-33 (R&D Systems, # 6325-IL/CF), которая составляла 100 пМ (конечная концентрация), или без отрицательного контроля IL-33 перед добавлением к МКПК. Все образцы были проанализированы в двух параллельных испытаниях.

После добавления к клеткам человеческого IL-33 и антагониста человеческого IL-33, клетки инкубировали при 37°C в течение 20 мин для обеспечения активации базофилов. После этого активацию останавливали охлаждением аналитических планшетов на льду в течение 5 мин. Чтобы была возможность проанализировать популяцию базофилов, используемую для измерения активации, 20 мкл каждого (в соответствии с инструкциями изготовителя) анти-HLA-DR-FITC (Beckman Coulter, # IM0463U), анти-CD123-APC (BD, # 560087) и анти-CD203c-PE (Beckman Coulter, # IM3575) добавляли к каждому образцу, а образцы выдерживали при 4°C в течение 20 мин в темноте. Затем клетки центрифугировали, промывали DPBS, и после этого ресуспендировали в 2% формальдегиде (фиксационный буфер) при 4°C. На следующий день фиксированные клетки анализировали в аппарате BD FACSCanto II для определения уровней активации базофилов. Базофилы идентифицировали в соответствии со следующими параметрами потоковой цитометрии: лимфоцитарные VoroTa/CD123⁺/HLA-DR⁺. Базофильную активацию определяли как увеличение экспрессии на маркере клеточной поверхности, CD203c на стимулированных базофилах. Активацию определяли как частоту CD203c положительных базофилов (%). Результаты приведены в табл. 10 и 11 ("ББ" = без блокирования; "НО" = не определяется в отдельных экспериментах). Данные представлены в виде среднего значения 3 биологических повторов для каждого донора.

Таблица 10

Процент активации человеческих базофилов, индуцированной влиянием человеческого IL-33

Донор	100 пМ IL-33		Без IL-33	
	Среднее	СО	Среднее	СО
655675	39,00	0,28	9,43	0,02
655676	29,75	0,21	9,36	2,18
655685	42,30	3,39	10,9	0,42
655686	52,60	2,69	10,59	0,86
698846	26,25	0,78	9,79	0,18
698847	22,10	1,98	8,83	0,44

Таблица 11

Блокирование IL-33-индуцированной активации базофилов антагонистом человеческого IL-33

	Донор 655675	Донор 655676	Донор 655685	Донор 655686	Донор 698846	Донор 698847
Антагонист	IC ₅₀ (М)					
hST2-hIL1RAcP-mFc	1,90E-11	1,51E-11	2,30E-11	2,09E-11	3,60E-11	1,11E-11
hST2-hIL1RAcP-hFc	НО	НО	НО	НО	1,97E-11	9,79E-12
Нерелевантный контрольный белок	ББ	ББ	ББ	ББ	ББ	ББ

Как показано в табл. 10, при 100 пМ, средний процент IL-33-индуцированной активации базофилов человека в шести различных доноров находится в пределах от 22,1% до 52,60%.

Как показано в табл. 11, антагонист IL-33 hST2-hIL1RAcP-mFc блокировал активацию базофилов, индуцированную влиянием 100 пМ человеческого IL-33 со значением IC₅₀ 19 пМ для донора 655675, значением IC₅₀ 15,1 пМ для донора 655676, значением IC₅₀ 23 пМ для донора 655685, значением IC₅₀ 20,9 пМ для донора 655686, значением IC₅₀ 36 пМ для донора 698846 и значением IC₅₀ 11,1 пМ для донора 698847. Антагониста IL-33 hST2-hIL1RAcP-hFc блокировал активацию базофилов, индуцированную влиянием 100 пМ человеческого IL-33 со значением IC₅₀ 19,7 пМ для донора 698846 и значением IC₅₀ 9,79 пМ для донора 698847. Нерелевантный контрольный белок не блокировал активацию базофилов ни от одного из тестируемых доноров.

Пример 6. Антагонист IL-33 ингибирует IL-33-опосредованную активацию клеток.

Для дальнейшего тестирования блокирующих свойств антагонистов человеческого IL-33 hST2-hIL1RAcP-mFc и hST2-hIL1RAcP-hFc, проводили анализ на основе эмбриональных клеток с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) (см., например, Smithgall et al., International Immunology, 2008, vol. 20 (8), p. 1019-1030).

