



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.19

(21) Номер заявки
201890891

(22) Дата подачи заявки
2016.10.05

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

**(54) БИОМАРКЕРЫ, СВЯЗАННЫЕ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ, ОПОСРЕДОВАННЫМИ
ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-33 (ИЛ-33), И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/237,624**

(32) **2015.10.06**

(33) **US**

(43) **2018.09.28**

(86) **PCT/US2016/055502**

(87) **WO 2017/062456 2017.04.13**

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

(72) Изобретатель:
**Оренго Джейми М., Аллинн Джинн,
Фьюри Вен, Бай Юй (US)**

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

(56) WO-A1-2015061441
US-A1-2014271658
US-A1-2014271642
LOUTEN ET AL.: "Biomarkers of Disease and Treatment in Murine and Cynomolgus Models of Chronic Asthma", BIOMARKER INSIGHTS, 1 July 2012 (2012-07-01), page 87, XP055186030, DOI: 10.4137/BMI.S9776, abstract; figure 4; tables 1-3, page 95, right-hand column, last paragraph - page 96, left-hand column, paragraph 1

JIA GUIQUAN ET AL.: "Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic

patients", JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 130, no. 3, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 647-654, XP009164752, ISSN: 0091-6749, DOI: 10.1016/J.JACI.2012.06.025, abstract

KATHERINE J. BAINES ET AL.: "Sputum gene expression signature of 6 biomarkers discriminates asthma inflammatory phenotypes", JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 133, no. 4, 1 April 2014 (2014-04-01), pages 997-1007, XP055286629, AMSTERDAM, NL ISSN: 0091-6749, DOI: 10.1016/j.jaci.2013.12.1091, figures 2,3; tables I, III, V

WEI LONG ET AL.: "Procalcitonin guidance for reduction of antibiotic use in patients hospitalized with severe acute exacerbations of asthma: a randomized controlled study with 12-month follow-up", CRITICAL CARE, BIOMED CENTRAL LTD., LONDON, GB, vol. 18, no. 5, 5 September 2014 (2014-09-05), page 471, XP021198750, ISSN: 1364-8535, DOI: 10.1186/S13054-014-0471-7, abstract

CHANG DI ET AL.: "Changes in plasma interleukin-33 concentration in sepsis and its correlation with seriousness of sepsis", CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE - ZHONGHUA WEIZHONGBING JIJU Y, ZHONGHUA YIXUEHUI, CN, vol. 27, no. 2, 1 February 2015 (2015-02-01), pages 138-142, XP009192820, ISSN: 2095-4352, abstract

JOSE C. ALVES-FILHO ET AL.: "Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection", NATURE MEDICINE, vol. 16, no. 6, 16 May 2010 (2010-05-16), pages 708-712, XP055331303, US, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/nm.2156, abstract

(57) Изобретение относится к идентификации определенных биомаркеров для использования при идентификации пациентов, которые имеют, или имеют вероятность развития заболевания или расстройства, опосредованного ИЛ-33, и которые имеют большую вероятность успешного лечения антагонистом ИЛ-33. Изобретение также относится к способам лечения заболевания или расстройства, опосредованного ИЛ-33, у пациента путем введения антагониста ИЛ-33 нуждающемуся в этом пациенту и контроля эффективности терапии с использованием биомаркеров, описанных в данном документе. Также предлагаются способы снижения уровня по меньшей мере одного биомаркера у субъекта, страдающего от заболевания или расстройства, опосредованного ИЛ-33, и способы лечения таких заболеваний или расстройств в соответствии с уровнями экспрессии одного или нескольких биомаркеров. Способы по данному изобретению включают введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей антагонист интерлейкина-33.

Ссылка на перечень последовательностей

Заявка на данное изобретение включает посредством ссылки перечень последовательностей, представленный в машинно-читаемой форме в файле 10187WO01-Sequence.txt, созданном 4 октября 2016 г. и имеющем размер 159920 байт.

Область техники

Данное изобретение относится к идентификации у млекопитающего конкретных биомаркеров, коррелирующих с экспрессией ИЛ-33, и использованию этих биомаркеров для идентификации пациентов с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством, или с вероятностью их развития, имеющих большую вероятность успешного лечения антагонистом ИЛ-33. Изобретение также относится к способам лечения опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства у пациента путем введения антагониста ИЛ-33 нуждающемуся в этом пациенту и контроля эффективности терапии с использованием биомаркеров, описанных в данном документе.

Уровень техники

Интерлейкин-33 (ИЛ-33), являющийся членом суперсемейства цитокинов ИЛ-1, экспрессируется преимущественно стромальными клетками, такими как эпителиальные и эндотелиальные клетки, после провоспалительной стимуляции. ИЛ-33 является лигандом ST2, члена суперсемейства толл-подобных/интерлейкиновых-1 рецепторов, который связывается со вспомогательным белком IL-1RAcP (см. обзоры, 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*, 10:103-110 (2010); US 2010/0260770; US 2009/0041718). При активации ST2/IL-1RAcP под действием ИЛ-33 запускается сигнальный каскад через нижерасположенные по каскаду молекулы, такие как MyD88 (фактор 88 миелоидной дифференцировки) и TRAF6 (ассоциированный с рецептором ФНО фактор 6), приводящий, помимо прочего, к активации NF-κB (ядерный фактор-κB).

ИЛ-33 сигналинг участвует в качестве фактора в различных заболеваниях и расстройствах (Liew et al., *Nature Reviews – Immunology*, 10:103-110 (2010)). Например, хотя ИЛ-33 оказывает защитное действие против глистной инвазии у хозяина, а также уменьшает атеросклероз путем способствования иммунным реакциям T_H2-типа, он может также способствовать патогенезу астмы за счет увеличения количества T_H2-клеток и опосредовать воспаление суставов, атопический дерматит и анафилаксию путем активации тучных клеток. По существу, ИЛ-33 может быть новой мишенью для терапевтического воздействия при ряде болезней; например блокада ИЛ-33 сигналинга может обеспечивать возможность облегчения многих патологических признаков определенных воспалительных болезней.

Антагонисты ИЛ-33 описаны в патентах США № 5576191; 7666622; 8119771; 8187596; 9090694; 9212227; 9382318; патентных публикациях США № 2007/0042978; 2009/0041718; 2010/0260770; 2012/0207752; 2012/0263709; 2014/0140954; 2014/0271642; 2014/0212412; патентах или патентных заявках EP № 1725261B1; 2069784A1; 2152740A1; 2283860A2; 2475388A1 и публикациях PCT № WO 05/079844; WO 08/132709; WO 08/144610; WO 09/053098; WO 11/031600; WO 14/152195 и WO 14/164959.

Кальцитонин (КТ, СТ) представляет собой полипептидный гормон, который, как считают, продуцируется преимущественно парафолликулярными клетками щитовидной железы (Foster, G.V., et al., (1964), *Nature*, 202:1303-1305). КТ является продуктом гена CALCA, расположенного на хромосоме 11. Ген CALCA кодирует полипептиды прокальцитонина (ПКТ, PCT) и прокальцитонин-ген-родственного пептида (proCGRP), которые дифференцированно экспрессируются путем альтернативного сплайсинга (Christ-Crain, M. et al. (2008), *Crit. Care Med.* 36:1684-1687; Hoff, A.O., et al. (2002), *J. Clin. Invest.* 110:1849-1857). Кальцитонин образуется из большего по размеру прекурсора, прокальцитонина (ПКТ, 116 аминокислот), который расщепляется на незрелый кальцитонин (33 аминокислоты) и затем зрелый кальцитонин, представляющий собой состоящий из 32 аминокислот мономерный пептид размером 3,5 кДа. КТ преимущественно вырабатывается нейроэндокринными клетками, такими как С-клетки щитовидной железы, и легочными нейроэндокринными клетками (PNEC) путем протеолитического расщепления в секреторных гранулах продуцирующих клеток перед высвобождением в виде зрелого полипептида КТ. Другие клетки, экспрессирующие ген CALCA, включают тучные клетки, клетки спинномозговых узлов (DRG) и клетки спинного мозга. В сыворотке здоровых и больных индивидуумов присутствуют многочисленные формы циркулирующих прекурсоров кальцитонина (Becker K. et al. (2004), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89:1512-1525).

Кальцитонин-ген-родственный пептид (КГРП, CGRP) является членом кальцитонинового семейства пептидов, α-КГРП представляет собой состоящий из 37-аминокислот пептид, образующийся при альтернативном сплайсинге гена кальцитонина/КГРП, расположенного на хромосоме 11 (Amara, S.G., et al., (1982), *Nature*, 298(5871):240-244).

Действие КТ направлено на снижение кальция крови, ингибирование как остеокластов, так и резорбции кости, противодействуя активности паратиреоидного гормона (PTH) (Naot, D. and J. Cornish (2008), *Bone*, 43(5):813-818). In vivo и in vitro эксперименты позволяют предположить, что важной физиологической функцией КТ является борьба с гиперкальциемией в состояниях кальциевого стресса, та-

ких как во время беременности, в период роста или кормления грудью (Hoff, A.O., et al., (2002), J. Clin. Invest. 110(12):1849-1857; Zaidi, M., et al., (2002), J. Clin. Invest. 110(12):1769-1771). Диагностически, КТ используется в качестве биомаркера медуллярной карциномы щитовидной железы (МТС). Нормальные уровни КТ-пептидов в циркуляции являются низкими, однако в физиологических условиях эти уровни возрастают системно или локально. Высокие уровни КТ указывают на наличие МТС и используются для оценки эффективности хирургической экстирпации и рецидивирования. КТ также повышен при С-клеточной гиперплазии, опухолях легких и поджелудочной железы, почечных недостаточностях и аутоиммунной болезни щитовидной железы (Becker, K.L., et al., (2004), J. Clin. Endocrinol. Metab. 89(4):1512-1525).

До настоящего времени не были идентифицированы биомаркеры для идентификации пациентов с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством или склонных к его развитию или для определения вероятности успешного лечения пациента антагонистом ИЛ-33. Хотя были идентифицированы антагонисты ИЛ-33, перспективные для лечения воспалительных состояний или аллергий, необходимы биомаркеры, которые могли бы предсказывать эффективность терапии, направленной против ИЛ-33, для эффективной идентификации и выбора субпопуляции пациентов, благоприятно реагирующих на терапию, направленную против ИЛ-33. Соответственно, в данной области техники существует неудовлетворенная потребность в идентификации и подтверждении достоверности предсказывающих и прогностических биомаркеров у пациентов с воспалительными состояниями или аллергиями, получающих лечение, направленное против ИЛ-33.

Краткое изложение существа изобретения

В соответствии с определенными аспектами данного изобретения предусматриваются способы лечения, предотвращения и/или снижения тяжести или продолжительности симптомов опосредованного интерлейкином-33 (ИЛ-33) заболевания или расстройства у субъекта. Способы по данному изобретению включают введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антагониста интерлейкина-33.

В одном варианте реализации данного изобретения антагонист ИЛ-33 представляет собой антителио или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают ИЛ-33.

В одном варианте реализации данного изобретения антагонист ИЛ-33 представляет собой антагонист ИЛ-33 на основе рецептора, такой как ловушка ИЛ-33, как описано в данном документе.

Данное изобретение также предусматривает идентификацию конкретных биомаркеров, коррелирующих с экспрессией ИЛ-33 у субъекта, страдающего от опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства. Типичные примеры биомаркеров, ассоциированных с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством, которые могут быть определены и/или измерены в контексте данного изобретения, включают, без ограничений, полипептиды, кодируемые геном CALCA, включая кальцитонин, прокальцитонин и кальцитонин-ген-родственный пептид (КГРП). В одном варианте реализации биомаркер, ассоциированный с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством, который может определяться и/или измеряться в контексте данного изобретения, является кальцитонином. Другие биомаркеры, ассоциированные с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством, которые могут определяться и/или измеряться в контексте данного изобретения, включают, без ограничений, резистинподобную (молекулу) альфа (RETNA); хемокиновый (С-С-мотив) лиганд 8 (Ccl8); сывороточный амилоид А3 (Saa3); Gm1975 (BC117090); лектинподобный рецептор клеток-убийц (Klr1); стефин А1 (Csta); трансмембранный 4-домен (Ms4a8a); хемокиновый (С-С-мотив) лиганд 11 (Ccl11) и сериновые (или цистеиновые) пептиды (Serpina3f).

В родственном аспекте изобретение предусматривает экспрессию по меньшей мере одного биомаркера в сыворотке субъекта, страдающего от опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, коррелирующую с уровнем экспрессии ИЛ-33 по меньшей мере в одном образце ткани субъекта.

В одном варианте реализации сывороточный биомаркер, коррелирующий с уровнями экспрессии ИЛ-33 по меньшей мере в одном образце ткани, представляет собой кальцитонин.

В определенном варианте реализации сывороточный биомаркер, коррелирующий с уровнями экспрессии ИЛ-33 по меньшей мере в одном образце ткани, представляет собой прокальцитонин.

В родственном варианте реализации сывороточный биомаркер, коррелирующий с уровнями экспрессии ИЛ-33 по меньшей мере в одном образце ткани, представляет собой кальцитонин-ген-родственный пептид (КГРП).

В другом родственном аспекте данное изобретение предусматривает способ лечения опосредованного интерлейкином-33 (ИЛ-33) заболевания или расстройства у субъекта, включающий:

- (а) выбор субъекта, демонстрирующего повышенный уровень по меньшей мере одного биомаркера, ассоциированного с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством, до или во время лечения;
- (б) введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антагониста интерлейкина-33.

В соответствии с родственными аспектами данного изобретения предусматриваются способы лечения опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, которые включают введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антагониста ИЛ-33, причем

введение фармацевтической композиции субъекту приводит к снижению по меньшей мере одного биомаркера, ассоциированного с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством у субъекта.

В одном варианте реализации биомаркер, являющийся повышенным у субъекта, страдающего от опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, представляет собой кальцитонин, и антагонист ИЛ-33 представляет собой моноклональное антитело, специфически связывающееся с ИЛ-33.

Данное изобретение также предусматривает способы снижения уровня одного или нескольких биомаркеров, ассоциированных с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством у субъекта, приводящие к улучшению одного или нескольких параметров, ассоциированных с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством у субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту разовой начальной дозы фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33. В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает введение одной или нескольких повторных доз фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33, приводящее к дополнительному снижению уровня одного или нескольких биомаркеров, описанных в данном документе, и дополнительному улучшению одного или нескольких параметров, ассоциированных с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством у субъекта. В одном варианте реализации наблюдается сильная корреляция между уровнем биомаркера, присутствующего в сыворотке субъекта с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством, и тяжестью параметра, ассоциированного с заболеванием или расстройством, например, инфильтрацией эозинофилов или нейтрофилов в легкие субъекта или повышением уровней цитокинов (например, ИЛ-5) в легких субъекта. В определенных вариантах реализации уровень ИЛ-33 в ткани, например легких, коррелирует с тяжестью параметра, ассоциированного с заболеванием или расстройством. В одном варианте реализации антагонист ИЛ-33 представляет собой человеческое моноклональное антитело, специфически связывающееся с ИЛ-33. В одном варианте реализации антагонист ИЛ-33 представляет собой ловушку ИЛ-33, как описано в данном документе.

В родственном аспекте данное изобретение предусматривает способы лечения опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства у субъекта, включающие введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают ИЛ-33, причем у субъекта было диагностировано опосредованное ИЛ-33 заболевание или расстройство и он также был выбран для проведения лечения на основании демонстрируемого субъектом до лечения повышенного уровня по меньшей мере одного биомаркера, ассоциированного с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством, по сравнению с контрольным уровнем биомаркера (например, экспрессией биомаркера в подмножестве субъектов с диагностированным опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством и/или экспрессией биомаркера у здоровых субъектов).

В другом родственном аспекте данное изобретение также предусматривает способы лечения опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства путем введения субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают ИЛ-33, причем у субъекта было диагностировано опосредованное ИЛ-33 заболевание или расстройство, ему уже проводилось лечение антагонистом ИЛ-33 (anti-IL-33 antagonist) в течение определенного периода времени, и он был отобран для дополнительного лечения антагонистом ИЛ-33 на основании демонстрируемой им экспрессии по меньшей мере одного биомаркера (например, кальцитонина, прокальцитонина или кальцитонин-ген-родственного пептида (КГРП)) после проведения лечения в течение определенного периода времени, где экспрессию биомаркера определяют на основании сравнения с уровнем экспрессии соответствующего биомаркера у субъекта до лечения антагонистом ИЛ-33.

Изобретение также предусматривает способ идентификации субъекта, страдающего от опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, который вероятно благоприятно отреагирует на лечение антагонистом ИЛ-33, включающий получение образца от субъекта и измерение уровня кальцитонина в образце; где повышенный уровень кальцитонина, по сравнению с более низким уровнем кальцитонина у субъектов, не страдающих от опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, идентифицирует пациента как пациента, который вероятно благоприятно отреагирует на лечение антагонистом ИЛ-33.

В определенных вариантах реализации субъект, который вероятно благоприятно отреагирует на лечение антагонистом ИЛ-33, может быть идентифицирован путем измерения уровня прокальцитонина или кальцитонин-ген-родственного пептида (КГРП) в образце ткани, причем повышенный уровень прокальцитонина или кальцитонин-ген-родственного пептида (КГРП) по сравнению с более низким уровнем прокальцитонина или КГРП у субъектов, не страдающих от опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, идентифицирует этого пациента как пациента, который вероятно благоприятно отреагирует на лечение антагонистом ИЛ-33.

В другом родственном аспекте изобретение предусматривает способ определения вероятности наличия или вероятности развития у субъекта опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, включающий получение образца от субъекта и измерение в образце уровня кальцитонина; причем повышенный уровень кальцитонина по сравнению со стандартным образцом идентифицирует пациента как пациента, вероятно имеющего, или с вероятностью развития опосредованного ИЛ-33 заболевания или

расстройства.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает способ определения вероятности наличия или вероятности развития у субъекта опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, включающий получение образца от субъекта и измерение в образце уровня прокальцитонина или КГРП; причем повышенный уровень прокальцитонина или КГРП по сравнению со стандартными образцами любого из двух биомаркеров идентифицирует пациента как пациента, вероятно имеющего, или с вероятностью развития опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства. Способы измерения уровней любого из вышеуказанных биомаркеров известны квалифицированным специалистам в данной области техники.

Образец от субъекта может быть образцом солидной ткани, образцом клеток или образцом крови. Образец солидной ткани может быть выбран из группы, состоящей из сердца, почки, печени, легкого, ободочной кишки и селезенки. Образец клеток может быть образцом клеток спинномозгового узла, образцом клеток слюны, образцом клеток бронхоальвеолярной лаважной жидкости, образцом клеток носовых полипов, фекальным образцом клеток, биопсией легкого, ободочной кишки, сердца, почки, кожи, или образцом клеток биопсии селезенки. Образец крови может быть цельной кровью, плазмой или сывороткой.

В одном варианте реализации антагонист ИЛ-33 для использования в способах по изобретению представляет собой выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают человеческий интерлейкин-33 (ИЛ-33), причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(а) определяющие комплементарность участки (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 и 308; и

(b) CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 и 316.

В одном варианте реализации антагонист ИЛ-33 для использования в способах по изобретению представляет собой выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают человеческий интерлейкин-33 (ИЛ-33), причем антитело против ИЛ-33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR тяжелой и легкой цепей с парой аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 и 308/316.

В одном варианте реализации, антагонист ИЛ-33 для использования в способах по изобретению представляет собой выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают человеческий интерлейкин-33 (ИЛ-33), причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16; 20-22-24-28-30-32; 36-38-40-44-46-48; 52-54-56-60-62-64; 68-70-72-76-78-80; 84-86-88-92-94-96; 100-102-104-108-110-112; 116-118-120-124-126-128; 132-134-136-140-142-144; 148-150-152-156-158-160; 164-166-168-172-174-176; 180-182-184-188-190-192; 196-198-200-204-206-208; 212-214-216-220-222-224; 228-230-232-236-238-240; 244-246-248-252-254-256; 260-262-264-268-270-272; 276-278-280-284-286-288; 292-294-296-300-302-304 и 310-312-314-318-320-322.

В одном варианте реализации антагонист ИЛ-33 для использования в способах по изобретению представляет собой выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают человеческий интерлейкин-33 (ИЛ-33), причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(а) варибельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 и 308; и

(b) варибельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 и 316.

В одном варианте реализации антагонист ИЛ-33 для использования в способах по изобретению представляет собой выделенный антагонист на основе рецептора ИЛ-33 (например, ловушку ИЛ-33), содержащий первый ИЛ-33 связывающий домен (D1), присоединенный к мультимеризующему домену (М), где D1 содержит ИЛ-33-связывающий участок белка ST2. В одном варианте реализации ловушка ИЛ-33 дополнительно содержит один или несколько дополнительных ИЛ-33-связывающих доменов, выбранных из группы, состоящей из D2, D3 и D4.

В одном варианте реализации антагонист на основе рецептора ИЛ-33 содержит ИЛ-33-связывающий участок белка ST2, внеклеточный домен белка IL-1RAcP или другой ИЛ-33-связывающий домен.

В одном варианте реализации антагонист на основе рецептора ИЛ-33 представляет собой ловушку

ИЛ-33, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 323, 324, 325, 326 и 335.

В одном варианте реализации способы по изобретению предусматривают введение эффективного количества второго терапевтического агента, пригодного для уменьшения по меньшей мере одного симптома опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства.

В одном варианте реализации второй терапевтический агент выбирают из группы, состоящей из нестероидного противовоспалительного средства (NSAID), кортикостероида, бронходилататора, антигистаминного средства, эпинефрина, противозастойного средства, антагониста тимического стромального лимфопоэтина (TSLP), антагониста ИЛ-13, антагониста ИЛ-4, двойного антагониста ИЛ-4/ИЛ-13, антагониста ИЛ-5, антагониста ИЛ-6, антагониста ИЛ-12/ИЛ-23, антагониста ИЛ-22, антагониста ИЛ-25, антагониста ИЛ-17, антагониста ИЛ-31, ингибитора PDE4 (фосфодиэстеразы-4) для перорального введения и другого антагониста ИЛ-33 или другого антитела или антагониста ИЛ-33 на основе рецептора.

В одном варианте реализации изобретение предусматривает лечение субъекта, страдающего от опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, антагонистом ИЛ-33, выбранным из антитела против ИЛ-33 или ловушки ИЛ-33, который может быть использован в комбинации с любым одним или несколькими из вышеуказанных вторых терапевтических агентов, причем эффективность лечения этими агентами может контролироваться путем оценки уровня содержания по меньшей мере одного биомаркера, выбранного из группы, состоящей из кальцитонина (Calca), прокальцитонина, кальцитонин-ген-родственного пептида (КГРП), резистинподобной (молекулы) альфа (RETNA), хемокинового (С-С-мотив) лиганда 8 (Ccl8), сывороточного амилоида A3 (Saa3), Gm1975 (BC117090), лектинподобного рецептора клетки-убийцы (Klr1), стефина A1 (CstA), трансмембранного 4-домена (Ms4a8a), хемокинового (С-С-мотив) лиганда 11 (Ccl11) и сериновых (или цистеиновых) пептидов (Serpina3f).

В одном варианте реализации биомаркер представляет собой кальцитонин и уровень кальцитонина повышается в сыворотке субъекта с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством, и повышение кальцитонина сыворотки коррелирует с повышенным уровнем кальцитонина и ИЛ-33 в легких субъекта.

В одном варианте реализации повышенный уровень кальцитонина в сыворотке субъекта с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством снижается до нормальной области значений уровня после лечения антагонистом ИЛ-33.

В одном варианте реализации субъекта, страдающего от опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, выбирают для лечения антагонистом ИЛ-33 на основании демонстрируемого им среднего уровня кальцитонина сыворотки более примерно 5 пг/мл, более примерно 10 пг/мл, более примерно 50 пг/мл или более примерно 100 пг/мл, до или во время лечения.

В одном варианте реализации субъекта, страдающего от опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, выбирают для лечения антагонистом ИЛ-33 на основании демонстрируемого им среднего уровня прокальцитонина сыворотки более примерно 0,15 нг/мл, более примерно 1,0 нг/мл, более примерно 5 нг/мл, более примерно 10 нг/мл, более примерно 50 нг/мл или более примерно 100 нг/мл, до или во время лечения.

В одном варианте реализации субъекта, страдающего от опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, выбирают для лечения антагонистом ИЛ-33 на основании демонстрируемого им среднего уровня кальцитонин-ген-родственного пептида сыворотки (КГРП) более примерно 45 пг/мл, более примерно 100 пг/мл, более примерно 250 пг/мл или более примерно 500 пг/мл, до или во время лечения.

В определенных вариантах реализации способы по изобретению предусматривают лечение опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, которое представляет собой воспалительное заболевание или расстройство, выбранное из группы, состоящей из астмы, аллергии, аллергического ринита, аллергического воспаления дыхательных путей, атопического дерматита (AD), хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), воспалительной болезни кишечника (ВБК), рассеянного склероза, артрита, псориаза, эозинофильного эзофагита, эозинофильной пневмонии, эозинофильного псориаза, гиперэозинофильного синдрома, болезни "трансплантат против хозяина", увеита, сердечно-сосудистого заболевания, боли, рассеянного склероза, волчанки, васкулита, хронической идиопатической крапивницы и эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (синдром Чарга-Стросс).

В одном варианте реализации опосредованное ИЛ-33 заболевание или расстройство, требующее лечения, представляет собой аллергию, и субъекта, выбранного для лечения антагонистом ИЛ-33, выбирают на основании возрастания уровней кальцитонина выше нормы (например, на основании контрольного уровня биомаркера, определяемого путем установления значений для здоровых субъектов по сравнению с субъектами с диагностированным опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством), причем лечение антагонистом ИЛ-33 включает введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество моноклонального антитела, которое специфически связывает ИЛ-33 и включает пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 274/282, и введение приводит к улучшению по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством, или улучшению по меньшей мере одного ассоциированного с болезнью параметра; и уровень кальцитонина восстанавливается до нормального диапазона значений, при

определении путем сравнения со стандартным образцом.

В одном варианте реализации опосредованное ИЛ-33 заболевание или расстройство, требующее лечения, представляет собой аллергию, и субъекта, выбранного для лечения антагонистом ИЛ-33, выбирают на основании повышения уровней кальцитонина сыворотки, определяемого путем сравнения со стандартным образцом, причем уровень кальцитонина коррелирует с повышением уровня ИЛ-33 у субъекта, или с увеличением по меньшей мере одного параметра заболевания у субъекта, и повышение уровня ИЛ-33 определяют с использованием анализа связывания, содержащего антитело, специфически связывающееся с человеческим ИЛ-33, и включающее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 274/282.

Данное изобретение также включает использование антагонистов ИЛ-33 (например, ловушки ИЛ-33), антител против ИЛ-33 и фармацевтических композиций, описанных выше или в данном документе для лечения или уменьшения симптома опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства. Данное изобретение дополнительно включает использование антагонистов ИЛ-33 (например, ловушки ИЛ-33), антител против ИЛ-33 и фармацевтических композиций, описанных выше или в данном документе, для изготовления лекарственного средства для лечения или уменьшения симптома опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства.

Данное изобретение также включает любую комбинацию вариантов реализации, описанных выше или в данном документе. Конкретные варианты реализации данного изобретения станут понятны из приведенного далее детального описания.

Краткое описание фигур

Фиг. 1А и 1В. Показывают уровни ИЛ-33 мышинной сыворотки (фиг. 1А) и мышинового кальцитонина (КТ) (фиг. 1В) в эксперименте по гидродинамической доставке ДНК (HDD) мышинового ИЛ-33.

Фиг. 2. Показывает экспрессию генов мышинового кальцитонина (Calca) в модели хронического воздействия HDM (экстракт клещей домашней пыли).

Фиг. 3. Показывает корреляцию между уровнями кальцитонина (КТ) в сыворотке и легких в модели хронического воздействия HDM.

Фиг. 4. Показывает корреляцию уровней сывороточного кальцитонина (КТ) и ИЛ-33 в легких в модели хронического воздействия HDM.

Фиг. 5А-5С. Показывают параметры, находящиеся под влиянием лечения, направленного против ИЛ-33, в модели хронического воздействия HDM.

Фиг. 5А. Концентрация нейтрофилов в легких.

Фиг. 5В. Концентрация эозинофилов в легких.

Фиг. 5С. Уровни ИЛ-5 в легких.

Фиг. 6А-6С. Показывают корреляцию сывороточного кальцитонина (КТ) и параметров, находящихся под влиянием лечения, направленного против ИЛ-33, в модели хронического воздействия HDM.

Фиг. 6А. Корреляция между уровнями сывороточного КТ и концентрацией нейтрофилов в легких.

Фиг. 6В. Корреляция между уровнями сывороточного КТ и концентрацией эозинофилов в легких.

Фиг. 6С. Корреляция между сывороточным КТ и уровнями белка ИЛ-5 в легких.

Фиг. 7А-7С. Показывают корреляцию уровней ИЛ-33 в легких и параметров, находящихся под влиянием лечения, направленного против ИЛ-33, в модели хронического воздействия HDM.

Фиг. 7А. Корреляция между уровнями ИЛ-33 в легких и концентрацией нейтрофилов в легких.

Фиг. 7В. Корреляция между уровнями ИЛ-33 в легких и концентрацией эозинофилов в легких.

Фиг. 7С. Корреляция между ИЛ-33 в легких и уровнями белка ИЛ-5 в легких.

Детальное описание

Перед тем, как перейти к описанию данного изобретения, укажем на необходимость понимания того, что данное изобретение не ограничено описанными конкретными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Следует также понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для описания конкретных вариантов реализации, и не должна быть ограничительной, а объем данного изобретения будет ограничиваться только приложенной формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значения, являющиеся общепринятыми для рядовых специалистов в области техники, к которой относится данное изобретение. В используемом в данном документе значении термин "примерно", при использовании со ссылкой на конкретно указанную численную величину, означает, что эта величина может отклоняться от указанного значения не более чем на 1%. Например, в используемом в данном документе значении выражение "примерно 100" включает 99 и 101 и все промежуточные значения (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.). В используемом в данном документе значении термины "лечить", "лечение" и т.п. означают облегчение симптомов, устранение причин симптомов, будь то временное или постоянное, или предотвращение или замедление появления симптомов указанного расстройства или состояния.

Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы в практике данного изобретения, далее будут описаны предпочтительные

способы и материалы.

Биомаркеры, ассоциированные с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством.

Данное изобретение включает способы, связанные с использованием, количественным определением и анализом биомаркеров, ассоциированных с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством.

"Опосредованное ИЛ-33 заболевание или расстройство" может быть выбрано из любых воспалительных заболеваний или расстройств, таких как, без ограничений, астма, аллергия, аллергический ринит, аллергическое воспаление дыхательных путей, атопический дерматит (AD), хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), воспалительная болезнь кишечника (ВБК), рассеянный склероз, артрит, псориаз, эозинофильный эзофагит, эозинофильная пневмония, эозинофильный псориаз, гиперэозинофильный синдром, болезнь "трансплантат против хозяина", увеит, сердечно-сосудистое заболевание, боль, рассеянный склероз, волчанка, васкулит, хроническая идиопатическая крапивница и эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (синдром Чарга-Стросс).

Астма может быть выбрана из группы, состоящей из аллергической астмы, неаллергической астмы, тяжелой рефрактерной астмы, обострений астмы, вирус-индуцированной астмы или обострений вирус-индуцированной астмы, стероид-резистентной астмы, стероид-чувствительной астмы, эозинофильной астмы или неэозинофильной астмы и других родственных расстройств, характеризующихся воспалением дыхательных путей или гиперчувствительностью дыхательных путей (AHR).

ХОБЛ может быть заболеванием или расстройством, частично ассоциированным с или вызываемым сигаретным дымом, загрязнениями воздуха, используемыми в профессиональной деятельности химическими веществами, аллергией или гиперчувствительностью дыхательных путей.

Аллергия может быть ассоциирована с пищевыми продуктами, пылью, плесенью, пылевыми клещами, животными или перхотью животных.

ВБК может быть выбрана из группы, состоящей из неспецифического язвенного колита, болезни Крона, коллагенового колита, лимфоцитарного колита, ишемического колита, воспаления в отключенной кишке, синдрома Бехчета, инфекционного колита, неопределенного колита и других расстройств, характеризующихся воспалением слоя слизистой оболочки толстой кишки или ободочной кишки.

Артрит может быть выбран из группы, состоящей из остеоартрита, ревматоидного артрита и псориатического артрита.