МКПК выделяли из свежей цельной человеческой крови шести разных доноров с помощью центрифугирования в градиенте плотности. В общих чертах, цельную кровь K2 ЭДТА разбавляли в два раза в RPMI 1640, тщательно разделяли на слои с помощью Ficoll-Paque (GE Healthcare, #17-1440-03) и центрифугировали в течение 20 мин. Межфазный слой, содержащий МКПК, отсасывали, переносили в новую пробирку и дважды промывали PBS. Выделенные МКПК помещали (200 мкл на лунку) в 96-луночные планшеты с круглым дном лунок при конечной концентрации 5×10^5 клеток/мл в среде RPMI 1640, дополненной 10% FBS, 2 мМ L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Затем клетки инкубировали с 50 нг/мл человеческого IL-12 (hIL-12; R&D Systems, #219-IL-025/CF) и серийным разбавлением только одного человеческого IL-33 (hIL-33; R&D Systems, #3625-IL-010/CF) от 10 нМ до 0,64 пМ, или 260 пМ hIL-33 в сочетании с серийными разбавлениями от 20 нМ до 0,43 пМ антагониста человеческого IL-33 или нерелевантного mIgG, содержащего контрольный белок. Конечный объем составлял 200 мкл на лунку. Каждый образец был проанализирован в трех параллельных испытаниях. Если присутствовал антагонист IL-33 или нерелевантный mIgG, содержащий контрольный белок, его сначала предварительно инкубировали с hIL-33 в течение 30 мин, а затем добавляли к клеткам.

Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C во влажной камере с 5% CO₂, а затем измеряли уровни IFN γ в культуральном супернатанте с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) (R&D Systems, # DY285). Для проведения твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в 96-луночные планшеты с плоским дном лунок вносили иммобилизованное антитело согласно инструкциям изготовителя. После промывания и блокирования в планшеты добавляли 100 мкл неразбавленного культурального супернатанта и инкубировали в течение 2 ч. Последующая отмывка и детекция производились согласно инструкциям изготовителя. Результаты приведены в табл. 12 и 13 ("ББ" = без блокирования; "НО" = не определяется).

Таблица 12

IL-33-индуцированное высвобождение IFN γ
из человеческих МКПК от четырех доноров

[IL-33]	Донор 698843	Донор 698842	Донор 655684	Донор 634966	Донор 655681	Донор 655682	Донор 727054	Донор 727055
EC ₅₀ (M)	НО	НО	2,11E-1 0	3,15E-1 0	2,04E-1 0	3,04E-1 0	НО	НО

Таблица 13

Блокирование IL-33-индуцированного высвобождения IFN γ
из человеческих МКПК антагонистом IL-33

	Донор 698843	Донор 698842	Донор 655684	Донор 634966	Донор 655681	Донор 655682	Донор 727054	Донор 727055
Антагонист	IC ₅₀ (M)							
hST2-hIL1 RAcP-mFc	1,73E-1 1	7,39E-1 1	6,79E-1 1	2,13E-1 2	4,59E-1 1	3,97E-1 2	3,34E-1 0	1,23E-1 0
hST2-hIL1 RAcP-hFc	НО	НО	НО	НО	НО	НО	1,52E-1 0	4,07E-1 0
Нерелеван тный mIgG, содержащ ий контроль-н ый белок	ББ							

Как показано в этом примере, человеческий IL-33 в присутствии hIL-12 индуцировал высвобождение IFN γ из общих МКПК человека от четырех разных протестированных доноров, со значением EC₅₀ от 204 до 315 пМ, как показано в табл. 12. Антагонист человеческого IL-33 hST2-hIL1RAcP-mFc блокировал высвобождение IFN γ из МКПК человека, индуцированное IL-33 в концентрации 260 пМ, со значением IC₅₀ в пределах от 2,13 до 334 пМ, как показано в табл. 13. Нерелевантный mIgG, содержащий контрольный белок, не демонстрировал какого-либо измеримого блокирования высвобождения IFN γ от всех протестированных доноров.

Пример 7. Эффективность mST2-mIL1RacP-mFc в модели воспалительной суставной боли.