В используемом в данном документе значении термин "опосредованное ИЛ-33 заболевание или расстройство-ассоциированный биомаркер" или "биомаркер, ассоциированный с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством" означает любой биологический ответ, тип клеток, параметр, белок, полипептид, фермент, ферментативную активность, метаболит, нуклеиновую кислоту, углевод или другую биомолекулу, присутствующую или детектируемую у пациента, страдающего от опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, при уровне содержания или в количестве, отличном от (например, большем или меньшем) уровня или количества маркера, присутствующего или детектируемого у пациента без опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства. Типичные примеры биомаркеров, ассоциированных с опосредованным ИЛ-33 и заболеваниями или расстройствами, включают, без ограничений, полипептиды, кодируемые геном CALCA, включая кальцитонин, прокальцитонин или кальцитонин-ген-родственный пептид (КГРП). Другие биомаркеры, ассоциированные с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством, включают, без ограничений, резистинподобную (молекулу) альфа (RETNA); хемокиновый (C-C-мотив) лиганд 8 (Ccl8); сывороточный амилоид A3 (Saa3); Gm1975 (BC117090); лектинподобный рецептор клетки-убийцы (Kirg1); стефин A1 (Csta); трансмембранный 4-домен (Ms4a8a); хемокиновый (C-C-мотив) лиганд 11 (Ccl11) и сериновые (или цистеиновые) пептиды (Serpina3f).

Способы детектирования и/или количественного определения таких биомаркеров известны специалистам; наборы для измерений таких биомаркеров доступны из различных коммерческих источников; а также различные коммерческие диагностические лаборатории предлагают услуги по измерению таких биомаркеров.

В одном варианте реализации, биомаркер представляет собой кальцитонин, и уровень кальцитонина является повышенным у субъекта, страдающего от или склонного к развитию опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства. В одном варианте реализации биомаркер представляет собой прокальцитонин и уровень прокальцитонина является повышенным у субъекта, страдающего от или склонного к развитию опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства. В родственном варианте реализации биомаркер представляет собой кальцитонин-ген-родственный пептид (КГРП), и уровень КГРП является повышенным у субъекта, страдающего от, или склонного к развитию опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства. Уровень кальцитонина, прокальцитонина или КГРП можно оценить с использованием любого способа, известного квалифицированным специалистам в данной области техники. Способы детектирования включают иммунологический анализ с использованием для детектирования любой метки, такой как радиоизотопная метка, ферментная метка или хемилюминесцентная метка. Интерпретация результатов должна принимать во внимание используемый способ, возраст, пол и вес субъекта (см. d'Herbomez, M. et al., (2007), Eur. J. Endocrinology, 157:749-755). Обычно "нормальное" контрольное зна-

чение кальцитонина для мужчин составляет менее примерно 16 пг/мл и для женщин - менее примерно 8 пг/мл. Совсем недавно Camacho et al. разработали новый количественный иммунофлуоресцентный анализ кальцитонина сыворотки и подтвердили достоверность его результатов на образцах, взятых у 794 пациентов. Результаты, полученные с использованием этого анализа, показали, что нормальное значение отсечения составляет менее 11,1 пг/мл для мужчин и менее 5,5 пг/мл для женщин (см. Camacho, et al., (2014), Eur. Thyroid J., Jun; 3(2):117-24. "Справочный" диапазон прокальцитонина у взрослых и детей старше 72 ч составляет примерно 0,15 нг/мл или меньше. У здоровых взрослых нормальная область значений прокальцитонина находится ниже уровня обнаружения (см. Dandona, P. et al. (1994), J. Clin. Endocrinol. Metab. Dec. 79(6):1605-8.). Нормальный диапазон значений КГРП у здоровых индивидуумов обычно составляет менее примерно 45 пг/мл. Фактически, более высокое значение может считаться указывающим на наличие заболевания или расстройства.

"Параметр заболевания, ассоциированного с ИЛ-33" может включать, без ограничений, увеличение инфильтрации нейтрофилов, эозинофилов или ST2+ CD4 Т-клеток в ткань (например, легкое), метapлазию бокаловидных клеток, повышение уровней ST2 в ткани или повышение уровня цитокина, такого как ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-13, ИЛ-33, MCP-1, ФНП α , в ткани.

В соответствии с определенными аспектами изобретения предусматриваются способы лечения опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, включающие:

(a) выбор субъекта, демонстрирующего до или во время лечения уровень по меньшей мере одного биомаркера, указывающий на болезненное состояние; и

(b) введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антагониста ИЛ-33.

В одном варианте реализации этого аспекта изобретения субъекта выбирают на основании повышенного уровня кальцитонина. В одном варианте реализации антагонист ИЛ-33 представляет собой выделенное моноклональное антитело, специфически связывающееся с ИЛ-33, или антагониста ИЛ-33 на основе рецептора (ловушку ИЛ-33, как описано в данном документе).

В соответствии с другими аспектами изобретения предусматриваются способы лечения опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, которые включают введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антагониста ИЛ-33, причем введение фармацевтической композиции субъекту приводит к снижению по меньшей мере одного биомаркера (например, кальцитонина (Calca), прокальцитонина, кальцитонин-ген-родственного пептида (КГРП), резистинподобной (молекулы) альфа (RETNA), хемокинового (С-С-мотив) лиганда 8 (Ccl8), сывороточного амилоида A3 (Saa3), Gm1975 (BC117090), лектинподобного рецептора клетки-убийцы (Kirl1), стефина A1 (Csta), трансмембранного 4-домена (Ms4a8a), хемокинового (С-С-мотив) лиганда 11 (Ccl11) и сериновых (или цистеиновых) пептидов (Serpina3f) и т.д.) в момент времени после введения фармацевтической композиции по сравнению с уровнем биомаркера у субъекта до введения.

Как будет понятно рядовому специалисту в данной области техники, увеличение или снижение биомаркера, ассоциированного с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством, может быть определено путем сравнения (i) уровня биомаркера, измеряемого у субъекта в определенный момент времени после введения фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33, с (ii) уровнем биомаркера, измеряемым у пациента до введения фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33 (т.е., "базовое измерение"). Определенным моментом времени, в который проводится измерение биомаркера, может быть, например, примерно 4, 8, 12 ч, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 20, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 84, 85 дней или больше после введения фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33.

В соответствии с определенными конкретными вариантами реализации данного изобретения субъект может демонстрировать снижение уровня одного или нескольких веществ из кальцитонина, прокальцитонина, КГРП, резистинподобной (молекулы) альфа (RETNA), хемокинового (С-С-мотив) лиганда 8 (Ccl8), сывороточного амилоида A3 (Saa3), Gm1975 (BC117090), лектинподобного рецептора клетки-убийцы (Kirl1), стефина A1 (Csta), трансмембранного 4-домена (Ms4a8a), хемокинового (С-С-мотив) лиганда 11 (Ccl11) и сериновых (или цистеиновых) пептидов (Serpina3f), после введения фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33 (например, антитело против ИЛ-33 или антагонист на основе рецептора ИЛ-33 (ловушка ИЛ-33)), например, примерно в день 4, день 8, день 14, день 15, день 22, день 25, день 29, день 36, день 43, день 50, день 57, день 64, день 71, день 84 или день 85 после введения первой, второй, третьей или четвертой дозы фармацевтической композиции, содержащей примерно антагонист человеческого ИЛ-33. Доза антагониста ИЛ-33, введенного пациенту, может меняться в зависимости от возраста и размеров пациента, болезни, требующей лечения, условий, пути введения и т.п. Предпочтительную дозу типично рассчитывают в соответствии с весом тела или площадью поверхности тела. При использовании антагониста ИЛ-33 для лечения состояния или ассоциированной с активностью ИЛ-33 болезни у взрослого пациента может быть предпочтительным внутривенное введение антагониста ИЛ-33, нормально, в дозе от примерно 0,01 до примерно 20 мг/кг веса тела, более предпочтительно от примерно 0,02 до примерно 7, от примерно 0,03 до примерно 5 или от примерно 0,05 до примерно 3 мг/кг веса тела.

Субъект в соответствии с данным изобретением может демонстрировать снижение по меньшей мере одного из следующих биомаркеров: полипептида, кодируемого геном CALCA, выбранного из группы, состоящей из кальцитонина, прокальцитонина и КГРП, или может демонстрировать снижение по меньшей мере одного из таких биомаркеров: резистинподобной (молекулы) альфа (RETNA); хемокинового (С-С-мотив) лиганда 8 (Ccl8); сывороточного амилоида A3 (Saa3); Gm1975 (BC117090); лектинподобного рецептора клетки-убийцы (Kirg1); стефина A1 (Csta); трансмембранного 4-домена (Ms4a8a); хемокинового (С-С-мотив) лиганда 11 (Ccl11) и сериновых (или цистеиновых) пептидов (Serpina3f), примерно на 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или больше от базовой линии (где "базовая линия" определяется как уровень биомаркера у субъекта непосредственно перед первым введением). Аналогично, примерно в день 4, день 8, день 14, день 15, день 22, день 25, день 29, день 36, день 43, день 50, день 57, день 64, день 71, день 84 или день 85 после введения первой, второй, третьей или четвертой дозы фармацевтической композиции антагониста человеческого ИЛ-33 субъект, в соответствии с данным изобретением, может демонстрировать снижение по меньшей мере одного из биомаркеров, описанных выше, примерно на 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или больше от базовой линии (где "базовая линия" определяется как уровень биомаркера у субъекта непосредственно перед первым введением).

Данное изобретение также включает способы определения того, является ли субъект пригодным субъектом (например, субъектом, который вероятно благоприятно отреагирует на лечение антагонистом ИЛ-33), для которого введение фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33, будет полезным. Например, если индивидуум перед введением фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33, демонстрирует уровень биомаркера, ассоциированного с опосредованным ИЛ-33 заболеванием или расстройством, указывающий на болезненное состояние, то данный индивидуум вследствие этого идентифицируется как пригодный пациент, для которого введение фармацевтической композиции по изобретению (композиции, содержащей антагонист ИЛ-33) будет полезным. В соответствии с определенными типичными вариантами реализации, индивидуум может быть идентифицирован как пригодный кандидат для лечения, направленного против ИЛ-33, если данный индивидуум демонстрирует один или несколько из следующих признаков: (i) уровень кальцитонина более примерно 5 пг/мл, более примерно 10 пг/мл, более примерно 20 пг/мл, более примерно 30 пг/мл, более примерно 40 пг/мл, более примерно 50 пг/мл, более примерно 60 пг/мл, более примерно 70 пг/мл, более примерно 80 пг/мл, более примерно 90 пг/мл, более примерно 100 пг/мл, или более примерно 200 пг/мл. Дополнительные критерии, такие как другие клинические показатели опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, могут быть использованы в комбинации с любыми биомаркерами, описанными в данном документе для идентификации индивидуума как пригодного кандидата для лечения, направленного против ИЛ-33, как описано в других разделах данного документа (например, увеличение инфильтрации нейтрофилов, эозинофилов или ST2+ CD4 T-клеток в ткань (например, легкое), метаплазия бокаловидных клеток, повышение уровней ST2 в ткани или повышение уровня цитокина, такого как ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-13, ИЛ-33, MCP-1, ФНО α в ткани, а также интерферона-гамма).

В других аспектах изобретения уровни биомаркера и/или изменения уровней биомаркера в результате лечения могут иметь прогностическую ценность для определения эффективности направленной против воздействия ИЛ-33 терапии конкретными агентами против ИЛ-33.

Дополнительный аспект изобретения предусматривает способы определения того, является ли вероятным наличие у субъекта, или развитие опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, причем такие способы включают получение биологического образца от субъекта и измерение уровня по меньшей мере одного из биомаркеров, описанных в данном документе; повышенный уровень по меньшей мере одного биомаркера по сравнению с уровнем биомаркера у субъекта, не имеющего опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства или не демонстрирующего вероятности развития опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, идентифицирует субъекта как субъекта, вероятно имеющего, или с вероятностью развития, опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства.

Дополнительный аспект изобретения касается способов лечения у субъекта опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, включающих введение антагониста ИЛ-33, причем субъекту был поставлен диагноз опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, ему проводилось лечение антагонистом ИЛ-33, и он был отобран для дополнительного лечения антагонистом ИЛ-33 на основании демонстрируемой им пониженной экспрессии биомаркера (например, кальцитонина), в которых пониженную экспрессию биомаркера определяют на основании сравнения с уровнем экспрессии соответствующего биомаркера у субъекта до лечения антагонистом ИЛ-33. Конкретный аспект изобретения касается способов лечения опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства у субъекта, включающих введение антагониста ИЛ-33, причем у субъекта было диагностировано опосредованное ИЛ-33 заболевание или расстройство, ему проводилось лечение антагонистом ИЛ-33, и он был отобран для дополнительного лечения антагонистом ИЛ-33 на основании демонстрируемой им пониженной экспрессии биомаркера, в которых пониженная экспрессия биомаркера по сравнению с уровнями экспрессии до лечения соответствует снижению экспрессии биомаркера примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% или больше.

Антагонисты интерлейкина-33.

Как было раскрыто более подробно выше, данное изобретение охватывает способы, которые включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33. В используемом в данном документе значении "антагонист ИЛ-33" представляет собой любой агент, который связывается с или взаимодействует с ИЛ-33 или с его рецептором и ингибирует нормальную биологическую сигнальную функцию ИЛ-33 при экспрессии ИЛ-33 клеткой *in vitro* или *in vivo*. Неограничительные примеры категорий антагонистов ИЛ-33 включают малые молекулы-антагонисты ИЛ-33, аптамеры против ИЛ-33, антагонисты ИЛ-33 на основе пептидов (например, молекулы пептидных антител ("peptibody")), антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, специфически связывающие человеческий ИЛ-33, или антагонисты ИЛ-33 на основе рецепторов (например, ловушка ИЛ-3), такие как описанные в данном документе.

В одном варианте реализации данное изобретение охватывает способы, включающие введение пациенту человеческого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающихся с человеческим ИЛ-33. В используемом в данном документе значении термин "человеческий ИЛ-33" означает человеческий цитокин, который специфически связывается со своим рецептором ST2. Аминокислотная последовательность человеческого ST2 представлена в SEQ ID NO: 334. Аминокислотная последовательность человеческого ИЛ-33 представлена в SEQ ID NO: 306. Нуклеиновая кислота, кодирующая человеческий ИЛ-33, представлена в SEQ ID NO: 305. Антитела против ИЛ-33 могут быть выбраны из любых одного или нескольких антител, имеющих аминокислотные последовательности, описанные в табл. 1.

В одном варианте реализации данное изобретение охватывает способы, включающие введение пациенту антагониста ИЛ-33 на основе рецептора, например ловушки ИЛ-33, такого как описанные в данном документе. Пять разных типичных примеров ловушек ИЛ-33 по изобретению были сконструированы с использованием стандартных методов молекулярной биологии. В табл. 2a приведено краткое описание разных ловушек ИЛ-33 и их составных частей. В табл. 2b приведены аминокислотные последовательности ловушек ИЛ-33 и их составных частей.

Термин "антитело" в используемом в данном документе значении относится к молекулам иммуноглобулина, содержащим четыре полипептидные цепи - две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные друг с другом дисульфидными связями, а также их мультимерам (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L могут быть дополнительно разделены на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), между которыми расположены более консервативные области, называемые каркасными участками (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В других вариантах реализации изобретения, FR антитела против ИЛ-33 (или его антигенсвязывающего участка) могут быть идентичными последовательностям человеческой зародышевой линии или могут быть естественным образом или искусственно модифицированными. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена путем сравнительного (side-by-side) анализа двух или более CDR.

Термин "антитело" в используемом в данном документе значении также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины "антигенсвязывающий участок" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. в используемом в данном документе значении включают любой встречающийся в природных условиях, получаемый ферментативными методами, синтетический или генетически модифицированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антител с использованием любых пригодных стандартных методик, таких как протеолитический гидролиз или методы рекомбинантной генной инженерии, предусматривающие проведение манипуляций и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и, необязательно, константные домены антитела. Такие ДНК известны и/или могут быть легко получены, например, из коммерческих источников, из ДНК-библиотек (включая, например, библиотеки фаг-антител) или могут быть синтезированы. ДНК может быть секвенирована и подвергнута манипуляциям с использованием химических или молекулярно-биологических методов, например, для размещения одного или нескольких вариабельных и/или константных доменов в пригодной конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничительные примеры антигенсвязывающих фрагментов включают:

- (i) фрагменты Fab;
- (ii) фрагменты $F(ab')_2$;
- (iii) фрагменты Fd;
- (iv) фрагменты Fv;

(v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv);
 (vi) фрагменты dAb и
 (vii) минимальные распознаваемые участки, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих гипервариабельную область антитела (например, выделенный определяющий комплементарность участок (CDR), такой как пептид CDR3), или ограниченный (constrained) пептид FR3-CDR3-FR4.