Для определения влияния mST2-mIL1RacP-mFc на одностороннюю воспалительную модель *in vivo* боли в суставах исследовали 12 недельных самцов мышей C57BL/6, полученных из The Jackson Laboratory (Бар-Харбор, Мэн). В день 0 эксперимента отдельным когортам мышей вводили подкожно 50 мг/кг mST2-mIL1RacP-mFc (n = 15-16) или 50 мг/кг изотипического контроля антитела (n = 15-16). Спустя 24 ч после введения начальной дозы половина мышей получили инъекцию полного адьюванта Фрейнда (IA-CFA; Sigma, # F5881) (n=7-8): 30 мкл интраартикулярно и 50 мкл периаартикулярно, а другая половина мышей в те же места получили инъекции контрольного раствора натрия хлорида (n = 7-8). Спустя неделю после развития воспаления суставов и в течение следующих четырех недель все мыши получали подкожные бустер-инъекции mST2-mIL1RacP-mFc по 50 мг/кг или 50 мг/кг изотипического контроля антитела за 24 ч до проведения анализа с динамической опорной нагрузкой (BioSeb, Витроль, Франция). Процент выдерживаемого веса на пораженной конечности и процент времени, затрачиваемого на пораженную конечность, записывали для всех мышей. Результаты этого эксперимента, выраженные средним процентом общей массы тела или средним процентом времени, затрачиваемого на пораженную конечность, в течение всего испытательного периода в 5 мин, приведены в табл. 14 и 15 (все данные представлены в виде среднegrupпового показателя \pm стандартная ошибка среднего (СОС)). Все когорты мышей, которые получали IA-CFA, выдерживали в значительной степени меньшую (p < 0,05 по ANOVA) опорную нагрузку на пораженную конечность. Мыши, которые получали mST2-mIL1RacP-mFc после введения IA-CFA, показали более высокий процент выдерживаемого веса и времени, затрачиваемого на пораженную конечность во всех временных точках, по сравнению с мышами, получавшими изотипический контроль после введения IA-CFA, как показано в табл. 14 и 15. По истечению четвертой недели все животные были умерщвлены, а пораженные суставы были вскрыты, залиты в парафин. Из препарата были приготовлены срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином для гистологического анализа. Срезы были оцифрованы и оценены слепым методом с использованием субъективной оценки степени воспалительной активности (в том числе деструкции сустава, синовиального утолщения, эрозии кости и иммунноклеточного инфильтрата) с градацией от 0 до 5 (0 = норма, 1 = минимальная, 2 = легкая 3 = умеренная, 4 = выраженная, 5 = тяжелая) по способу, аналогичному тому, что указан в Choe et al. (Choe, JY et al. (2003), J. Exp. Med. Feb 17; 197(4):537-542). Как показано в табл. 16, у мышей, получавших mST2-mIL1RacP-mFc после введения IA-CFA, чаще наблюдались "умеренные" и реже "тяжелые" степени поражения коленных суставов по сравнению с мышами, получавшими изотипический контроль после введения IA-CFA. Таким образом, этот пример показывает, что антагонисты IL-33 по данному изобретению применимы для облегчения воспалительной боли в суставах.

Таблица 14

Процент выдерживаемого веса тела на пораженной конечности

Лечение	Неделя 1	Неделя 2	Неделя 3	Неделя 4
Контрольный раствор натрия хлорида + изотипический контроль	43,1 ± 1,6	42,2 ± 1,0	41,1 ± 1,7	41,1 ± 0,9
Контрольный раствор натрия хлорида + mST2-mIL1RacP-mFc	41,5 ± 1,9	43,3 ± 0,6	42,2 ± 1,2	38,7 ± 1,4
IA-CFA + изотипический контроль	24,9 ± 1,4	24,2 ± 1,5	23,8 ± 1,0	23,6 ± 2,0
IA-CFA + mST2-mIL1RacP-mFc	30,1 ± 2,1	24,4 ± 1,0	28,3 ± 2,6	29,8 ± 2,9