Другие модифицированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с делецией домена, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIPs), и акульи вариабельные IgNAR-домены, также охватываются выражением "антигенсвязывающий фрагмент", в используемом в данном документе значении.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела будет типично содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и будет обычно содержать по меньшей мере один CDR, расположенный рядом с или в рамке с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , ассоциированный с V_L -доменом, V_H - и V_L -домены могут быть расположены по отношению друг к другу любым пригодным способом. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H - или V_L -домен.

В определенных вариантах реализации антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничительные типичные примеры конфигураций вариабельных и константных доменов, которые могут присутствовать в антигенсвязывающем фрагменте антитела по данному изобретению, включают (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая любые из типичных примеров конфигураций, перечисленных выше, вариабельные и константные домены могут быть связаны непосредственно друг с другом или могут быть соединены с помощью полного или частичного шарнирного или линкерного участка. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, образующих гибкий или полугибкий соединительный элемент между соседними вариабельными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме этого, антигенсвязывающий фрагмент антитела по данному изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любых вышеперечисленных конфигураций вариабельных и константных доменов, нековалентно ассоциированных друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными V_H - или V_L -доменами (например, с помощью дисульфидной связи (связей)).

Как и в случае полных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими).

Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела будет типично содержать по меньшей мере два разных вариабельных домена, причем каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с разными эпитопами одного антигена. Любой формат мультиспецифического антитела может быть адаптирован для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по данному изобретению с использованием обычных методик, известных в данной области техники.

Константная область антитела важна для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточно-зависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основе того, желательно ли для антитела опосредовать цитотоксичность.

Термин "человеческое антитело" в используемом в данном документе значении должен включать не встречающиеся в природе человеческие антитела. Термин включает антитела, рекомбинантно продуцируемые млекопитающими, не являющимися человеком, или клетками млекопитающих, не являющихся человеком. Термин не должен включать антитела, выделенные из или вырабатываемые человеком.

Термин "рекомбинантное человеческое антитело" в используемом в данном документе значении должен включать все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с использованием рекомбинантных средств, такие как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (более подробно описано ниже), антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных человеческих антител (более подробно описано ниже), антитела, полученные от животного (например, мыши), являющегося трансгенным к генам человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992), Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) или антитела, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные любыми другими способами, использующими сплайсинг последовательностей гена человеческого иммуноглобулина для получения других ДНК-последовательностей. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют вариабельные и константные области, полученные из последовательностей зародышевой линии

человеческого иммуноглобулина. В определенных вариантах реализации, однако, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают *in vitro* мутагенезу (или, при использовании животного, являющегося трансгенным по отношению к последовательностям человеческого Ig - *in vivo* соматическому мутагенезу), и, таким образом, аминокислотные последовательности V_H - и V_L -областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, будучи полученными из и родственными V_H - и V_L -последовательностям человеческой зародышевой линии, могут не присутствовать в природных условиях в *in vivo* репертуаре человеческих антител зародышевой линии.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, ассоциированных с гетерогенностью шарнирной области. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильный конструктор из четырех цепей размером приблизительно 150-160 кДа, в котором димеры удерживаются вместе дисульфидными связями между тяжелыми цепями. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, и молекула размером примерно 75-80 кДа состоит из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Разделить эти формы крайне сложно, даже после афинной очистки.

Частота появления второй формы в различных изоформах интактного IgG связана со, без ограничений, структурными отличиями, ассоциированными с шарнирной областью изоформы антитела. Замещение одной аминокислоты в шарнирной области шарнира человеческого IgG4 может значительно снизить появление второй формы (Angal et al. (1993), *Molecular Immunology*, 30:105) до уровней, типично наблюдаемых при использовании шарнира человеческого IgG1. Данное изобретение охватывает антитела, имеющие одну или несколько мутаций в шарнирной, C_H2 - или C_H3 -областях, которые могут быть желательными, например, при продуцировании, для улучшения выхода желательной формы антитела.

"Выделенное антитело" в используемом в данном документе значении означает антитело, которое было идентифицировано и выделено и/или извлечено по меньшей мере из одного компонента его природной среды. Например, антитело, которое было выделено или извлечено по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани, или клетки, в которых антитело в природных условиях существует или в природных условиях продуцируется, представляет собой "выделенное антитело" в целях данного изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, подвергнутые по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. В соответствии с определенными вариантами реализации выделенное антитело может по существу не содержать других клеточных материалов и/или химических веществ.

Термин "специфически связывает" и т.п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Способы определения того, способно ли антитело специфически связываться с антигеном, хорошо известны специалистам и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Например, антитело, которое "специфически связывает" ИЛ-33, в используемом в контексте данного изобретения значении включает антитела, связывающие ИЛ-33 или его часть с K_D менее примерно 1000 нМ, менее примерно 500 нМ, менее примерно 300 нМ, менее примерно 200 нМ, менее примерно 100 нМ, менее примерно 90 нМ, менее примерно 80 нМ, менее примерно 70 нМ, менее примерно 60 нМ, менее примерно 50 нМ, менее примерно 40 нМ, менее примерно 30 нМ, менее примерно 20 нМ, менее примерно 10 нМ, менее примерно 5 нМ, менее примерно 4 нМ, менее примерно 3 нМ, менее примерно 2 нМ, менее примерно 1 нМ или менее примерно 0,5 нМ при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса. Выделенное антитело, которое специфически связывает человеческий ИЛ-33, может, однако, обладать перекрестной реактивностью по отношению к другим антигенам, таким как молекулы ИЛ-33 других видов (не являющихся человеком).

Антитела против ИЛ-33, пригодные для использования в способах по данному изобретению, могут содержать одно или несколько аминокислотных замещений, инсерций и/или делеций в каркасной и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации могут быть легко подтверждены путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Данное изобретение включает способы, предусматривающие использование антител и их антигенсвязывающих фрагментов, полученных из любых аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, в которых одну или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасной и/или CDR-областях мутируют до соответствующего остатка (остатков) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или до соответствующего остатка (остатков) другой последовательности человеческой зародышевой линии, или до консервативного аминокислотного замещения соответствующего остатка (остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательности в данном документе коллективно называются "мутациями зародышевой линии"). Рядовой специалист в данной области техники, начиная с последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, раскрытых в данном документе, может легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или несколько индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинаций. В определенных вариантах реализации все остатки каркасного и/или CDR-участков V_H - и/или V_L -доменов мутируют назад до остатков, присутствующих в исходной

последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах реализации только определенные остатки мутируют назад до исходной последовательности зародышевой линии, например только мутированные остатки, присутствующие в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, присутствующие в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах реализации один или несколько каркасных и/или CDR-остатков мутируют до соответствующего остатка (остатков) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, отличной от последовательности зародышевой линии, из которой первоначально было получено антитело). Кроме этого, антитела по данному изобретению могут содержать любую комбинацию двух или больше мутаций зародышевой линии в каркасной и/или CDR-областях, например, в которых определенные индивидуальные остатки мутируют до соответствующего остатка конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, отличные от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или мутируют до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающих фрагменты, содержащие одну или несколько мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на одно или несколько желательных свойств, такие как повышенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или повышенные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), пониженная иммуногенность и т.д. Использование антител и антигенсвязывающих фрагментов, полученных по такой обобщенной схеме, входит в объем данного изобретения.

Данное изобретение также включает способы, предусматривающие использование антител против ИЛ-33, содержащих варианты любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, имеющие одно или несколько консервативных замещений. Например, данное изобретение включает использование антител против ИЛ-33, имеющих аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными замещениями по сравнению с любыми аминокислотными последовательностями HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытыми в данном документе.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс" в используемом в данном документе значении относится к оптическому явлению, позволяющему анализировать взаимодействия в реальном масштабе времени путем детектирования изменений концентрации белка в матрице биосенсора, например, с использованием системы BIAcore™ (подразделение Biacore Life Sciences фирмы GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Термин "K_D" в используемом в данном документе значении относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, взаимодействующей с конкретным сайтом связывания антигена в варибельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь несколько эпитопов. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками антигена и иметь разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образуется пространственно совмещенными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп образован аминокислотными остатками, расположенными рядом в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы антигена.

Получение человеческих антител.

Способы получения человеческих антител в трансгенных мышах известны специалистам. Любые такие известные способы могут быть использованы в контексте данного изобретения для получения человеческих антител, специфически связывающихся с человеческим ИЛ-33.

Используя технологию VELOCIMMUNE™ (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals) или любой другой известный способ получения моноклональных антител, сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела к ИЛ-33, имеющие человеческую варибельную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенных мышей с геномом, содержащим человеческие варибельные области тяжелой и легкой цепей, функционально связанные с локусами эндогенной мышинной константной области таким образом, чтобы мышь продуцировала антитело, содержащее человеческую варибельную область и мышиную константную область в ответ на антигенную стимуляцию. Выделяют ДНК, кодирующую варибельные области тяжелой и легкой цепей антитела, и функционально связывают с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелой и легкой цепей. Эту ДНК затем экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Обычно проводят антигенное стимулирование мышей VELOCIMMUNE® антигеном, представляющим интерес, и выделяют лимфатические клетки (такие как В-клетки) у мышей, экспрессирующих антитела. Лимфатические клетки могут быть слиты с клеточной линией миеломы для получения бессмертных гибридных клеточных линий, и такие гибридные клеточные линии подвергают скринингу и селекции для идентификации гибридных клеточных линий, продуцирующих антитела, специфиче-

ские по отношению к антигену, представляющему интерес. Может быть выделена ДНК, кодирующая переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, и связана с желательными изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может вырабатываться в клетке, такой как клетки СНО (клетки яичника китайского хомячка). Альтернативно, ДНК, кодирующие антиген-специфические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, могут быть выделены непосредственно из антиген-специфических лимфоцитов.

Сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Антитела подвергают анализу и селекции по желательным характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д., с использованием стандартных процедур, известных квалифицированным специалистам в данной области техники. Мышинные константные области заменяют на желательную человеческую константную область для получения полностью человеческого антитела по изобретению, например, дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Хотя выбранная константная область может меняться в зависимости от конкретного назначения, высокие характеристики аффинности связывания антигена и специфичности по отношению к мишени определяются переменной областью.

В общем, антитела, которые могут быть использованы в способах по данному изобретению, обладают высокой аффинностью, как описано выше, при проведении измерений путем связывания с антигеном, иммобилизованным на твердой фазе, или в фазе раствора. Мышинные константные области заменяют на желательные человеческие константные области для получения полностью человеческих антител по изобретению. Хотя выбранная константная область может меняться в зависимости от конкретного применения, высокие характеристики аффинности связывания антигена и специфичности по отношению к мишени определяются переменной областью.

Конкретные примеры человеческих антител или антигенсвязывающих фрагментов антител, специфически связывающих ИЛ-33, которые могут быть использованы в контексте способов по данному изобретению, включают любое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в переменной области тяжелой цепи (HCVR), имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 и 308. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать три CDR легкой цепи (LCVR1, LCVR2, LCVR3) в переменной области легкой цепи (LCVR), имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 и 316. Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны специалистам и могут быть использованы для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в данном документе. Типичные примеры соглашений, которые могут быть использованы для идентификации границ CDR, включают, например, определение Kabat, определение Chothia и определение AbM. В общих чертах определение Kabat основано на изменчивости последовательности, определение Chothia основано на положении областей структурных петель, и определение AbM представляет собой компромисс между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9212 (1989). Имеются также публичные базы данных, позволяющие идентифицировать последовательности CDR в антителе.

В определенных вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит шесть CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в парах аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей (HCVR/LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 и 308/316.

В определенных вариантах реализации данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 и 308/316.

В исследованиях, описанных в прилагаемых примерах, используется антитело к человеческому ИЛ-33, названное H4H9675P. Это антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, имеющих SEQ ID NO: 274/282, и домены HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3, представленные SEQ ID NO: 276-278-280/SEQ ID NOs: 284-286-288. Однако способы по данному изобретению могут быть реализованы с использованием любого антитела против ИЛ-33, раскрытого в данном документе, а также вариантов и антигенсвязывающих фрагментов такого антитела.

Фармацевтические композиции.

Данное изобретение охватывает способы, включающие введение пациенту антагониста ИЛ-33, в которых антагонист ИЛ-33 входит в состав фармацевтической композиции. Фармацевтические композиции по изобретению составляют с использованием пригодных носителей, эксципиентов и других агентов, обеспечивающих пригодные перенос, доставку, переносимость и т.п. Множество соответствующих

рецептур композиций приведено в рецептурном справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Такие композиции включают, например, порошки, пасты, жидкие мази, желе, воск, масла, липиды, липид (катионный или анионный)-содержащие везикулы (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные поглощающие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (carbowax) (полиэтиленгликоли различного молекулярного веса), 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 антитела, вводимая пациенту в соответствии со способами по данному изобретению, может меняться в зависимости от возраста и размеров пациента, симптомов, условий, пути введения и т.п. Дозу типично рассчитывают в соответствии с весом тела или площадью поверхности тела. В зависимости от тяжести состояния, могут регулироваться частота и продолжительность лечения. Эффективные дозировки и схемы введения фармацевтических композиций, содержащих антитела против ИЛ-33, могут быть определены эмпирически; например прогресс пациента может контролироваться путем проведения периодической оценки с соответствующей регулировкой дозы. Кроме этого, может проводиться межвидовой пересчет дозировок с использованием способов, хорошо известных специалистам (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351). Конкретные примеры доз антител к ИЛ-33 и схемы их введения, которые могут быть использованы в контексте данного изобретения, раскрыты в других разделах данного документа.

Различные системы доставки являются известными и могут быть использованы для введения фармацевтической композиции по изобретению, включая, например, инкапсулирование в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, без ограничений, интрадермальный, внутримышечный, интраперитонеальный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути введения. Композиция может быть введена любым удобным способом, например путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальную или кожно-слизистую выстилку (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.), и может быть введена вместе с другими биологически активными агентами.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме этого, что касается подкожной доставки, устройство для доставки типа шприц-ручки может быть легко применено для доставки фармацевтической композиции по данному изобретению. Такое устройство доставки типа шприц-ручки может быть предназначено для многократного или разового использования. Устройство доставки типа шприц-ручки для многократного применения обычно использует сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После введения всей фармацевтической композиции из картриджа, когда картридж опустеет, пустой картридж может быть легко удален и заменен на новый картридж, содержащий фармацевтическую композицию. Устройство доставки типа шприц-ручки после этого может быть использовано повторно. В устройстве доставки типа шприц-ручки для одноразового применения сменный картридж отсутствует. Вместо этого, устройство доставки типа шприц-ручки для одноразового применения поставляется предварительно наполненной фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре устройства. После опорожнения резервуара фармацевтической композиции устройство выбрасывают.

Многочисленные устройства доставки типа шприц-ручки для многократного применения и автоинжектора находят применение для подкожной доставки фармацевтической композиции по данному изобретению. Примеры включают, без ограничений, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), в качестве нескольких примеров. Примеры устройств доставки типа шприц-ручек для одноразового применения, используемых для подкожной доставки фармацевтической композиции по данному изобретению, включают, без ограничений, шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.), и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), в качестве нескольких примеров.

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена с помощью системы с контролируемым высвобождением. В одном варианте реализации может быть использован насос (см. Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте реализации могут быть использованы полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В еще одном варианте реализации система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости к цели введения компо-

зии, благодаря чему требуется использование лишь части от системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в: *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, p. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением описаны в обзоре Langer, 1990, *Science*, 249:1527-1533.

Препараты для инъекций могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Такие препараты для инъекций могут быть приготовлены известными способами. Например, препараты для инъекций могут быть приготовлены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или в масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водных сред для инъекций используются, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т.д., который может быть использован в комбинации с пригодным солюбилизирующим агентом, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (polyalcohol) (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (аддукт полиоксиэтилена (50 моль) и гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые могут быть использованы в комбинации с солюбилизирующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Приготовленная таким образом инъекция может быть помещена в пригодную ампулу.

Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде лекарственных форм со стандартными дозами, содержащими определенную дозу активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в виде стандартных доз включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д.

Типичные примеры фармацевтических композиций, содержащих антитело против ИЛ-33, которые могут быть использованы в контексте данного изобретения, раскрыты, например, в публикации патентной заявки США № 2014/0271658.

Дозировка.