Таблица 15

Процент времени, затраченного на пораженную конечность

Лечение	Неделя 1	Неделя 2	Неделя 3	Неделя 4
Контрольный раствор натрия хлорида + изотипический контроль	96,6 ± 1,0	96,6 ± 0,6	96,2 ± 0,9	96,4 ± 0,6
Контрольный раствор натрия хлорида + mST2-mIL1RacP-mFc	95,5 ± 0,8	97,2 ± 0,3	94,3 ± 1,7	97,0 ± 0,5
IA-CFA + изотипический контроль	68,4 ± 1,6	64,8 ± 2,1	72,8 ± 3,5	80,9 ± 2,7
IA-CFA + mST2-mIL1RacP-mFc	78,9 ± 3,6	68,5 ± 3,1	80,9 ± 4,2	88,0 ± 2,7

Таблица 16

Балльная оценка гистологической степени тяжести пораженных коленных суставов (% животных)

Лечение	Минимальная	Легкая	Умеренная	Тяжелая
IA-CFA + изотипический контроль	0	0	12%	88%
IA-CFA + mST2-mIL1RacP-mFc	0	0	38%	62%

Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами его реализации, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе, станут очевидными специалистам в данной области техники из вышеприведенного описания и прилагаемых фигур. Такие модификации претендуют на то, чтобы попадать в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антагонист интерлейкина-33 (IL-33), содержащий первый IL-33-связывающий домен (D1), второй IL-33-связывающий домен (D2) и мультимеризующийся домен (M), где D1 присоединен к N-концу D2 и D2 присоединен к N-концу M, причем D1 содержит IL-33-связывающий участок аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, соответствующей ST2 человека, D2 содержит IL-33-связывающий участок аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, соответствующей IL-1RacP человека, и M содержит Fc-домен иммуноглобулина.

2. Антагонист IL-33 по п.1, отличающийся тем, что антагонист IL-33 связывается с интерлейкином 33 (IL-33) человека со значением константы равновесия диссоциации связывания (K_D), равной меньше 50 пМ, как измерено в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C.

3. Антагонист IL-33 по п.1, отличающийся тем, что антагонист IL-33 связывается с интерлейкином 33 (IL-33) человека со значением константы равновесия диссоциации связывания (K_D), равной меньше 10 пМ, как измерено в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 37°C.

4. Антагонист IL-33 по п.1, отличающийся тем, что антагонист IL-33 связывается с интерлейкином 33 (IL-33) обезьяны со значением константы равновесия диссоциации связывания (K_D), равным менее 50 пМ, как измерено в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C.

5. Антагонист IL-33 по п.1, отличающийся тем, что антагонист IL-33 связывается с интерлейкином 33 (IL-33) обезьяны со значением константы равновесия диссоциации связывания (K_D), равным менее 10 пМ, как измерено в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 37°C.

6. Антагонист IL-33 по п.1, отличающийся тем, что антагонист IL-33 связывается с интерлейкином 33 (IL-33) мыши со значением константы равновесия диссоциации связывания (K_D), равным менее 50 пМ, как измерено в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C.

7. Антагонист IL-33 по п.1, отличающийся тем, что антагонист IL-33 связывает с интерлейкином 33 (IL-33) мыши со значением константы равновесия диссоциации связывания (K_D), равным менее 100 пМ, как измерено в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 37°C.

8. Антагонист IL-33 по п.1, отличающийся тем, что антагонист IL-33 связывается с интерлейкином 33 (IL-33) человека со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), равным 40 мин или больше, как измерено в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C.

9. Антагонист IL-33 по п.1, отличающийся тем, что антагонист IL-33 связывается с интерлейкином 33 (IL-33) человека со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), равным 500 мин или больше, как измерено в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 37°C.

10. Антагонист IL-33 по п.1, отличающийся тем, что антагонист IL-33 связывается с интерлейкином 33 (IL-33) обезьяны со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), равным 50 мин или больше, как измерено в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C.

11. Антагонист IL-33 по п.1, отличающийся тем, что антагонист IL-33 связывается с интерлейкином 33 (IL-33) обезьяны со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), равным 60 мин или больше, как измерено в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 37°C.

12. Антагонист IL-33 по п.1, отличающийся тем, что антагонист IL-33 связывается с интерлейкином 33 (IL-33) мыши со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), равным 40 мин или больше, как измерено в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C.

13. Антагонист IL-33 по п.1, отличающийся тем, что антагонист IL-33 связывается с интерлейкином 33 (IL-33) мыши со значением диссоциативного периода полураспада ($t^{1/2}$), равным 30 мин или больше, как измерено в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 37°C.