Количество антагониста ИЛ-33 (например, антитела против ИЛ-33), вводимое субъекту в соответствии со способами по данному изобретению, представляет собой, обычно, терапевтически эффективное количество. В используемом в данном документе значении фраза "терапевтически эффективное количество" означает количество антагониста ИЛ-33, которое приводит к детектируемому улучшению одного или нескольких симптомов или показателей опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства.

"Терапевтически эффективное количество" также включает такое количество антагониста ИЛ-33, которое ингибирует, предотвращает, уменьшает или задерживает прогрессирование такого заболевания или расстройства у субъекта.

В случае антител против ИЛ-33, терапевтически эффективное количество может составлять от примерно 0,05 до примерно 600 мг, например, примерно 0,05 мг, примерно 0,1 мг, примерно 1,0 мг, примерно 1,5 мг, примерно 2,0 мг, примерно 10 мг, примерно 20 мг, примерно 30 мг, примерно 40 мг, примерно 50 мг, примерно 60 мг, примерно 70 мг, примерно 80 мг, примерно 90 мг, примерно 100 мг, примерно 110 мг, примерно 120 мг, примерно 130 мг, примерно 140 мг, примерно 150 мг, примерно 160 мг, примерно 170 мг, примерно 180 мг, примерно 190 мг, примерно 200 мг, примерно 210 мг, примерно 220 мг, примерно 230 мг, примерно 240 мг, примерно 250 мг, примерно 260 мг, примерно 270 мг, примерно 280 мг, примерно 290 мг, примерно 300 мг, примерно 310 мг, примерно 320 мг, примерно 330 мг, примерно 340 мг, примерно 350 мг, примерно 360 мг, примерно 370 мг, примерно 380 мг, примерно 390 мг, примерно 400 мг, примерно 410 мг, примерно 420 мг, примерно 430 мг, примерно 440 мг, примерно 450 мг, примерно 460 мг, примерно 470 мг, примерно 480 мг, примерно 490 мг, примерно 500 мг, примерно 510 мг, примерно 520 мг, примерно 530 мг, примерно 540 мг, примерно 550 мг, примерно 560 мг, примерно 570 мг, примерно 580 мг, примерно 590 мг или примерно 600 мг антитела против ИЛ-33. В определенных вариантах реализации, субъекту вводят 75, 150, 200 или 300 мг антитела против ИЛ-33.

Количество антагониста ИЛ-33, содержащегося в индивидуальных дозах, может быть выражено в миллиграммах антитела на 1 кг веса тела пациента (т.е. мг/кг). Например, антагонист ИЛ-33 может быть введен пациенту в дозе от примерно 0,0001 до примерно 10 мг/кг веса тела пациента.

Комбинированная терапия.

Способы по данному изобретению в соответствии с определенными вариантами реализации включают введение субъекту одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов в комбинации с антагонистом ИЛ-33. В используемом в данном документе значении выражение "в комбинации с" означает, что дополнительные терапевтические агенты вводят до, после или одновременно с фармацевтической композицией, содержащей антагонист ИЛ-33.

Например, при введении "до" фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33, дополнительный терапевтический агент может быть введен за примерно 72 ч, примерно 60 ч, примерно 48 ч, примерно 36 ч, примерно 24 ч, примерно 12 ч, примерно 10 ч, примерно 8 ч, примерно 6 ч, примерно 4 ч, примерно 2 ч, примерно 1 час, примерно 30 мин, примерно 15 мин или

примерно 10 мин до введения фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33. При введении "после" фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33, дополнительный терапевтический агент может быть введен через примерно 10 мин, примерно 15 мин, примерно 30 мин, примерно 1 ч, примерно 2 ч, примерно 4 ч, примерно 6 ч, примерно 8 ч, примерно 10 ч, примерно 12 ч, примерно 24 ч, примерно 36 ч, примерно 48 ч, примерно 60 ч или примерно 72 ч после введения фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33.

Введение "совместно" с фармацевтической композицией, содержащей антагонист ИЛ-33, означает, что дополнительный терапевтический агент вводят субъекту в виде отдельной лекарственной формы на протяжении периода времени менее 5 мин (до, после или одновременно) от момента введения фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33 или вводят субъекту в виде одного комбинированного лекарственного препарата, содержащего как дополнительный терапевтический агент, так и антагонист ИЛ-33.

Данное изобретение включает способы лечения опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, включающие введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, антитела против человеческого ИЛ-33, или ловушки ИЛ-33, в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. Примеры дополнительных терапевтических агентов, которые могут быть введены в комбинации с антителом против человеческого ИЛ-33, при практической реализации способов по данному изобретению, включают, без ограничений, нестероидное противовоспалительное средство (NSAID), стероид, кортикостероид (ингаляцией или местно), иммунодепрессант (например, циклофосфамид), антихолинэргическое средство (например, тиотропий), средство, действующее на мускариновые рецепторы (например, гликопирроний), ингибитор фосфодиэстеразы (например, теофиллин, рофлумиласт, циломиласт), бета-блокатор, циклоспорин, такролимус, пимекролимус, азатиоприн, метотрексат, кромолин-натрий, ингибитор протеиназы, бронходилататор, бета-2-агонист, антигистаминное средство, эпинефрин, противозастойное средство, ингибитор лейкотриена, ингибитор тучных клеток, антагонист тимического стромального лимфопоэтина (TSLP), антагонист ФНП, антагонист IgE, антагонист ИЛ-1, антагонист ИЛ-4 или ИЛ-4R, антагонист ИЛ-13 или ИЛ-13R, двойной антагонист ИЛ-4/ИЛ-13, антагонист ИЛ-5, антагонист ИЛ-6 или ИЛ-6R, антагонист ИЛ-8, антагонист ИЛ-9, антагонист ИЛ-12/ИЛ-23, антагонист ИЛ-22, антагонист ИЛ-17, антагонист ИЛ-31, ингибитор PDE4 для перорального введения, антагонист ИЛ-25 и другой антагонист ИЛ-33 или другие антитела или антагонист ИЛ-33 на основе рецептора и любое другое соединение, известное как используемое для лечения, предотвращения или облегчения опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства у человека. Например, для совместного введения может быть приготовлена фармацевтическая композиция, содержащая как антитело против человеческого ИЛ-33, так и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент. Количество дополнительного терапевтического агента, вводимое в комбинации с антителом против человеческого ИЛ-33, при практической реализации способов по данному изобретению может быть легко определено с использованием обычных методов, известных и легко доступных специалистам в данной области техники.

Схемы введения.

Данное изобретение охватывает способы, включающие введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33, с частотой введения доз примерно четыре раза в неделю, два раза в неделю, раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в пять недель, раз в шесть недель, раз в восемь недель, раз в двенадцать недель или с меньшей частотой, при условии достижения терапевтического ответа. В определенных вариантах реализации, включающих введение фармацевтической композиции, содержащей антитело против ИЛ-33, (вводят) раз в неделю дозу, содержащую от примерно 0,01 до примерно 20 мг/кг веса тела, более предпочтительно, от примерно 0,02 до примерно 7, от примерно 0,03 до примерно 5 или от примерно 0,05 до примерно 3 мг/кг веса тела.

В соответствии с определенными вариантами реализации данного изобретения многократные дозы антагониста ИЛ-33 могут быть введены субъекту на протяжении определенного периода времени. Способы в соответствии с этим аспектом изобретения включают последовательное введение субъекту многократных доз антагониста ИЛ-33. В используемом в данном документе значении "последовательное введение" означает, что каждую дозу антагониста ИЛ-33 вводят субъекту в разные моменты времени, например, в разные дни, разделенные предварительно определенным интервалом (например, в часах, днях, неделях или месяцах). Данное изобретение охватывает способы, включающие последовательное введение пациенту разовой начальной дозы антагониста ИЛ-33, с последующей одной или несколькими повторными дозами антагониста ИЛ-33 и, необязательно, с последующей одной или несколькими третичными дозами антагониста ИЛ-33.

Термины "начальная доза", "повторные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антагониста ИЛ-33. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которая вводится в начале схемы лечения (также называется "исходной дозой"); "повторные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после повторных доз. Начальная, повторные и третичные дозы могут, все, содержать одинаковое количество антагониста ИЛ-33, но обычно могут отличаться друг от друга по частоте

введения. В определенных вариантах реализации, однако, количества антагониста ИЛ-33, содержащиеся в начальной, повторных и/или третичных дозах, отличаются друг от друга (например, изменяется в большую или меньшую сторону, в зависимости от обстоятельств) в ходе лечения. В определенных вариантах реализации две или больше (например, 2, 3, 4 или 5) дозы начального периода схемы лечения называют "ударными дозами", с менее частым введением последующих доз (например, "поддерживающих доз").

В одном типичном варианте реализации данного изобретения каждая повторная и/или третичная доза вводится через период от 1 до 14 (например, 1, $1\frac{1}{2}$, 2, $2\frac{1}{2}$, 3, $3\frac{1}{2}$, 4, $4\frac{1}{2}$, 5, $5\frac{1}{2}$, 6, $6\frac{1}{2}$, 7, $7\frac{1}{2}$, 8, $8\frac{1}{2}$, 9, $9\frac{1}{2}$, 10, $10\frac{1}{2}$, 11, $11\frac{1}{2}$, 12, $12\frac{1}{2}$, 13, $13\frac{1}{2}$, 14, $14\frac{1}{2}$ или больше) недель после последней предшествующей дозы. Фраза "последняя предшествующая доза" в используемом в данном документе значении означает, в последовательности многократного введения, дозу антагониста ИЛ-33, которую вводят пациенту непосредственно перед введением первой последующей дозы в последовательности, без промежуточных доз.

Способы в соответствии с этим аспектом изобретения могут включать введение пациенту любого числа повторных и/или третичных доз антагониста ИЛ-33. Например, в определенных вариантах реализации пациенту вводят только одну повторную дозу. В других вариантах реализации пациенту вводят две или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) повторные дозы.

Аналогично, в определенных вариантах реализации пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах реализации пациенту вводят две или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) третичные дозы.

В вариантах реализации, предусматривающих множество повторных доз, каждая повторная доза может быть введена с таким же временным интервалом (frequency), как и другие повторные дозы. Например, каждая повторная доза может быть введена пациенту через 1-2 недели после последней предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах реализации, предусматривающих множество третичных доз, каждая третичная доза может быть введена с таким же временным интервалом (frequency), как и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может быть введена пациенту через 2-4 недели после последней предшествующей дозы. Альтернативно, частота введения пациенту повторных и/или третичных доз может меняться в ходе лечения. Частота введения может также регулироваться в ходе лечения врачом в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Данное изобретение охватывает схемы введения, включающие возможность повышения дозы (также называемые в данном документе "изменением дозы"). В используемом в данном документе значении "возможность повышения дозы" означает, что после получения определенного числа доз ингибитора ИЛ-33, если у пациента не будет достигнуто определенное улучшение одного или нескольких заданных терапевтических параметров (например, улучшение на по меньшей мере 20%), или каким-либо иным образом будет продемонстрировано очевидное отсутствие эффективности, по мнению врача или поставщика медицинских услуг, дозу ингибитора ИЛ-33 после этого увеличивают. Например, в случае терапевтической схемы, включающей введение 150 мг доз антитела против ИЛ-33 пациенту с частотой раз в две недели, если после 8, 10, 12, 14, 16 или больше недель у пациента не будет достигнуто улучшение одного параметра по меньшей мере на 20% или если пациент демонстрирует очевидное отсутствие эффективности, по мнению врача или другого поставщика медицинских услуг, то дозу антитела против ИЛ-33 увеличивают, например, до 200, 300 мг или больше, с введением с этого момента раз в две недели (например, начиная с недели 10, 12, 14, 16, 18 или позже).

Популяции лечения.

Данное изобретение охватывает способы, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33. В используемом в данном документе значении выражение "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не являющееся человеком животное, которые демонстрируют один или несколько симптомов или признаков опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, таких как описанные в данном документе (например, воспаление, эозинофилия в легких, инфильтрация нейтрофилов в легкие, повышенные уровни определенных цитокинов в легких, таких как, без ограничений, ИЛ-5 и т.д.), и/или которым был поставлен диагноз любого опосредованного ИЛ-33 заболевания или расстройства, описанных в данном документе.

Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы обеспечить для рядовых специалистов в данной области техники полное раскрытие и описание того, как следует готовить и использовать способы и композиции по изобретению, и не должны ограничивать объем того, что авторы считают своим изобретением. Были приложены усилия к тому, чтобы обеспечить точность в отношении используемых числовых значений (например, количества, температура и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не будет указано иное, то части являются весовыми частями, молекулярный вес является средним молекулярным весом, температура выражена в градусах Цельсия и давление является атмосферным или близким к нему.

Пример 1. Получение человеческих антител к человеческому ИЛ-33.

Иммуноген, содержащий человеческий ИЛ-33, вводили непосредственно вместе с адъювантом для

стимулирования иммунной реакции мыши VELOCIMMUNE®, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей человеческого иммуноглобулина-каппа. Иммунную реакцию на антитело контролировали с помощью ИЛ-33-специфического иммунологического анализа. При желательной иммунной реакции собирали спленоциты и проводили слияние с клетками мышинной миеломы для сохранения их жизнеспособности и получения гибридных клеточных линий. Гибридные клеточные линии подвергали скринингу и селекции для идентификации клеточных линий, продуцирующих ИЛ-33-специфические антитела. С использованием этой методики было получено несколько химерных антител против ИЛ-33 (т.е. антител, имеющих человеческие переменные домены и мышинные константные домены); типичные примеры полученных таким способом антител были обозначены следующим образом: H1M9559N, H1M9566N, H1M9568N и H1M9565N. Человеческие переменные домены из химерных антител были впоследствии клонированы в человеческие константные домены для получения полностью человеческих антител против ИЛ-33, как описано в данном документе.

Антитела против ИЛ-33 были также выделены непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в US 2007/0280945A1. С использованием этого способа было получено несколько полностью человеческих антител против ИЛ-33 (т.е. антител, имеющих человеческие переменные домены и человеческие константные домены); типичные примеры полученных таким способом антител были обозначены следующим образом: H4N9629P, H4N9633P, H4N9640P, H4N9659P, H4N9660P, H4N9662P, H4N9663P, H4N9664P, H4N9665P, H4N9666P, H4N9667P, H4N9670P, H4N9671P, H4N9672P, H4N9675P и H4N9676P.

Определенные биологические свойства типичных примеров антител против ИЛ-33, полученных в соответствии со способами, указанными в данном примере, описаны более подробно в приведенных далее примерах.

Пример 2. Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей.

В табл. 1 указаны пары аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и последовательности CDR выбранных антител против ИЛ-33 и их соответствующие идентификаторы антител.

Таблица 1

Обозначение антитела	SEQ ID NOs:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M9559N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1M9566N	18	20	22	24	26	28	30	32
H1M9568N	34	36	38	40	42	44	46	48
H4N9629P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4N9633P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4N9640P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4N9659P	98	100	102	104	106	108	110	112
H4N9660P	114	116	118	120	122	124	126	128
H4N9662P	130	132	134	136	138	140	142	144
H4N9663P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4N9664P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4N9665P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4N9666P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4N9667P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4N9670P	226	228	230	232	234	236	238	240
H4N9671P	242	244	246	248	250	252	254	256
H4N9672P	258	260	262	264	266	268	270	272
H4N9675P	274	276	278	280	282	284	286	288
H4N9676P	290	292	294	296	298	300	302	304
H1M9565N	308	310	312	314	316	318	320	322

Антитела в данном документе типично обозначаются в соответствии со следующей номенклатурой: Fc-префикс (например, "H1M" или "H4N"), за которым следуют цифровой идентификатор (например, "9559", "9566" или "9629", как указано в табл. 1), и суффикс "P" или "N". Таким образом, в соответствии с этой номенклатурой антитело может быть названо, например, "H1M9559N", "H1M9566N", "H4N9629P" и т.д. Префиксы H1M и H4N в обозначениях антител, используемых в данном документе, указывают конкретный изотип Fc-области антитела. Например, антитело "H1M" содержит Fc мышинового IgG1, в то время как "H4N" антитело содержит Fc человеческого IgG4. Рядовому специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело, имеющее определенный изотип Fc, может быть превращено в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc мышинового IgG1 можно превратить в антитело с Fc человеческого IgG4 и т.д.), но в любом случае переменные домены (включая CDR), обозначенные цифровыми идентификаторами в табл. 1, остаются без изменений, и следует ожидать, что связывающие свойства будут идентичными или по существу аналогичными независимо от природы Fc-домена.

Пример 3. Конструирование ловушек ИЛ-33.