14. Антагонист IL-33 по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что антагонист IL-33 ингибирует IL-33-опосредованную передачу сигнала в клетке, экспрессирующей белок супрессии опухоленности 2 человека (ST2), с IC_{50} менее 10 пМ, как измерено в блокирующем биоанализе на основе клеток.

15. Антагонист IL-33 по п.14, отличающийся тем, что антагонист IL-33 ингибирует IL-33-опосредованную передачу сигнала в клетке, экспрессирующей ST2 человека с IC_{50} менее 5 пМ, как измерено в блокирующем биоанализе на основе клеток.

16. Антагонист IL-33 по п.15, отличающийся тем, что антагонист IL-33 ингибирует IL-33-опосредованную передачу сигнала в клетке, экспрессирующей ST2 человека с IC_{50} менее 1,5 пМ, как измерено в блокирующем биоанализе на основе клеток.

17. Антагонист IL-33 по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что D1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

18. Антагонист IL-33 по любому из пп.1-17, отличающийся тем, что D2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

19. Антагонист IL-33 по любому из пп.1-18, отличающийся тем, что M содержит Fc-домен IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

20. Антагонист IL-33 по любому из пп.1-18, отличающийся тем, что M содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

21. Антагонист IL-33 по любому из пп.1-18, отличающийся тем, что M содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

22. Антагонист IL-33 по п.1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

23. Антагонист IL-33 по п.22, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

24. Антагонист IL-33 по п.1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

25. Антагонист IL-33 по п.24, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

26. Фармацевтическая композиция для лечения воспалительного заболевания или расстройства, опосредованных IL-33, содержащая антагонист IL-33 по любому из пп.1-25, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

27. Способ лечения воспалительного заболевания или расстройства, опосредованных ИЛ-33, или по меньшей мере одного симптома, связанного с воспалительным заболеванием или расстройством, включающий введение фармацевтической композиции по п.26 пациенту, причем воспалительное заболевание или расстройство облегчается или уменьшается степень его тяжести, продолжительность или частота возникновения либо же облегчается или уменьшается степень тяжести, продолжительность или частота возникновения по меньшей мере одного симптома, связанного с воспалительным заболеванием или расстройством.

28. Способ по п.27, отличающийся тем, что воспалительное заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из астмы, атопического дерматита, хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ), воспалительного заболевания кишечника, рассеянного склероза, артрита и аллергического ринита.

29. Способ по п.28, отличающийся тем, что воспалительным заболеванием или расстройством является астма.

30. Способ по п.29, отличающийся тем, что астма является эозинофильной или неэозинофильной.

31. Способ по любому из пп.28-30, отличающийся тем, что астма является резистентной к стероидам или чувствительной к стероидам.

32. Способ по п.27, отличающийся тем, что воспалительным заболеванием или патологией является атопический дерматит.

33. Способ по п.27, отличающийся тем, что воспалительным заболеванием или расстройством является хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ).

34. Способ по п.33, отличающийся тем, что хроническое обструктивное заболевание легких обусловлено или в некоторой степени вызвано курением сигарет.

35. Способ по любому из пп.27-34, дополнительно включающий введение эффективного количества второго терапевтического агента, подходящего для уменьшения проявлений воспалительного заболевания или расстройства или по меньшей мере одного симптома воспалительного заболевания или расстройства.

36. Способ по п.35, отличающийся тем, что второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из нестероидного противовоспалительного препарата (НПВП), кортикостероида, бронхиального дилататора, антигистаминного средства, адреналина, противоотечного средства, антагониста тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП, TSLP), антагониста ИЛ-13, антагониста ИЛ-4, двойного антагониста ИЛ-4/ИЛ-13, антагониста ИЛ-5, антагониста ИЛ-6, антагониста ИЛ-12/23, антагониста ИЛ-22, антагониста ИЛ-25, антагониста ИЛ-17, антагониста ИЛ-31, орального ингибитора PDE4 и другого антагониста ИЛ-33 или другого антитела к ИЛ-33.

37. Применение антагониста ИЛ-33 по любому из пп.1-25 для изготовления лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания или расстройства, опосредованных ИЛ-33.

38. Применение по п.37, отличающееся тем, что воспалительное заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из астмы, аллергии, атопического дерматита, хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ), воспалительного заболевания кишечника, рассеянного склероза, артрита и аллергического ринита.