Было сконструировано пять разных типичных примеров антагонистов ИЛ-33 (ловушек ИЛ-33) по изобретению с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Первый антагонист ИЛ-33 (hST2-hFc, SEQ ID NO: 323) состоит из растворимой внеклеточной области человеческого ST2 (SEQ ID NO: 327), С-конец которой присоединен к N-концу Fc-области человеческого IgG1 (SEQ ID NO: 331). Второй антагонист ИЛ-33 (hST2-mFc, SEQ ID NO: 324) состоит из растворимой внеклеточной области человеческого ST2 (SEQ ID NO: 327), С-конец которой присоединен к N-концу Fc-области мышиного IgG2a (SEQ ID NO: 332). Третий антагонист ИЛ-33 (hST2-hIL1RAcP-mFc, SEQ ID NO: 325) представляет собой продукт слияния со вставкой в цепь (in-line fusion), состоящий из расположенных последовательно, начиная с N-конца, человеческого ST2 (SEQ ID NO: 327), внеклеточной области человеческого IL-1RAcP (SEQ ID NO: 329) и Fc мышиного IgG2a (SEQ ID NO: 332) на С-конце. Четвертый антагонист ИЛ-33 (mST2-mIL1RAcP-mFc, SEQ ID NO: 326) представляет собой продукт слияния со вставкой в цепь, состоящий из расположенных последовательно, начиная с N-конца, мышиного ST2 (SEQ ID NO: 328), внеклеточной области мышиного IL-1RAcP (SEQ ID NO: 330) и Fc мышиного IgG2a (SEQ ID NO: 332) на С-конце. Пятый антагонист ИЛ-33 (hST2-hIL1RAcP-hFc, SEQ ID NO: 335) представляет собой продукт слияния со вставкой в цепь, состоящий из расположенных последовательно, начиная с N-конца, человеческого ST2 с SEQ ID NO: 327, внеклеточной области человеческого IL-1RAcP (SEQ ID NO: 329), и Fc человеческого IgG1 (SEQ ID NO: 331) на С-конце. В табл. 2a приведено краткое описание разных антагонистов ИЛ-33 и их составных частей. В табл. 2b приведены аминокислотные последовательности антагонистов ИЛ-33 и их составных частей.

Таблица 2a

Краткое описание антагонистов ИЛ-33 (ловушек ИЛ-33)

Антаго- нист ИЛ-33	Аминокислотная последова- тельность полной молекулы антагониста	Компонент D1	Компонент D2	Компонент M
hST2-hFc	SEQ ID NO:323	внеклеточный человеческий ST2 (SEQ ID NO:327)	отсутствует	Fc человеческо го IgG1 (SEQ ID NO:331)
hST2-mFc	SEQ ID NO:324	внеклеточный человеческий ST2 (SEQ ID NO:327)	отсутствует	Fc мышиного IgG2a (SEQ ID NO:332)
hST2- hIL1RAcP -mFc	SEQ ID NO:325	внеклеточный человеческий ST2 (SEQ ID NO:327)	внеклеточный человеческий IL-1RAcP (SEQ ID NO:329)	Fc мышиного IgG2a (SEQ ID NO:332)
mST2- mIL1RAcP -mFc	SEQ ID NO:326	внеклеточный мышиный ST2 (SEQ ID NO:328)	внеклеточный мышиный IL- 1RAcP (SEQ ID NO:330)	Fc мышиного IgG2a (SEQ ID NO:332)
hST2- hIL1RAcP -hFc	SEQ ID NO: 335	внеклеточный человеческий ST2 (SEQ ID NO:327)	внеклеточный человеческий IL-1RAcP (SEQ ID NO:329)	Fc человеческо го IgG1 (SEQ ID NO:331)

Аминокислотные последовательности

Идентификатор	Последовательность
SEQ ID NO:323 (hST2-hFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQL LKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSE KNSKIYCPIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEDAGDYT CKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLPVIGAPAQNEIKEVEIGKANLTC SACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQEEGQNGQSFNSGLACLDMLRI ADVKEEDLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHSDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:324 (hST2-mFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQL LKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSE KNSKIYCPIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEDAGDYT CKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLPVIGAPAQNEIKEVEIGKANLTC SACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQEEGQNGQSFNSGLACLDMLRI ADVKEEDLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHSEPRGPTIKPCPPCKCP APNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHT AQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN TEPVLDSGDSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG K
SEQ ID NO:325 (hIL1RAcP-mFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQL LKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSE KNSKIYCPIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEDAGDYT CKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLPVIGAPAQNEIKEVEIGKANLTC SACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQEEGQNGQSFNSGLACLDMLRI ADVKEEDLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHSSERCDDWGLDTRMQI QVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSSTAHSAGLTLIYWYTRQDRDLEEPINFRLEN RISKEKDVLFWRPTLLNDTGNITCMLRNTTYCSKVAFFLEVQKDSFCNSPMKL PVHKLIEYGIQIRITCPNVDGYFPSSVKPTITWYMGYKIQNFNNVIEPEGMNLSFL IALISNNGNYTCVVYPENGRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVE KEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITDITINESISHSRTEDET RTQILSIKKVTSDELKRSYVCHARSAGKGEVAKAAKVKQKVPAPRYTVEESGPRG PTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQI SWFVNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKD LPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSGDSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO:326 (mST2- mIL1RAcP-mFc)	SKSSWGLENEALIVRCPRQGRSTYPVEWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQL LPAARVEDSGIYACVIRSPNLNKTGYLNVTHKKPPSCNIPDYLMYSTVRGSDKNF KITCPTIDLYNWTAPVQWFKNCALQEPFRFRAHRSYLFIDNVTHDDEGDYTCQF THAENGNTYIVTATRSFTVEEKGFSPFVITNPPYNTMEVEIGKPASIAACSACF GKGSHFLADVLWQINKTVVGNFGAARIEEGRNNESSNDMDCLTSVLRTGVT EKDLSLEYDCLALNLHGMIRHTIRLRKQPIDHRSERCDDWGLDTRMQIVFED EPARIKCPLEHFLKFNYSSTAHSAGLTLIYWYTRQDRDLEEPINFRLENRISKEK DVLWFRPTLLNDTGNITCMLRNTTYCSKVAFFLEVQKDSFCNSAMRFPVHKM YIEHGIHKITCPNVDGYFPSSVKPSVTWYKGCTEIVDFHNVLPPEGMNLSFFIPLVS NNGNYTCVVYPENGRLFHLTRTVTVKVVGSPKDALPPQIYSPNDRVVYEKEPG EELVIPCKVYFSFIMDSHNEVWWTIDGKKPDDITDITINESVSYSSTEDETRQI LSIKKVTPEDLRRNYVCHARNTKGEAEQAQKVKQKVIIPRYTVEESGPRGPTIKP CPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWV NNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPI ERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGK TELNYKNTEPVLDSGDSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTK SFSRTPGK
SEQ ID NO:327 (внеклеточный домен человеческого ST2)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQL LKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSE KNSKIYCPIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEDAGDYT CKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLPVIGAPAQNEIKEVEIGKANLTC SACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQEEGQNGQSFNSGLACLDMLRI ADVKEEDLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHS
SEQ ID NO:328 (внеклеточный домен мышиного ST2)	SKSSWGLENEALIVRCPRQGRSTYPVEWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQL LPAARVEDSGIYACVIRSPNLNKTGYLNVTHKKPPSCNIPDYLMYSTVRGSDKNF KITCPTIDLYNWTAPVQWFKNCALQEPFRFRAHRSYLFIDNVTHDDEGDYTCQF THAENGNTYIVTATRSFTVEEKGFSPFVITNPPYNTMEVEIGKPASIAACSACF GKGSHFLADVLWQINKTVVGNFGAARIEEGRNNESSNDMDCLTSVLRTGVT EKDLSLEYDCLALNLHGMIRHTIRLRKQPIDHR
SEQ ID NO:329 (внеклеточный домен человеческого IL1RAcP)	SERCDDWGLDTRMQIVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSSTAHSAGLTLIYWYTR QDRDLEEPINFRLENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGNITCMLRNTTYCSKVAFFL EVVQKDSFCNSPMKLPHVHKLIEYGIQIRITCPNVDGYFPSSVKPTITWYMGYKI QNFNNVIEPEGMNLSFFIPLVSNNNGNYTCVVYPENGRTFHLTRTLTVKVVGSPK NAVPPVIHSPNDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDIT DITINESISHSRTEDETTRQILSIKKVTSDELKRSYVCHARSAGKGEVAKAAKVKQK VPAPRYTVE
SEQ ID NO:330 (внеклеточный домен мышиного IL1RAcP)	SERCDDWGLDTRMQIVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSSTAHSAGLTLIYWYTR QDRDLEEPINFRLENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGNITCMLRNTTYCSKVAFFL EVVQKDSFCNSAMRFPVHKMYIEHGIHKITCPNVDGYFPSSVKPSVTWYKGCTE IVDFHNVLPPEGMNLSFFIPLVSNNNGNYTCVVYPENGRLFHLTRTVTVKVVGSPK DALPPQIYSPNDRVVYEKEPGEELLIPCKVYFSFIMDSHNEVWWTIDGKKPDDIT DITINESVSYSSTEDETRQILSIKKVTPEDLRRNYVCHARNTKGEAEQAQKVK QKVIIPRYTVE

SEQ ID NO:331 (Fc человеческого IgG1)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:332 (Fc мышиного IgG2a)	EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVDVSEDD PDVQISWVFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKV NNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIY VEWNTNGKTELNYKNTPEVLDSGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTKFSRTPGK
SEQ ID NO:333 (Fc мышиного IgG2a)	SITGISPITESLASLSTYNDQSFITFALEDESIEIYVEDLKKDKKKDKVLLSYYESQH PSSSESGDGVGDKMLMVLSTPTKDFWLQANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLH NRSFNCVSFECKTDPGVFIGVDKNHLALIKVDYSENLGSENLFLKLEIHHHHHH H
SEQ ID NO:335 (hST2- hIL1RAcP-hFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQL LKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSE KNSKIYCTIDLYNWTAPELWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNMVEDAGDYT CKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFLFPVIGAPAQNEIKEVEIKGNANLTC SACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNGQSFNGLACLDMLVRI ADVKEEDLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHSSERCDWGLDTMRQI QVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLWYWTQRDRLEEPINFRLEN RISKEKDLVWFRPTLLNDTGNYTCLMLRNTTYCSKVAFLVQKDSFCNSPMKL PVHKLIEYGIQIRITCPNVDGYFPSSVKPTITWYMGCKYIQNFNNVIEGMMNLSL IALISNNGNYTCVVTYPENGRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVE KEPGEELLIPCTVYFVSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISHRTEDET RTQILSIKVTSEDLKRSYVCHARSAGGEVAKAAKVKQKVPAPRYTVEDEKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSL LSPGK

Пример 4. Биомаркеры активности ИЛ-33.

Были проведены исследования с целью определения генов, имеющих повышенное содержание у мышей, сверхэкспрессирующих ИЛ-33. В описанных ниже исследованиях представлены способы и животные модели, использованные для определения того, какие гены коррелируют с экспрессией ИЛ-33 *in vivo*, и какие гены подвергались коррекции после лечения животных антагонистом ИЛ-33.

Гидродинамическая доставка ДНК.

Мышиный ИЛ-33 сверхэкспрессировался у мышей дикого типа (WT) в результате гидродинамической доставки ДНК (HDD). Для HDD-эксперимента мышам дикого типа делали инъекцию 50 мкг или 25 мкг (μg) плазмиды, экспрессирующей полноразмерный мышиный ИЛ-33 (см. GenBank, № доступа NM_001164724; мышиный ИЛ-33) или 50, или 25 мкг (μg) этой же плазмиды, лишенной кодирующей последовательности (пустой вектор). Мышей умерщвляли через 7 дней после HDD-инъекции и брали кровь, дорсальные спинномозговые ганглии (DRG), сердце, почку, печень, легкое и селезенку. Десять генов с наибольшей экспрессией в этих тканях приведены в табл. 4.

Анализы взятых тканей на микрочипе.

Су3-СТР включали в амплифицированную кПНК из 500 нг общей РНК с использованием набора для амплификации РНК QuickAmp RNA Amplification Kit (Agilent). Меченую Су3 кПНК из каждого образца затем гибридизировали с выполненным на заказ чипом Agilent, содержащим 43538 60-мерные олигонуклеотиды, перекрывающие мышиный транскриптом. Гибридизацию и промывку чипов проводят в соответствии с протоколом Agilent и чипы сканируют с помощью сканера для микрочипов Agilent Microarray scanner. Данные получают с отсканированных изображений чипов с использованием прикладной программы Agilent Feature Extraction Software 9.5.

Взятие сыворотки.

Цельную кровь собирают в пробирки Microtainer® путем сердечной пункции в конце исследований. Крови дают свернуться, оставляя ее в состоянии покоя при комнатной температуре по меньшей мере на 30 мин. Осадок свернувшейся крови и клеток собирают центрифугированием при 18000×g в течение 10 мин при 4°C в охлаждаемой центрифуге. Полученный супернатант, называемый сывороткой, переносят на чистые полипропиленовые планшеты и подвергают обработке или хранят соответствующим образом.

Определение концентрации белка ИЛ-33 в сыворотке или экстрактах клеточных лизатов.

Наборы для ELISA (твердофазового иммуноферментного анализа) фирмы R&D Systems используют для определения концентраций ИЛ-33 для человеческого (DY3625) и мышиного (DY3626) ИЛ-33 в соответствии с инструкциями производителя.

Определение концентраций мышиного кальцитонина (КТ) в сыворотке или экстрактах клеточных лизатов.

Мышиный кальцитонин измеряют в сыворотке мышей с использованием набора для определения мышиного кальцитонина (КТ) методом ELISA фирмы CusaBio (Through ARP), № кат. CSB-E05133m. Процедуру анализа проводят в соответствии с инструкциями производителя, включенными в наборы.

Определение концентрации мышиного ИЛ-5 в экстрактах клеточных лизатов.

Концентрации цитокина в экстрактах белков легкого измеряют с использованием изготовленного на заказ набора для мультиплексного иммунологического анализа для мышей V-Plex (MesoScale

Discovery, № K152A41) в соответствии с инструкциями производителя.

Модель хронического воспаления легких, индуцированного клещами домашней пыли.

Мышам ИЛ-33 HumIn вводят интраназально 50 мкг экстракта клещей домашней пыли (HDM; Greer, #XPB70D3A2.5), разведенного в 20 мкл 1X фосфатно-солевого буфера (PBS), или 20 мкл 1X PBS, 3 дня в неделю на протяжении 15 недель. Второй контрольной группе мышей ИЛ-33 HumIn вводят 50 мкг экстракта HDM, разведенного в 20 мкл 1X PBS, 3 дня в неделю на протяжении 4 или 11 недель, для оценки тяжести болезни при начале лечения антителом. Двум группам мышей, подвергнутых воздействию HDM, делают подкожные инъекции 25 мг/кг антитела против ИЛ-33, H4N9675P или изотипического контрольного антитела, начиная с 4 или 11 недели воздействия HDM, и затем два раза в неделю до окончания воздействия HDM (8 или 4 недели лечения антителом). В день 85 исследований всех мышей умерщвляют и собирают их легкие. Экспериментальные дозировки и протоколы лечения для групп мышей приведены в табл. 3.

Мышам ИЛ-33 HumIn вводят интраназально 50 мкг экстракта клещей домашней пыли (HDM; Greer, #XPB70D3A2.5), разведенного в 20 мкл 1X фосфатно-солевого буфера (PBS), или 20 мкл 1X PBS, 3 дня в неделю на протяжении 15 недель. Второй контрольной группе мышей ИЛ-33 HumIn вводят 50 мкг экстракта HDM, разведенного в 20 мкл 1X PBS, 3 дня в неделю на протяжении 11 недель, для оценки тяжести болезни в начале лечения антителом. Двум группам подвергнутых воздействию HDM мышей делают подкожные инъекции 25 мг/кг антитела против ИЛ-33, H4N9675P или изотипического контрольного антитела, начиная с 11 недели после воздействия HDM, и затем два раза в неделю до окончания воздействия HDM (8 недель лечения антителом). В день 85 исследований всех мышей умерщвляют и собирают их легкие. Экспериментальные дозировки и протоколы лечения для групп мышей приведены в табл. 3.

Таблица 3

Экспериментальные дозировки и протоколы лечения групп мышей

Группа	Мыши	Интраназальное воздействие	Продолжительность интраназального воздействия	Антитело
1	Мыши IL33 HumIn	1X PBS	15 недель	нет
2	Мыши IL33 HumIn	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	4 или 11 недель	нет
3	Мыши IL33 HumIn	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	15 недель	нет
4	Мыши IL33 HumIn	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	15 недель	Изотипическое контрольное антитело
5	Мыши IL33 HumIn	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	15 недель	Антитело против ИЛ-33 (H4N9675P)

Взятие тканей для анализа экспрессии генов.

После обескровливания легкие извлекают, помещают в пробирки, содержащие 400 мкл RNA Later (Ambion, № кат. AM720), и хранят при -20°C до проведения обработки. Ткани гомогенизируют в TRIzol и используют хлороформ для разделения фаз. Водную фазу, содержащую тотальную РНК, очищают с использованием MagMAX™-96 для набора для выделения тотальной РНК на микрочипах Microarrays Total RNA Isolation Kit в соответствии с инструкциями производителя. Геномную ДНК удаляют с использованием буфера MagMAX™Turbo™DNase Buffer и ДНКазы TURBO DNase из вышеуказанного набора MagMAX. мРНК (до 2,5 мкг) подвергают обратной транскрипции в кДНК с использованием смеси Superscript® VILO™ Master Mix. кДНК разбавляют до 2 нг/мкл и 10 нг кДНК амплифицируют со смесью TaqMan® Gene Expression Master Mix и соответствующими зондами (мышиный B2m, мышиный Calca, человеческий ИЛ-33) с использованием системы детектирования последовательностей ABI 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Зонд B2m используют для амплификации гена бета-2 микроглобулина (B2m) в качестве внутреннего контроля для нормирования различий в количестве исходной кДНК (input differences). Был проведен анализ данных с использованием прикладных программ Microsoft Excel и GraphPad Prism™. Экспрессию каждого гена нормируют по экспрессии B2m в этом же образце.

Взятие легких для анализа цитокинов.

После обескровливания краниальную и среднюю доли правого легкого каждой мыши извлекают и помещают в пробирки, содержащие раствор реагента для экстракции тканевых белков (1X реагент T-PER; Pierce, #78510) с добавкой 1X коктейля ингибитора протеазы Halt Protease (Pierce, #78430). Все

последующие стадии проводят на льду. Объем реагента T-PER (содержащего коктейль ингибитора протеазы) доводят для каждого образца до соотношения ткани к T-PER, равного 1:8 (мас./об.). Образцы легкого гомогенизируют в пробирках с использованием реагента Tissue Lyser II (Qiagen, № кат. 85300). Полученные лизаты центрифугируют для осаждения обломков. Супернатанты, содержащие экстракты растворимого белка, переносят в свежие пробирки и хранят при 4°C до последующего анализа.

Общее содержание белка в экстрактах белка легкого измеряют путем проведения анализа по Бредфорду (Bradford assay). Для проведения анализа 10 мкл разбавленных образцов экстракта помещают на 96-луночные планшеты в количестве, необходимом для проведения двух параллельных измерений, и смешивают с 200 мкл 1X реагента красителя (BioRad, № 500-0006). Серийные разбавления альбумина бычьей сыворотки (BSA; Sigma, № A7979), начиная с 700 мкг/мл, в 1X реагенте T-Per, используют в качестве стандарта для определения концентрации белка в экстрактах. После 5 мин инкубации при комнатной температуре измеряют поглощение при 595 нм на устройстве считывания планшетов SpectraMax M5 фирмы Molecular Devices. Анализ данных для определения общего содержания белка в экстракте легкого на основании стандарта BSA проводят с использованием прикладной программы GraphPad Prism™.

Концентрацию каждого цитокина в экстрактах общего белка легких для всех мышей каждой группы нормируют по общему содержанию белка в экстрактах, измеренному по Бредфорду, и выражают для каждой группы как среднее содержание цитокина в пг/мг общего белка легких (пг/мг белка легких ± стандартное отклонение (SD)).

Таблица 4

Гены, наиболее подверженные воздействию ИЛ-33

DrpIL 33	ИЛ-33 сердца	ИЛ-33 почки	ИЛ-33 печени	ИЛ-33 легкого	ИЛ-33 селезенки	Обозначение гена	Описание
10,2	415,9	33,5	72,7	5,0	86,3	Calca	Кальцитонин/кальцитонин-ген-родственный пептид (КГРП)
36,2	114,8	51,7	572,8	24,9	13,8	Retnla	Резистин-подобная (молекула) альфа
6,5	194,0	19,5	152,2	4,5	19,4	Ccl8	Хемокиновый (C-C-мотив) лиганд 8
6,5	17,8	251,0	14,9	8,0	45,9	Saa3	Сывороточный амилоид А 3
38,3	28,2	8,3	66,6	53,2	29,3	BC117090	Gm1975
4,9	32,8	61,2	40,4	15,3	3,6	Klrg1	Лектинподобный рецептор клетки-убийцы
15,4	11,7	6,8	86,7	27,1	13,8	Csta	Стефин A1
5,7	46,1	18,2	38,4	1,8	4,5	Ms4a8a	Трансмембранный 4-домен
1,7	19,0	23,3	81,6	9,4	6,6	Ccl11	Хемокиновый (C-C-мотив) лиганд 11
3,7	17,9	49,0	18,0	25,8	10,5	Serpina3f	Сериновые (или цистеиновые) пептиды

Взятие легкого для анализа клеточного инфильтрата легкого.

После обескровливания извлекают каудальную долю правого легкого каждой мыши, помещают в пробирку, содержащую раствор 20 мкг/мл ДНКазы и 0,7 ед./мл Liberase TH, разведенных в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS) и разрезают на кусочки размером приблизительно 2-3 мм. Пробирки с разрезанным на кусочки легким затем инкубируют на водяной бане при 37°C в течение 20 мин. Реакцию останавливают прибавлением этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) в конечной концентрации 10 мМ. Образцы затем переносят в пробирки gentleMACS C Tubes. Объем в пробирках C Tubes доводят до 3 мл буфером MACS и образцы затем подвергают диссоциации для получения суспензий отдельных клеток с использованием диссоциатора gentleMACS dissociator® (Miltenyi Biotec). Пробирки затем центрифугируют и полученный осадок ресуспендируют в 4 мл 1X буфера Red Blood Cell Lysing Buffer для лизиса красных кровяных клеток. После инкубации в течение 3 мин при комнатной температуре, прибавляют 10 мл 1X DPBS (фосфатно-солевой буфер Дульбекко) для дезактивации буфера лизиса красных кровяных клеток. Клеточные суспензии затем центрифугируют и полученные клеточные осадки ресуспендируют в 1 мл 1X DPBS. Ресуспендированные образцы фильтруют в центрифуге (1 мин при 400×g) через фильтровальную пластину 100 мкм и высеивают приблизительно $1,5 \times 10^6$ клеток на лунку в 96-луночный планшет с U-образным дном. Клетки затем центрифугируют и клеточный осадок

ресуспендируют в 100 мкл фиксируемого красителя мертвых клеток для ближней ИК-области Near-IR LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain (Invitrogen № кат.: L34976, партия № 1647137), разбавленного 1:500 в 1X DPBS для определения жизнеспособности клеток. Клетки инкубируют с красителем для определения жизнеспособности в течение 20 мин при комнатной температуре, в условиях защиты от освещения. После одной промывки в 1X DPBS, клетки инкубируют в 50 мкл буфера MACS, содержащего 10 мкг/мл очищенного крысиного анти-мышинного CD16/CD32 Fc Block, в течение 10 мин при 4°C. Клетки затем инкубируют в пригодной 2× смеси антител, разведенной в окрашивающем буфере Brilliant Stain Buffer (описан в табл. 5) в течение 30 мин при 4°C в условиях защиты от освещения. После инкубации антитела клетки промывают дважды буфером MACS, ресуспендируют в BD CytoFix, разбавленном 1:4 в 1X DPBS и затем инкубируют в течение 15 мин при 4°C в условиях защиты от освещения. Клетки затем промывают и ресуспендируют в буфере MACS. Клеточные суспензии затем фильтруют в новый планшет с U-образным дном через фильтровальную пластину AcroPrep Advance 96 Filter Plate 30-40 мкм. Результаты для образца собирают с помощью анализатора клеток LSR Fortessa X-20 с использованием приставки HTS (BD Biosciences). Анализ данных проводят с использованием прикладной программы FlowJo X Software (Tree Star, OR) и статистический анализ проводят с использованием GraphPad Prism™ (GraphPad Software, CA). Эозинофилы определяют как живые (жизнеспособные клетки не поглощают краситель), синглеты, CD45⁺, F4/80⁺, Ly6G⁻, CD11c^{lo-int}, SiglecF^{hi}. Нейтрофилы определяют как живые, синглеты, CD45⁺, F4/80⁻, Ly6G⁺. Данные для эозинофилов и нейтрофилов выражают как частоту живых клеток.

Таблица 5

Антитела, используемые для анализа методом проточной цитометрии

Антитело	Флюорохром	Производитель	№ по каталогу, № партии	Конечное разбавление
CD45	Alexa Fluor 700	BioLegend	103128, B191240	1/200
Siglec-F	BV 421	BD	562681, 4234913	1/200
F4/80	PE	BD	56410, 5054900	1/500
Ly6G	BUV395	BD	563978, 4178621	1/200
CD11c	APC	BD	550261, 5016523	1/200

Статистический анализ.

Статистические анализы проводят с использованием GraphPad Prism™, версия 6.0 (GraphPad Software, CA).

Нормальность данных оценивают с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Если данные проходят тест на нормальность, и стандартные отклонения для разных групп статистически не отличаются друг от друга при оценке по критерию Брауна-Форсайта (Brown-Forsythe), то результаты интерпретируют с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим использованием апостериорного критерия Тьюки (Tukey) для множественных сравнений. Если данные не удовлетворяют критерию нормальности или стандартные отклонения значительно различаются, то результаты интерпретируют с использованием критерия Крускала-Уоллиса (Kruskal-Wallis) с последующим использованием апостериорного критерия Данна (Dunn) для множественных сравнений. Различия считают статистически значимыми при величине $P < 0,05$.

Коэффициент корреляции и значимость рассчитывают с использованием двусторонней непараметрической корреляции по Спирмену (Spearman). Корреляции считают статистически значимыми при величине $P < 0,05$.

Краткое изложение результатов

Результаты продемонстрировали, что десятью генами, наиболее подверженными воздействию (top ten genes that were perturbed) у животных со сверхэкспрессией ИЛ-33, являются кальцитонин (Calca), ретиноидподобная альфа (RETNA), хемокиновый (C-C-мотив) лиганд 8 (Ccl8), сывороточный амилоид A3 (Saa3), Gm1975 (BC117090), лектинподобный рецептор клетки-убийцы (Klrg1), стефин A1 (Csta), трансмембранный 4-домен (Ms4a8a), хемокиновый (C-C-мотив) лиганд 11 (Ccl11) и сериновые (или цистеиновые) пептиды (Serpina3f) (см. табл. 4). Кроме того, данные также показали, что как ИЛ-33 сыворотки, так и кальцитонин сыворотки были значительно повышенными в этой мышинной модели (см. уровни ИЛ-33 сыворотки на фиг. 1А и уровни кальцитонина сыворотки на фиг. 1В). Повышение ИЛ-33 в сыворотке коррелирует с повышенными уровнями кальцитонина сыворотки.

Кроме того, модель хронической пробы клещей домашней пыли (HDM), которую используют в качестве модели тяжелого прогрессирующего воспаления легких после воздействия аллергена, продемонстрировала повышающую регуляцию экспрессии гена кальцитонина в легких мышей при хроническом воздействии HDM, но экспрессия кальцитонина в значительной степени снижается в легких мышей, получивших лечение антагонистом ИЛ-33 (H4N9675P, антитело против ИЛ-33). Лечение подобранным по изотипу негативным контрольным антителом не влияло на уровень экспрессии гена кальцитонина (фиг. 2).

Кроме того, кальцитонин сыворотки также был повышенным в этой мышинной модели HDM, и уровень кальцитонина сыворотки коррелирует с уровнем кальцитонина, наблюдающимся в легких этих мы-

шей (см. фиг. 3). Кроме того, уровень кальцитонина сыворотки коррелирует с повышенными уровнями ИЛ-33, наблюдающимися в этой мышинной модели НДМ (см. фиг. 4), что позволяет предположить, что кальцитонин может быть использован как потенциальный биомаркер ИЛ-33 в ходе опосредованного ИЛ-33 заболевания (например, аллергической реакции).

Касательно параметров опосредованного ИЛ-33 заболевания, в этой модели НДМ были изучены концентрация нейтрофилов в легких, эозинофилов легких и уровни ИЛ-5. После 15 недель воздействия аллергеном клещей домашней пыли все три параметра имели повышенные значения (см. фиг. 5А (нейтрофилы), 5В (эозинофилы) и 5С (ИЛ-5)). Однако мыши, получавшие антитело ИЛ-33 Н4Н9675Р, продемонстрировали значительно меньшие количества нейтрофилов, эозинофилов и ИЛ-5 в легких по сравнению с мышами, подвергнутыми воздействию аллергена и не получавшими лечения или получавшими антитело негативного изотипического контроля (см. фиг. 5А-5С).

Кроме того, наблюдалась значительная корреляция между уровнями кальцитонина сыворотки и тремя изученными параметрами заболевания. Фиг. 6А показывает корреляцию между кальцитонином сыворотки и нейтрофилами легких. Фиг. 6В показывает корреляцию между кальцитонином сыворотки и эозинофилами легких, и фиг. 6С показывает корреляцию между кальцитонином сыворотки и уровнями ИЛ-5 в легких.

Кроме того, наблюдалась значительная корреляция между уровнями ИЛ-33 в легких и концентрацией нейтрофилов легких (фиг. 7А), эозинофилов легких (фиг. 7В) и уровнями ИЛ-5 в легких (фиг. 7С).

В общем, данные, полученные в модели клещей домашней пыли, указывают на существование значительной корреляции между уровнем ИЛ-33, частотой по меньшей мере трех параметров заболевания, ассоциированных с этой моделью хронической аллергии, и экспрессией кальцитонина. По существу, эта информация позволяет предположить, что кальцитонин может быть одним из биомаркеров тяжести и/или прогрессирования заболевания у млекопитающего и, кроме того, данные позволяют предположить, что кальцитонин может быть использован для оценки эффективности терапии антагонистом ИЛ-33, как описано в данном документе.

Объем данного изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами реализации, описанными в данном документе. Фактически, различные модификации изобретения, помимо описанных в данном документе, будут очевидными для квалифицированных специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопроводительных фигур.

Предполагается, что такие модификации входят в объем приложенной формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения опосредованного интерлейкином-33 (ИЛ-33) воспалительного заболевания дыхательных путей и/или легких у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антагониста интерлейкина-33, где антагонист интерлейкина-33 представляет собой антитело против ИЛ-33 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276-278-280-284-286-288, и где субъект был выбран для лечения антагонистом ИЛ-33 на основании проявления повышенного уровня кальцитонина в сыворотке крови по отношению к контрольному уровню кальцитонина, где контрольный уровень кальцитонина составляет 5 пг/мл в образце сыворотки крови для субъекта женского пола и 10 пг/мл в образце сыворотки крови для субъекта мужского пола.

2. Способ по п.1, где антагонист ИЛ-33 представляет собой антитело против ИЛ-33.

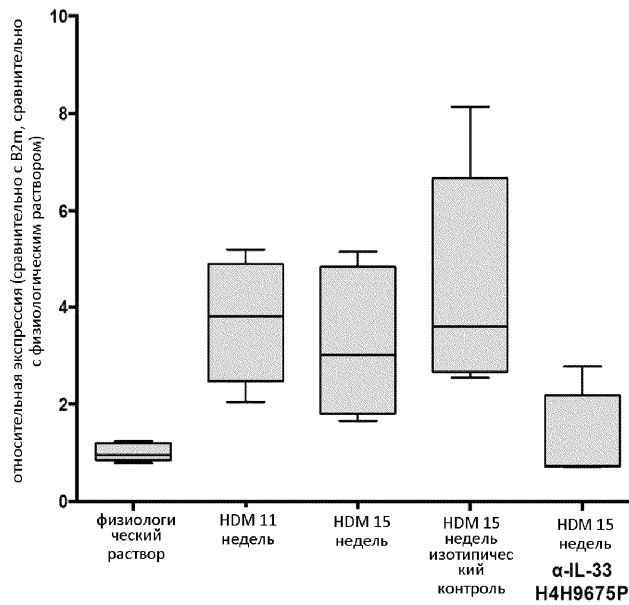
3. Способ по п.1 или 2, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, и переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 282.

4. Способ по любому из пп.1-3, дополнительно включающий введение эффективного количества второго терапевтического агента, полезного для уменьшения по меньшей мере одного симптома опосредованного ИЛ-33 воспалительного заболевания дыхательных путей и/или легких.

5. Способ по п.4, где второе терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из нестероидного противовоспалительного средства (NSAID), кортикостероида, бронходилататора, антигистаминного средства, эпинефрина, противозастойного средства, антагониста тимического стромального лимфопоэтина (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, перорального ингибитора PDE4 и другого антагониста ИЛ-33 или другого антагониста на основе антител или рецепторов к ИЛ-33.

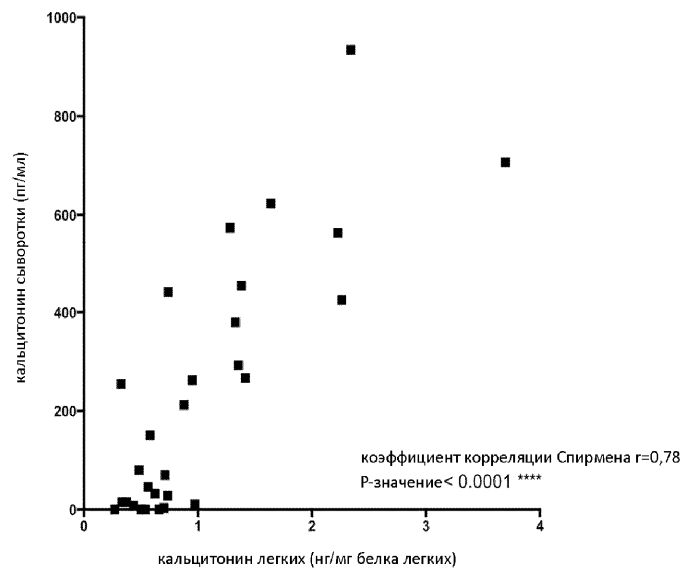
6. Способ по любому из пп.1-5, где уровень кальцитонина повышен в сыворотке крови субъекта, имеющего опосредованное ИЛ-33 воспалительное заболевание дыхательных путей и/или легких, и где повышенный уровень кальцитонина в сыворотке крови коррелирует с повышенным уровнем кальцитонина и ИЛ-33 в легких субъекта.

экспрессия гена кальцитонина легких (Calca)



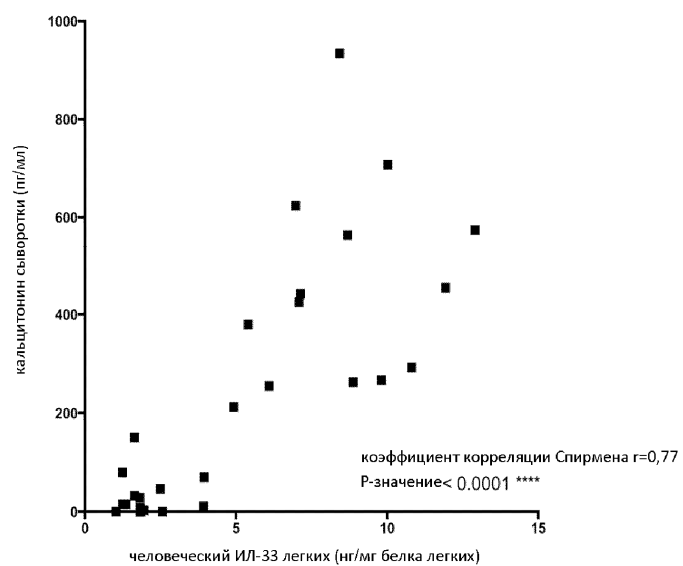
Фиг. 2

корреляция уровней белка кальцитонина (КТ) в сыворотке и легких



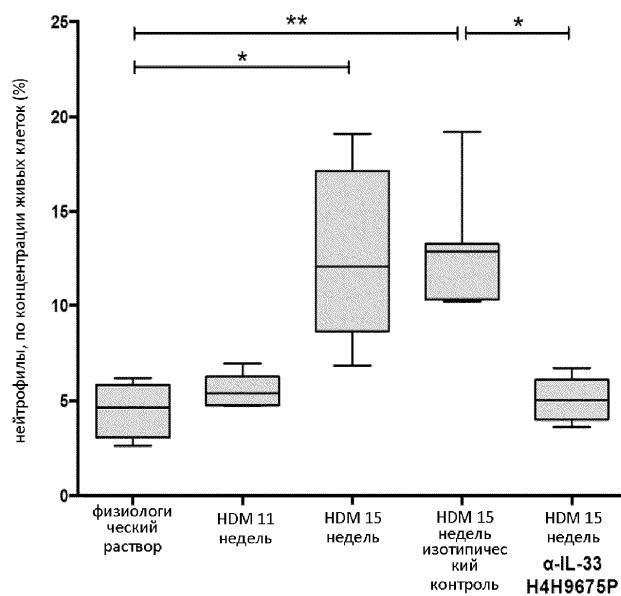
Фиг. 3

корреляция уровней белка кальцитонина (КТ) сыворотки и ИЛ-33 легких



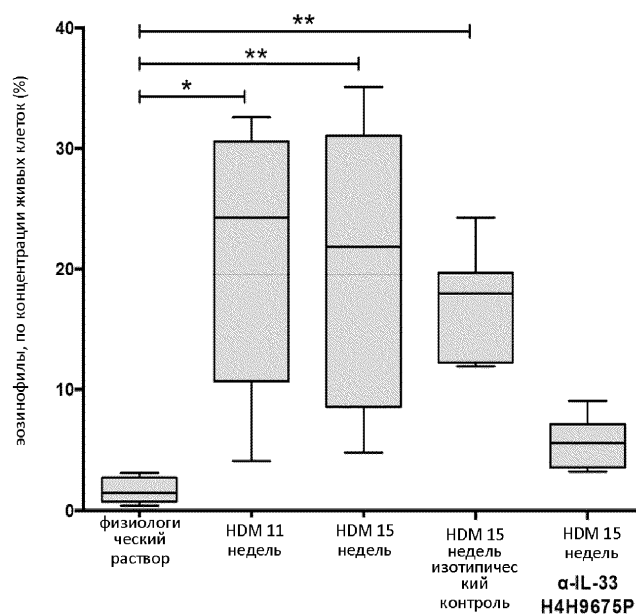
Фиг. 4

концентрация нейтрофилов легких



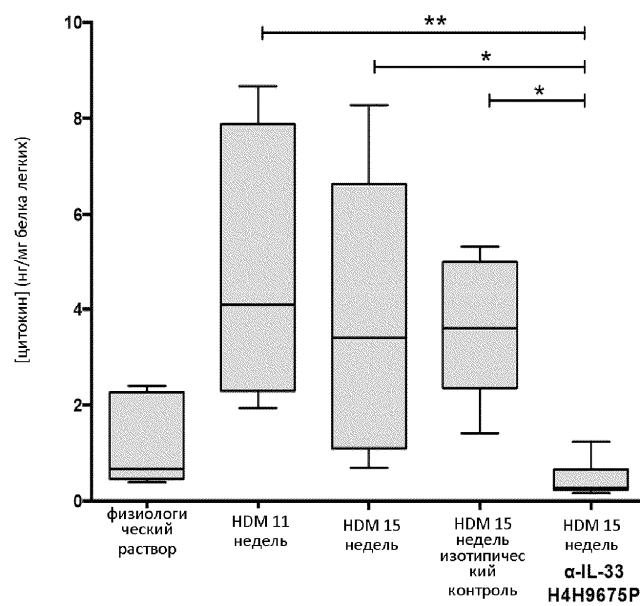
Фиг. 5А

концентрация эозинофилов легких



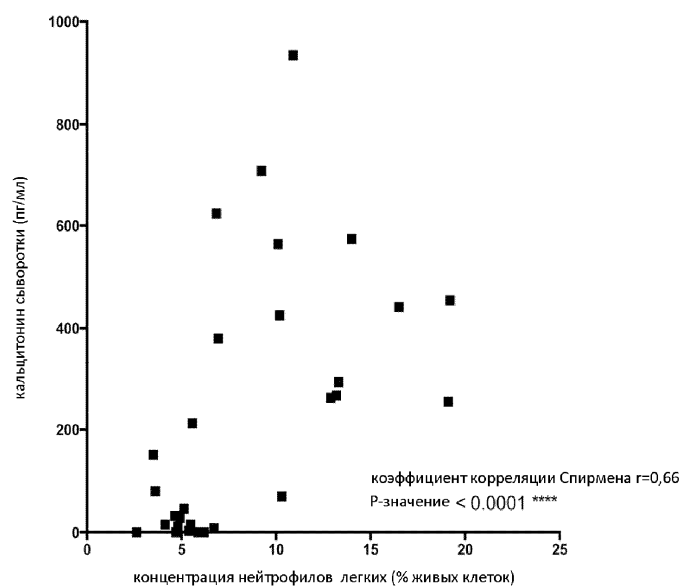
Фиг. 5B

уровни ИЛ-5 легких



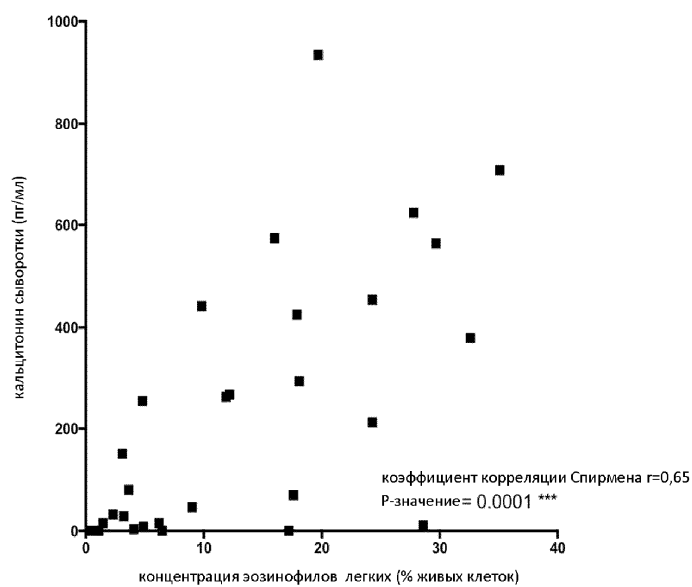
Фиг. 5C

корреляция уровней кальцитонина (КТ) сыворотки и концентрации
нейтрофилов легких



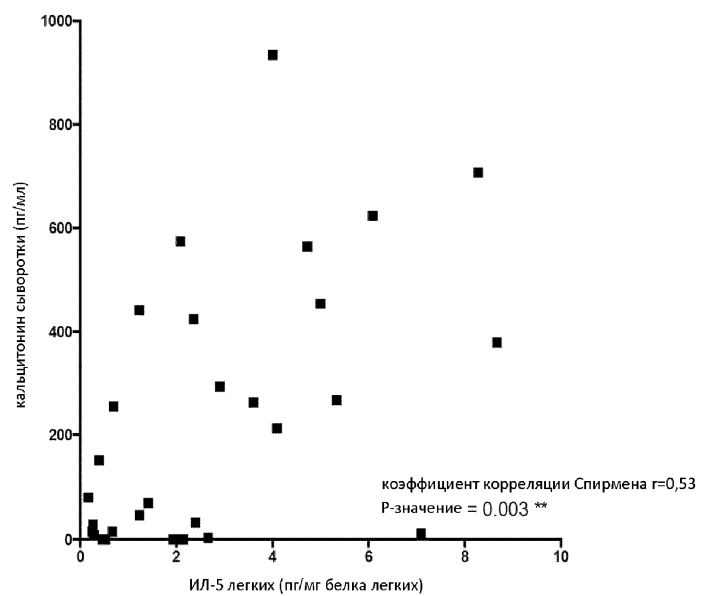
Фиг. 6А

корреляция уровней кальцитонина (КТ) сыворотки и концентрации
эозинофилов легких



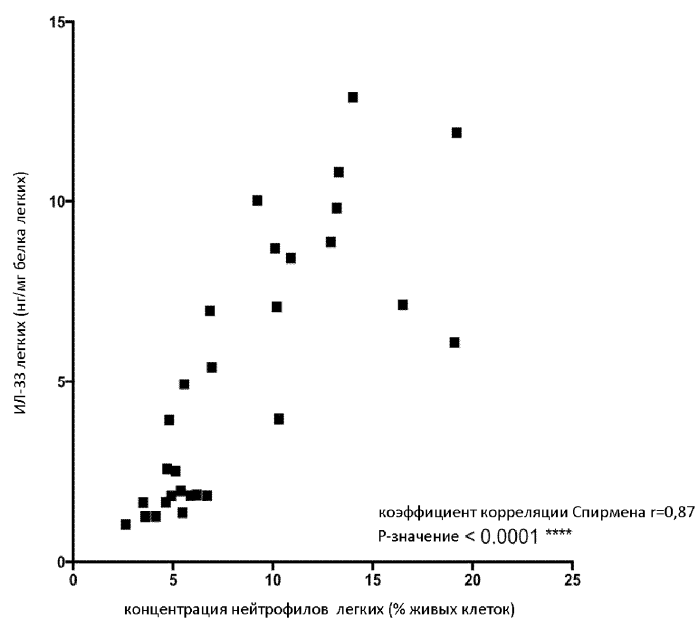
Фиг. 6В

корреляция уровней кальцитонина (КТ) сыворотки и белка ИЛ-5 легких



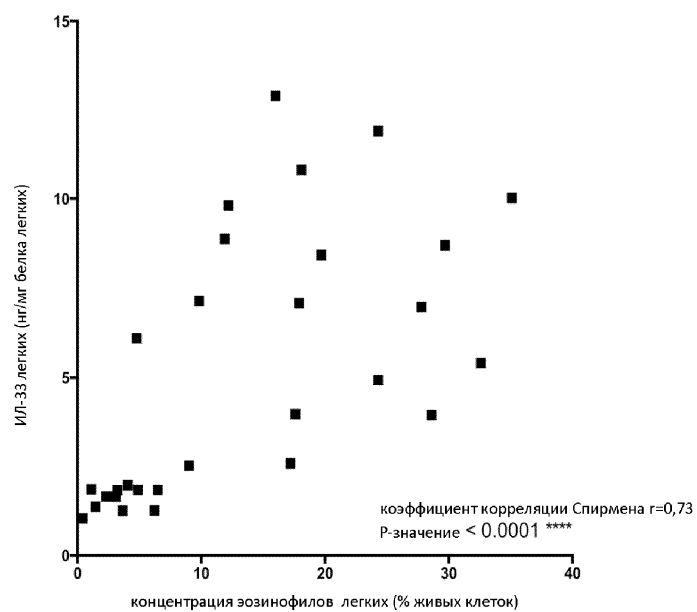
Фиг. 6С

корреляция уровней ИЛ-33 легких и концентрации нейтрофилов легких



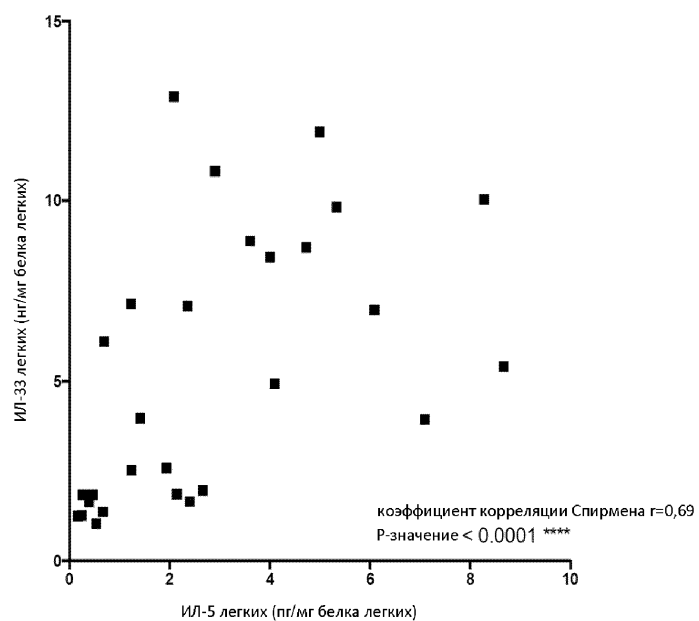
Фиг. 7А

корреляция уровней ИЛ-33 легких и концентрации эозинофилов легких



Фиг. 7В

корреляция уровней белка ИЛ-33 легких и ИЛ-5 легких



Фиг. 7С



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2